

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

ŠPALIR Barbara

KAKOVOST MLEKA IZ MLEKOMATOV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Domžale, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

ŠPALIR Barbara

KAKOVOST MLEKA IZ MLEKOMATOV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

QUALITY OF MILK FROM MILK VENDING MACHINES

GRADUATION THESIS
University studies

Domžale, 2013

Z diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstvo – zootehnika. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mlekarstvo, v laboratoriju za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Andrejo ČANŽEK MAJHENIČ.

Recenzentka: prof. dr. Irena ROGELJ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Andreja ČANŽEK MAJHENIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Irena ROGELJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske 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.

Barbara ŠPALIR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 637.1(043.2)

KG mleko/mlekomati/kakovost/Slovenija

KK AGRIS Q02/9412

AV ŠPALIR, Barbara

SA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)

KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

LI 2013

IN KAKOVOST MLEKA IZ MLEKOMATOV

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP IX, 38 str., 9 pregl., 13 sl., 24 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Prodaja mleka prek mlekomatov se je v slovenskem prostoru že dodobra uveljavila. Ker pa gre za prodajo surovega mleka lahko, kljub upoštevanju predpisanih meril za varno in pravilno rokovanje s surovim mlekom, pride do nepravilnosti, ki neposredno ogrozijo zdravje potrošnika. Zato je dosledno izvajanje nadzora kakovosti in zdravstvene ustreznosti surovega mleka iz mlekomatov s strani pristojnih služb nujno. Kljub urejeni zakonodaji pa je samo izvajanje nadzora pri nas še precej nedorečeno, zato smo se v nalogi odločili preveriti določene parametre kakovosti in zdravstvene ustreznosti vzorcev mleka, odvzetih iz petih različnih mlekomatov, pet tednov zapored. Eno serijo pettedenskega vzorčenja smo izvedli v zgodnje spomladanskem in eno v poletno-jesenskem obdobju. V vzorcih mleka smo preverjali prisotnost zaviralnih snovi, vsebnost maščobe, kislinsko stopnjo, število somatskih celic, skupno število mikroorganizmov ter prisotnost koliformnih bakterij in koagulaza pozitivnih stafilokokov. Vsebnost maščobe je bila v obeh obdobjih primerno visoka in sicer so bile povprečne vrednosti rahlo večje spomladi, od 4,07-4,22 %, ter poleti od 3,90-4,14 %. Tudi povprečne vrednosti kislinske stopnje so bile spomladi rahlo večje, od 6,25-6,50 SH, in poleti od 5,58-6,26. Število somatskih celic (ŠSC) je večinoma ustrezalo, razen pri nekaj vzorcih mleka iz enega mlekomata, ki so vsebovali tudi do 541.000 ŠSC/ml. Skupno število mikroorganizmov je bilo v spomladanskem obdobju manjše kot v poletno-jesenskem, saj je bila največja vrednost v pomladanskem obdobju 48×10^5 KE/ml, v poletno-jesenskem pa $2,1 \times 10^7$ KE/ml. Število koliformnih bakterij se je gibalo v spomladanskem obdobju od 10-9,500 KE/ml, v poletno-jesenskem pa od 20-7,700 KE/ml. Število koagulaza pozitivnih stafilokokov je bilo pri 56 % vzorcev mleka večje od 500 KE/ml. Pri nobenem od preiskovanih vzorcev mleka nismo potrdili prisotnost zaviralnih snovi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC UDC 637.1(043.2)

CX milk/milk vending machines/quality/Slovenija

CC AGRIS Q02/9412

AU ŠPALIR, Barbara

AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science

PY 2013

TI QUALITY OF MILK FROM MILK VENDING MACHINES

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 38 p., 9 tab., 13 fig., 24 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Sale of raw milk via milk vending machines in Slovenian area is already well established. Since the raw milk is sold, strict implementation of measures for safe and proper handling of raw milk is necessary to avoid incorrectness which can directly threaten the consumer's health. Therefore, consistent implementation of quality control and health adequacy of raw milk from milk vending machines by the relevant competent services is required. Despite governed legislation, actual implementation of control is still rather vague, so we decided to evaluate some quality parameters and health adequacy of milk samples from five different milk vending machines, sampled once a week five weeks in a row. One series of five-week sampling was conducted in early spring and one in late summer-early autumn. Milk samples were tested for the presence of inhibitory substances, fat content, titratable acidity, somatic cell count, total plate count, as well as the presence of coliforms and coagulase positive staphylococci. The fat content was adequate in both periods, although average values were slightly higher in spring, from 4.07 to 4.22 %, and in late summer-early autumn from 3.90 to 4.14 %. Similarly, average values of titratable acidity were slightly higher in spring, from 6.25 to 6.50 SH, and in late summer-early autumn from 5.58 to 6.26. Somatic cell counts generally corresponded, except for milk samples from one milk vending machine, which contained up to 541.000 SCC/ml. Total plate counts were lower during the spring with the highest counts of 480.000 cfu/ml, while in late summer-early autumn one sample of milk revealed even 21.500.000 cfu/ml. In spring counts of coliform bacteria ranged from 10-9.500 cfu/ml of milk, while in late summer-early autumn counts ranged from 20-7.700 cfu/ml. Fifty-six % of milk samples exceeded 500 cfu of coagulase-positive staphylococci per 1 ml of milk. None of the tested milk samples was positive for the presence of inhibitory substances.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 MLEKOMATI.....	3
2.2 MLEKO.....	4
2.2.1 Sestava mleka	5
2.2.2 Dejavniki oblikovanja mikrobiote surovega mleka	6
2.3 KEMIJSKA KAKOVOST MLEKA	6
2.3.1 Mlečna maščoba	7
2.4 FIZIKALNA KAKOVOST MLEKA.....	7
2.4.1 Kislinska stopnja mleka	8
2.5 HIGIENSKA KAKOVOST MLEKA	8
2.5.1 Zaviralne snovi v mleku	8
2.5.2 Mikrobiološka kakovost mleka.....	9
2.5.2.1 Skupno število mikroorganizmov	9
2.5.2.2 Koliformne bakterije.....	11
2.5.2.3 Bakterijska vrsta <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.5.2.4 Somatske celice	12
2.6 NADZOR KAKOVOSTI MLEKA V MLEKOMATIH	13
3 MATERIAL IN METODE.....	14
3.1 OPIS POSKUSA IN NAČRT DELA	14
3.2 MATERIAL.....	15
3.2.1 Vzorci mleka iz mlekomatov.....	15
3.2.2 Reagenti za določanje vsebnosti maščobe.....	15
3.2.3 Reagenti za določanje kislinske stopnje.....	15
3.2.4 Komplet za določanje zaviralnih snovi.....	15
3.2.5 Gojišča, raztopine za razredčevanje in dodatki	16
3.2.5.1 Trdno gojišče VRBL	16
3.2.5.2 Trdno gojišče PCA	16
3.2.5.3 Trdno gojišče BP z dodatkom kunčje plazme in fibrinogena	16
3.2.5.4 Kunčja plazma in fibrinogen (Rabbit Plasma Fibrinogen = RPF)	16
3.2.5.5 Ringerjeva raztopina ¼ jakosti.....	16
3.2.6 Laboratorijska oprema	17
3.3 METODE	18
3.3.1 Določanje vsebnosti mlečne maščobe	18
3.3.2 Določanje kislinske stopnje mleka	19
3.3.3 Določanje števila somatskih celic	19

3.3.4 Določanje posameznih skupin mikroorganizmov s štetjem na petrijevih ploščah	20
3.3.5 Določanje prisotnosti zaviralnih snovi v mleku	22
4 REZULTATI	23
4.1 VSEBNOST MLEČNE MAŠČOBE.....	23
4.2 KISLINSKA STOPNJA MLEKA.....	24
4.3 ŠTEVILO SOMATSKIH CELIC	25
4.4 SKUPNO ŠTEVILO MIKROORGANIZMOV	26
4.5 PRISOTNOST KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOOV	27
4.6 PRISOTNOST KOLIFORMNIH BAKTERIJ.....	29
4.7 PRISOTNOST ANTIBIOTIKOV	30
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1 RAZPRAVA.....	31
5.1.1 Fizikalno - kemijska kakovost	31
5.1.2 Higienska kakovost	32
5.1.3 Mikrobiološka kakovost	32
5.2 SKLEPI	33
6 POVZETEK	35
7 VIRI	37

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemijska sestava mleka (Mavrin in Oštir, 2002: 30)	5
Preglednica 2: Kakovostni razredi mleka (Mavrin in Oštir, 2002: 56)	10
Preglednica 3: Pogoji inkubacije, uporabljeni za posamezno skupino mikroorganizmov	20
Preglednica 4: Povprečne vsebnosti mlečne maščobe (%) v vzorcih mleka v spomladanskem (n = 5) in poletno-jesenskem obdobju (n = 5)	23
Preglednica 5: Povprečne vrednosti kislinke stopnje (SH) mleka v spomladanskem (n = 5) in poletno-jesenskem obdobju (n = 5)	24
Preglednica 6: Število somatskih celic v vzorcih mleka (ŠSC/ml), vzorčenih v spomladanskem obdobju (6a) in v poletno-jesenskem obdobju (6b)	25
Preglednica 7: Skupno število mikroorganizmov v vzorcih mleka (KE/ml), vzorčenih v spomladanskem (7a) in poletno-jesenskem obdobju (7b)	26
Preglednica 8: Število koagulaza pozitivnih stafilokokov v vzorcih mleka (KE/ml), vzorčenih v spomladanskem (8a) in poletno-jesenskem (8b) obdobju	28
Preglednica 9: Število koliformnih bakterij v vzorcih mleka (KE/ml), vzorčenih v spomladanskem (9a) in poletno-jesenskem obdobju (9b)	29

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zgradba mlekomata (Pensilina, 2011)	4
Slika 2: Načrt dela diplomske naloge	14
Slika 3: Vzorčeno mleko v plastenkah (Foto B. Špalir)	15
Slika 4: a) vzorci mleka v butirometrih; b) centrifuga; c) odčitavanje vsebnosti maščobe s skale butirometra (Foto A. Čanžek Majhenič)	18
Slika 5: Priprava vzorcev mleka za določevanje kislinske stopnje (Foto A. Čanžek Majhenič)	19
Slika 6: Razredčitve vzorcev mleka in petrijeve plošče, prelite z gojiščem (Foto B. Špalir)	20
Slika 7: Razredčitve vzorcev mleka v petrijevih ploščah in plošče prelite z gojiščem VRBL (Foto B. Špalir)	21
Slika 8: Termostat za inkubacijo vzorcev pri določanju prisotnosti zaviralnih snovi (Foto B. Špalir)	22
Slika 9: Povprečna vsebnost mlečne maščobe v spomladanskem in poletno-jesenskem obdobju	23
Slika 10: Povprečne vrednosti kislinske stopnje vzorcev mleka v spomladanskem in poletno-jesenskem obdobju	24
Slika 11: Zrasle kolonije na gojišču za določanje skupnega števila mikroorganizmov (Foto A. Čanžek Majhenič)	26
Slika 12: Kolonije koagulaza pozitivnih stafilokokov, obdane s precipitacijsko cono fibrinogena (Foto A. Čanžek Majhenič)	27
Slika 13: Značilne kolonije koliformnih bakterij na gojišču VRBL (Foto A. Čanžek Majhenič)	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point (analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk)
M	molarnost
SH	enota za kislinsko stopnjo po Soxhlet-Henklu
KE	kolonijske enote
KE/ml	kolonijske enote na mililiter
SŠMO	skupno število mikroorganizmov
VRBL	Violet Red Bile Lactose Agar – gojišče za določanje koliformnih mikroorganizmov
BP	Baird Parker Agar Base – gojišče za določanje stafilokokov
RPF	Rabbit Plasma Fibrinogen – kunčja plazma in fibrinogen
SC/ml	somatske celice na mililiter
ŠSC	število somatskih celic
DNK	deoksiribonukleinska kislina
PCA	Plate Count Agar – gojišče za določanje skupnega števila mikroorganizmov
<i>Sta.</i>	bakterije rodu <i>Staphylococcus</i>
ssp.	subspecies
UV	ultravijoličen

1 UVOD

Pred približno šestimi leti so se v Sloveniji začeli pojavljati prvi mlekomati, ki pa so se že dodobra uveljavili. Kmetije, ki se ukvarjajo s prirejo mleka, so v tem prepoznale novo tržno nišo, ker pa je danes registriranih že skoraj 100 mlekomatov lahko rečemo, da jih je slovenski potrošnik dobro sprejel.

Mlekomati so neke vrste polnilni avtomati, kjer v steklenico ali plastenko natočimo sveže surovo mleko. Torej mora stranka v mlekomat vstaviti prazno steklenico in ko vstavi še denar, ji avtomat steklenico napolni z mlekom. Lastniki mlekomatov so kmetje. Kmet kupi avtomatski točilni aparat za mleko in ga postavi na mesto, kjer je na voljo potrošnikom in je odgovoren za njegovo delovanje.

Mlekomat je sistem z velikim računalnikom, ki:

- na zaslonu prikazuje temperaturo mleka ter datum in uro polnjenja,
- preko mobilnega telefona sproti obvešča lastnika mlekomata (kmeta) o temperaturi in količini mleka v mlekomatu,
- ne dovoljuje točenja mleka, starejšega od 24 ur,
- ustavi točenje mleka, če se temperatura mleka nenadzorovano dvigne.

Surovo mleko je zaradi svoje bogate sestave izvrsten medij za rast in razvoj različnih vrst mikroorganizmov. Način pridobivanja mleka je takšen, da praktično ne moremo preprečiti okužbe mleka, zato je dobro poznavanje mikrobiote mleka izjemnega pomena. Poznavanje fizioloških in genetskih lastnosti, ter biokemijskih aktivnosti mikroorganizmov, s katerimi spreminjajo fizikalne, kemijske in senzorične lastnosti mleka, omogoča strokovnjakom, da ugotovijo vir okužbe mleka in kontrolirajo pogoje njihovega razmnoževanja (Rogelj, 2003).

Govoriti o kakovosti mleka je precej zapleteno, ker je njegova predelovalna veriga dolga, vsak člen te verige pa kakovost razume na svojem področju. Preden začnemo govoriti o kakovosti mleka se moramo torej opredeliti, kaj si pod tem pojmom predstavljamo. Kakovost mleka lahko opredelimo le tako, da jo opišemo s pomočjo različnih parametrov, ki upoštevajo kemijsko, fizikalno, higiensko in mikrobiološko kakovost.

1.1 NAMEN DELA

Namen naše naloge je bil določiti kemijsko in mikrobiološko kakovost mleka, odvzetega iz petih naključno izbranih mlekomatov, kjer smo vzorčenje opravili v zgodnje spomladanskem in ga nato ponovili še v poletno-jesenskem obdobju leta 2010. Lahko se namreč zgodi, da tudi ob upoštevanju vseh predpisanih meril za varno in pravilno rokovanje s surovim mlekom pride do nepravilnosti, ki lahko neposredno ogrozijo zdravje potrošnika. Zato je uradni nadzor nad zdravstveno ustreznostjo in varnostjo mleka nujen in ga je s 15. aprilom 2010 prevzela Veterinarska uprava RS, a ga še ne opravlja v obsegu, predpisanem z zakonodajo. Menili smo, da bodo naši rezultati koristen podatek o kakovosti mleka izbranih mlekomatov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

1. Pričakovali smo, da bodo vzorci surovega mleka iz mlekomatov ustrezne kakovosti.
2. Predvidevali smo, da bo mikrobiološka slika mleka slabša v poletno-jesenskem obdobju.

2 PREGLED OBJAV

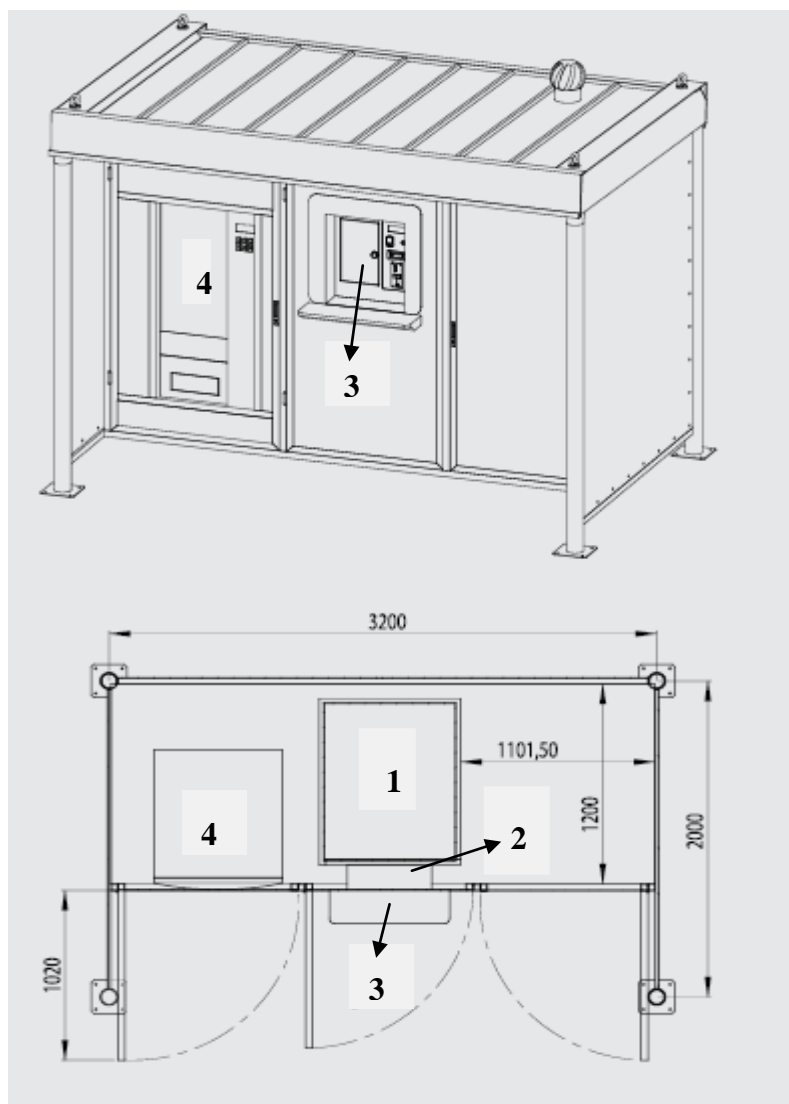
2.1 MLEKOMATI

Sistem mlekomatov so razvili v Švici, izpopolnili v Italiji, uporaba mlekomatov pa je danes razširjena po celotni Evropi. Mlekamate bi lahko preprosto imenovali tudi avtomatski točilni sistem za prodajo svežega, surovega mleka. Mlekomat zagotavlja varnost potrošniku z ohranjanjem kakovosti mleka, vendar samo v primeru korektnega delovanja in vzdrževanja dobre higijene aparata. Programska oprema in nadzorni sistem mlekomata ne dovoljujeta točenja mleka starejšega od 24 ur. V primeru, da lastnik mlekomata mleka ne zamenja s svežim, se delovanje mlekomata samodejno ustavi. Prav tako se ustavi delovanje, če pride do nenadzorovanega dviga temperature mleka. Lastnik je o stanju mleka in mlekomata sproti obveščan preko modula GSM (Mlekomati, 2012).

V sklopu mlekomata je navadno postavljen tudi avtomat za izdajo embalaže, ki je v obliki litrskih steklenic oz. plastenk. Tako lahko poleg mleka, na istem mestu, kupimo tudi embalažo. Iz ekoloških razlogov je priporočeno, da v ta namen kupimo le eno enoto embalaže, najbolje stekleno, ki jo ob primerni higieni lahko večkrat uporabimo, poleg tega pa se plastenka navadno hitro navzame vonja po mleku. Po polnjenju moramo steklenico zapreti sami (Mlekomati, 2012).

Pristojne inšpekcijske službe imajo na voljo posebne kontrolne kartice, ki jim omogočajo vpogled v stanje aparata za mesec dni nazaj, kar jim omogoča kontrolo mleka. Temperatura se evidentira vsakih 20 minut, kmetje pa tudi sami mleko redno dajejo v analize (Mlekomati, 2012).

Za dobro obveščenost potrošnikov so nekateri mlekomati opremljeni z ekranom, na katerem je izpisana trenutna temperatura mleka ter datum in čas zadnjega polnjenja mleka. Mlekomati so opremljeni tudi z mehanizmi, ki po končanem točenju mleka v embalažo poskrbijo za higieno mlekomata. Točilni prostor se po vsakem točenju mleka samodejno očisti s curkom vroče pare, posebne UV-svetilke pa poskrbijo še za dodatno protimikrobno delovanje. Zunanost mlekomata je opremljena s posebnim ventilatorjem, ki odganja morebitni mrčes, ki bi se sicer lahko nahajal v bližini mlekomata (Mlekomati, 2012).



Slika 1: Zgradba mlekomata (Pensilina, 2011)

Slika 1 prikazuje glavne sestavne dele mlekomata, ki so:

- hladilnik s kompresorjem, rezervoarjem in dozirno enoto (1),
- krmilni in programski sistem s procesnim krmilnikom (2),
- plačilni del s prikazovalniki in tipkami, ki je osvetljen (3),
- avtomat za plastenke in steklenice (4).

2.2 MLEKO

Z izrazom mleko navadno označujemo kravje mleko, medtem ko je potrebno druge vrste mleka posebej poimenovati kot na primer kozje mleko, ovčje mleko, kobilje mleko, humano mleko. Mleko je nespremenjen proizvod mlečne žleze, pridobljen s popolno, redno in

neprekinjeno molžo zdrave in pravilno krmljene ene ali večih krav, namenjeno neposredni porabi v obliki konzumnega mleka ali nadaljnji predelavi v mlečne izdelke. Izraz mleko uporabljamo za surovo mleko in tudi za predpakirano mleko za pitje, ki je toplotno obdelano (Bajt in Golc-Teger, 2002; Pravilnik o uporabi izraza..., 2001).

Surovo mleko je izloček mlečnih žlez mlečnih živali na primer krav, ovc, koz ali bivolic, ki ni bilo segreto na več kot 40 °C (Pravilnik o uporabi izraza..., 2001). Mleko je kompleksna biološka tekočina, ki nudi odlične razmere za rast različnih mikroorganizmov, njegova vrednost pH je blizu nevtralne točke, ima pestro biokemijsko sestavo in visoko vsebnost vode. Način pridobivanja mleka je takšen, da okužbe mleka z mikroorganizmi praktično ne moremo preprečiti, zato je število mikroorganizmov v mleku pomemben dejavnik, ki vpliva na njegovo kakovost. Število in vrsta mikroorganizmov, ki se nahajajo v mleku takoj po molži so odvisni od različnih dejavnikov kot so higiena živali in mlekarske opreme, sezona, krma in zdravstveno stanje živali (Rogelj, 2003).

2.2.1 Sestava mleka

Mleko sestavlja okoli 87 % vode in 13 % suhe snovi. Suha snov so vse sestavine mleka brez vode in plinov in so porazdeljene v treh oblikah (Mavrin in Oštir, 2002):

1. emulzija: voda in maščoba
2. koloidna raztopina: voda in kazeinske micidele
3. prava raztopina: voda in laktoza, minerali, v vodi topni vitamini, serumske beljakovine

Preglednica 1: Kemijska sestava mleka (Mavrin in Oštir, 2002: 30)

Sestavina	Delež (%)
Maščoba	3,2 – 5,5
Beljakovine	2,6 – 4,2
Laktoza	4,6 – 4,9
Minerali	0,6 – 0,9
Suha snov	11 – 14
Voda	86 – 89

S pomočjo sodobnih kemijskih postopkov je danes v mleku določenih več kot 200 različnih sestavin, katerih deleži lahko zelo variirajo, saj so odvisni od mnogih dejavnikov: starosti in pasme živali, sestave in količine krme, laktacijskega obdobja in zdravstvene kondicije živali. Vse to pa močno otežuje proučevanje mleka in šele z analiziranjem velikega števila vzorcev

dobimo osnovno sliko kemijske sestave mleka (Preglednica 1). Poleg navedenih glavnih sestavin vsebuje mleko tudi majhne količine vitaminov, encimov, prostih kislin, plinov, barvil in aromatičnih spojin (Mavrin in Oštir, 2002).

2.2.2 Dejavniki oblikovanja mikrobiote surovega mleka

Prireja mleka poteka v različnih podnebnih, higienskih in tehnoloških pogojih, kar neposredno vpliva tako na začetno število mikroorganizmov kot na sestavo mikrobne populacije. Ne glede na različne pogoje prireje pa so glavni dejavniki, ki največ doprinesejo k oblikovanju mikrobiote surovega mleka, vedno trije: notranjost mlečne žleze in seskov, zunanost vimena in seskov, ter molzni stroj in vsa mlekarska oprema. Poleg naštetih glavnih virov okužbe so lahko vir okužbe tudi insekti, voda, zrak, krma ter ljudje, ki rokujejo z mlekom (Rogelj, 2003).

Mikrobioto mleka ločimo na primarno in sekundarno. Primarno ali začetno mikrobioto mleka predstavlja vrsta in število mikroorganizmov, ki so prisotni v mleku neposredno po molži. Sekundarno mikrobioto pa imenujemo mikrobioto, ki je prisotna v mleku pri prevzemu mleka s farme, torej po potovanju mleka skozi molzni sistem v bazen in skladiščenju v njem. Sestava in velikost sekundarne mikrobiote sta odvisni od higiene molznih strojev, mlekovodov in hladilnega bazena, od hitrosti in temperature hlajenja po molži, dolžine skladiščenja ter od števila in vrste primarne mikrobiote mleka. Da preprečimo hitro razmnoževanje primarne mikrobiote, mleko čim hitreje ohladimo na končno temperaturo hlajenja. Za optimizacijo postopka moramo takoj po molži, v dveh urah, ohladiti mleko na temperaturo 4 °C ali nižjo in ga nato pri tej temperaturi skladiščimo (Rogelj, 2003).

Mleko bi moralo biti, v trenutku ko pride iz vimena, sterilno, vendar pa temu ni tako. Kljub temu, da vzdržujemo najvišjo možno stopnjo higiene, ni mogoče proizvesti mleka brez mikroorganizmov. Mleko je namreč, zaradi svoje sestave, odlično gojišče za razvoj številnih vrst mikroorganizmov. Mikroorganizmi prispejo v vime skozi odprtine v seskih, se razmnožujejo v mlečni žlezi in tako postanejo primarna mikrobiota mleka. Že v sveže namolzenem mleku zdravih krav lahko najdemo nekaj sto ali več tisoč mikroorganizmov v ml mleka (Mihovec, 2006).

2.3 KEMIJSKA KAKOVOST MLEKA

Kemijsko kakovost včasih povezujemo s prehransko vrednostjo, razumemo pa jo kot sestavo mleka v najširšem smislu in zajema vsebnost vseh glavnih sestavin mleka: maščobe,

beljakovine, minerali in laktoza. Poleg glavnih sestavin spadajo v to kategorijo tudi posamezni vitamini, težke kovine in ostale sestavine mleka (Čanžek Majhenič in sod., 2007).

2.3.1 Mlečna maščoba

Mlečna maščoba vpliva na konsistenco mleka in je nosilec vonja in okusa mleka. Takoj po molži, ko je mleko še toplo (ima okoli 37 °C), so maščobne kapljice v njem v obliki emulzije. Med hlajenjem se kapljice spreminjajo v maščobne kroglice, iz emulzije pa nastaja suspenzija. Kroglice so obdane z ovojnico iz različnih sestavin, tudi iz beljakovin. Ker imajo kroglice manjšo gostoto, se med mirovanjem mleka dvigujejo na površino mleka in tvorijo plast smetane (Bajt in Golc-Teger, 2002).

Tudi energijsko najbogatejša sestavina v mleku je mlečna maščoba, ki jo strokovno imenujemo lipidi. Sestavljajo jo trigliceridi (estri glicerola in maščobnih kislin), fosfolipidi, steroli, karotenoidi in lipofilni vitamini A, D, E in K. Poleg teh pa najdemo v mleku tudi proste maščobne kisline in glicerol (Mavrin in Oštir, 2002).

V svežem mleku je povprečno 3,8 % mlečne maščobe, njen delež pa niha od 2,5 do 6 %. Količino maščobe v konzumnem mleku lahko uravnavamo s postopkom tipizacije skladno z željami potrošnikov oziroma trga, pri proizvodnji sira pa glede na delež beljakovin v mleku in vrsto sira, ki ga želimo izdelati (Mavrin in Oštir, 2002).

Za rutinsko določanje vsebnosti maščobe v mleku uporabljamo metodo po Gerberju. Metoda je uporabna za vse vrste surovega ali pasteriziranega mleka, z modifikacijo pa je uporabna tudi za konzervirano, homogenizirano, delno sterilizirano in UHT mleko ter za posneto mleko. Metoda po Gerberju deluje na principu separacije maščobe mleka v butirometru s centrifugiranjem po raztopitvi beljakovin z žvepleno kislino, separacija pa lažje poteče ob dodatku majhne količine amilnega alkohola. Sama metoda je empirični postopek, za oceno vsebnosti maščobe v 100 g ali 100 ml mleka, odvisno od uporabljenega volumna pipete za mleko (Čanžek Majhenič in sod., 2007).

2.4 FIZIKALNA KAKOVOST MLEKA

Fizikalna kakovost mleka združuje fizikalne lastnosti mleka, kot so gostota, kislinska stopnja, zmrziščna točka in vrednost pH (Čanžek Majhenič in sod., 2007).

2.4.1 Kislinska stopnja mleka

Mleko je živilo, ki ima rahlo kisel značaj zaradi sestavin mleka in mikrobiološkega delovanja. Poznamo dve vrsti kislosti in sicer naravno kislost svežega mleka ter naknadno kislost mleka. K naravni kislosti mleka prispevajo predvsem njegove sestavine kot so kazeini, fosfati, citrati, albumini, globulini in CO₂ (Carić in sod., 2000), medtem ko je razvoj naknadne kislosti mleka posledica mikrobiološke razgradnje laktoze predvsem v mlečno in druge kisline (Mavrin in Oštir, 2002).

Splošno uveljavljena in rutinska metoda za ugotavljanje kislosti mleka je titracijska metoda po Soxhlet-Henkle (Methodenbuch, 2000). Pod kislinsko stopnjo razumemo število porabljenih mililitrov 0,25-molarne raztopine NaOH, ki so potrebni, da pri titraciji 100 ml mleka in dodatku barvnega indikatorja fenolftaleina, dosežemo standardno barvo primerjalnega vzorca. Enoto kislinske stopnje po Soxhlet-Henkle (1 ml 0,25 M NaOH) označujemo kot SH. Titracijska kislost svežega mleka se običajno giblje od 6,2 do 7,5 SH, odvisna pa je od sestave in puferske kapacitete mleka (Mavrin in Oštir, 2002).

2.5 HIGIENSKA KAKOVOST MLEKA

V sklopu higienske kakovosti mleka pa opisujemo mikrobiološko kakovost, število somatskih celic in zaviralnih snovi.

2.5.1 Zaviralne snovi v mleku

Zaviralne ali inhibitorne snovi so snovi, ki v mleku zavirajo ali upočasnjujejo delovanje mikroorganizmov. Imenujemo jih tudi protimikrobne snovi. V mleku ločimo naravne ali nativne protimikrobne snovi ter tuje protimikrobne snovi (Mavrin in Oštir, 2002).

Od zaviralnih snovi v mleku nas predvsem zanima prisotnost tujih zaviralnih snovi, ki v sodobnem mlekarstvu predstavljajo velik problem, saj povzročajo težave pri proizvodnji mlečnih izdelkov, kjer ovirajo normalen potek mlečnokislinske fermentacije, na primer pri fermentiranem mleku in smetani ter sirih. Najpogostejše tuje zaviralne snovi, ki jih najdemo v mleku, so (Mavrin in Oštir, 2002):

- antibiotiki, ki jih uporabljajo za zdravljenje krav molznic,
- detergenti, ki ostanejo pri nezadostnem spiranju molzne in strojne opreme,

- dezinfekcijska sredstva, ki jih uporabljajo za dezinfekcijo molzne in strojne opreme in jih ne sperejo dovolj,
- fungicidi in herbicidi, ki ostanejo v krmi,
- insekticidi, ki jih uporabljajo v hlevu in pri krmi za zatiranje mrčesa.

2.5.2 Mikrobiološka kakovost mleka

Pri opisovanju mikrobiološke kakovosti mleka razlikujemo dve kategoriji in sicer skupno število mikroorganizmov, kjer določamo vse mikroorganizme, ki so prisotni v mleku ter prisotnost oziroma odsotnost različnih patogenih mikroorganizmov. Skupno število mikroorganizmov nam pokaže, kakšna je higiena pri prireji, pri rokovanju z mlekom, skladiščenju in transportu mleka, ter učinkovitost hlajenja. Prisotnost patogenih mikroorganizmov pa odraža higieno in zdravstveno stanje živali in ljudi, ki so z mlekom v kontaktu (Čanžek Majhenič in sod., 2007).

2.5.2.1 Skupno število mikroorganizmov

Skupno število mikroorganizmov (SŠMO) v surovem mleku se lahko giblje od manj kot 1.000 v mililitru, ko je okužba med molžo minimalna, pa do več kot 10^6 KE/ml ob močni okužbi. Od skupnega števila mikroorganizmov predstavljajo večino bakterije (Rogelj, 2003).

2.5.2.1.1 Standardna metoda določanja skupnega števila mikroorganizmov

Standardna metoda določanja SŠMO sloni na cepljenju mleka na hranljivo gojišče in po inkubaciji, štetju izraslih kolonij, ki jih izražamo kot število kolonijskih enot v ml mleka (KE/ml). SŠMO že nekaj časa določa higiensko kakovost surovega mleka, saj je zelo dober indikator bakteriološke okužbe med pridobivanjem mleka. Majhno število mikroorganizmov v surovem mleku je znak dobre prireje, veliko skupno število mikroorganizmov, ki presega 100.000 KE v ml mleka, pa je znak zelo slabe higiene. V mlekarstvo razvitih deželah je zgornja meja higiensko sprejemljivega mleka 100.000 KE/ml (Rogelj, 2003).

2.5.2.1.2 Avtomatizirana metoda določanja SŠMO z BactoScan-om

BactoScan je naprava za avtomatsko, direktno štetje posameznih bakterijskih celic v vzorcu mleka in temelji na epifluorescenčni mikroskopiji. Avtomatizirana metoda ima pred klasično kar nekaj prednosti in sicer dobimo rezultat skupnega števila bakterij že v nekaj minutah,

poleg tega pa analiza ne zahteva priprave hranljivih gojišč ter 72-urne inkubacije. Zelo pomembna razlika med metodama je tudi v načinu štetja: pri metodi določanja skupnega števila bakterij s štetjem na petrijevih ploščah štejemo vse tiste bakterije, ki na predpisanem gojišču v predpisanem času in pri predpisani temperaturi inkubacije, v aerobnih pogojih, tvorijo vidne kolonije. Tako imajo bakterijske vrste, ki v predpisanih pogojih uspešno zrastejo prednost pred tistimi vrstami bakterij, ki jim taki pogoji rasti ne ustrezajo oziroma je njihova rast izredno šibka in so izrasle kolonije premajhne, da bi jih lahko prešteli. Poleg tega se pogosto zgodi, da zraste ena kolonija iz večih bakterij, ki se nahajajo v skupkih oziroma kratkih verižicah. Posledica tega je, da tako kolonijo na petrijevi plošči preštejemo kot eno bakterijo, medtem ko BactoScan tak skupek bakterij razbije na posamezne bakterije in tako prešteje vse bakterije skupka oziroma verižice. Zato je metoda ugotavljanja skupnega števila bakterij z BactoScan-om načeloma bolj natančna analiza kot metoda štetja na petrijevih ploščah.

Bactoscan dela na principu kontinuirane epifluorescentne mikroskopije, kjer genski material bakterijskih celic obarvamo s fluorescentnim barvilom akridin oranžnim in jih prenesemo v tankem sloju na rotirajoči disk, ki je nameščen pod objektivom mikroskopa. Naneseni vzorec je obsevan z modro svetlobo ksenonove žarnice, kar vzbudi obarvane bakterije, da fluorescirajo rdeče-oranžno svetlobo. Fotometer zazna in pretvori fluorescenco v električni signal, ki ga beleži elektronski števec. Vsak svetlobni signal pomeni eno bakterijo (Mihovec, 2006). Po slovenski zakonodaji v surovem mleku, ki je namenjeno neposredno prehrani ljudi, ne sme biti več kot 50.000 mikroorganizmov v ml mleka (Rogelj, 2003).

Določanje skupnega števila bakterij v mleku je pomemben parameter, saj je bakteriološka kakovost mleka eden od osnovnih parametrov za plačevanje mleka.

Preglednica 2: Kakovostni razredi mleka (Mavrin in Oštir, 2002: 56)

Razred	SŠMO v 1 ml mleka	Opombe
E (ekstra)	do 50.000	odlično
1.	50.001 do 100.000	ustrezno
2.	100.001 do 400.000	še sprejmejo v mlekarno
3.	400.001 do 800.000	pogojno sprejmejo
4.	nad 800.000	ne sprejmejo

Glede na skupno število mikroorganizmov v 1 ml mleka, razdelimo mleko na pet kakovostnih razredov (Preglednica 2). V najboljšem, E razredu, je mleko odlične kakovosti in vsebuje manj kot 50.000 KE/ml mleka, v najslabšem, 4. kakovostnem razredu, pa mleka ne sprejmejo

v mlekarno, zaradi prevelikega števila mikroorganizmov, nad 800.000 KE/ml.

2.5.2.2 Koliformne bakterije

Najboljši pokazatelj higienskih pogojev v celotni proizvodni verigi je število koliformnih mikroorganizmov. Surovo mleko vsebuje manj kot 100 koliformnih bakterij na ml mleka, če so higienski pogoji pridobivanja, transporta in skladiščenja mleka dobri. Ob velikem začetnem številu mikroorganizmov, ob temperaturi nad 5 °C in podaljšanem času skladiščenja pa se stopnja njihovega razmnoževanja zelo poveča. Prisotnost koliformnih mikroorganizmov v mleku ni nujno znak fekalne okužbe ali posledica neustrezne higiene vimena in seska med molžo, zelo radi se razmnožujejo v vlagi in ostankih mleka v molznem stroju in na mlekarski opremi (Rogelj, 2003).

Koliformne bakterije so gram negativne, nesporogene palčke, ki so aerobi ali fakultativni anaerobi. Dobro rastejo ob prisotnosti žolčnih soli ali drugih, površinsko aktivnih snovi s podobnimi inhibitornimi lastnostmi, pri temperaturi 37 °C. Za njih pa je značilno, da fermentirajo laktozo do kisline in plina (Rogelj, 2003).

Najpogosteje uporabljeno gojišče za določanje koliformnih mikroorganizmov je vijolično rdeči žolčni laktozni agar (gojišče VRBL). VRBL je selektivno in diferencialno gojišče, zasnovano za izolacijo in štetje koliformnih mikroorganizmov v mleku. V gojišču so prisotne žolčne soli in barvilo kristal vijolično, ki zavirata rast po Gramu pozitivnih bakterij. Gojišče vsebuje tudi barvilo nevtral rdeče, ki omogoča razlikovanje med organizmi, ki fermentirajo in ne fermentirajo laktoze. Mikroorganizmi, ki fermentirajo laktozo, tvorijo kislino, kar pa povzroči spremembo barve indikatorja in precipitacijo žolčnih soli (Bajt in sod., 1998).

2.5.2.3 Bakterijska vrsta *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je eden najpogostejših povzročiteljev bovinega mastitisa oziroma vnetja mlečne žleze, spada pa med tiste mikroorganizme, ki so patogeni za človeka. Je močno razširjena bakterija v mlečnih čredah, njen izvor pa je okužena in vneta mlečna žleza. Med molžo se hitro prenaša med vimenskimi četrtmi in tudi med kravami. Kot posledica mastičnih obolenj je kar 20 do 40 % surovega mleka okuženega s to bakterijo. Mleko okužene četrti lahko vsebuje tudi do 10^6 KE *Sta. aureus* v mililitru mleka (Rogelj, 2003).

Določanje prisotnosti vrste *Sta. aureus* in drugih koagulaza pozitivnih stafilokokov temelji na osamitvi mikroorganizmov s pomočjo gojišča Baird Parker (BP), obogatenim z dodatkom

kunčje plazme in fibrinogena (RPF). Po inkubaciji zrastejo na gojišču kolonije koagulaza pozitivnih stafilokokov, ki so obdane s cono precipitacije (Bajt in sod., 1998).

Najpomembnejši povzročitelji mastitisa so predstavniki vrste *Sta. aureus*. V živila najpogosteje zaidejo s kože ali sluznice živali, lahko tudi z molznika ob slabi osebni higieni, učinkovito rast pa jim omogoča neprimerno hlajenje. So po Gramu pozitivni, fakultativno anaerobni koki, ki reducirajo nitrite v nitrate. Optimalni pogoji za njihovo razmnoževanje so pri temperaturi 30 °C do 37 °C in vrednosti pH od 4,2 do 9,3 (Rogelj, 2003).

V smernicah, ki so jih pripravili na Inštitutu za varovanje zdravja republike Slovenije, za koagulaza pozitivne stafilokoke in *Staphylococcus aureus* velja, da je v surovem mleku, namenjenem uživanju brez predhodne toplotne obdelave, mejna vrednost, pod katero se vsi rezultati štejejo kot zadovoljivi 10^2 KE/ml. Mejna dopustna vrednost, nad katero se rezultati ne štejejo več za zadovoljive, pa je 5×10^4 KE/ml (Smernice ..., 2009).

2.5.2.4 Somatske celice

Število somatskih celic (ŠSC) je eden osnovnih parametrov ocenjevanja kakovosti mleka, ki ga upoštevamo pri oblikovanju odkupne cene mleka, poleg tega pa je določevanje somatskih celic metoda za odkrivanje mastitisa. Telesne ali somatske celice so osnovni elementi vseh telesnih tkiv in organov, ki se redno obnavljajo in so mikroskopsko majhne. V mleku predstavljajo izrabljene epitelne celice tkiv vimena in levkocite (Bajt in sod., 1998).

V enem mililitru mleka ne sme biti več kakor 400.000 somatskih celic, da lahko mleko uvrstimo v prvi ali ekstra (E) kakovostni razred. Mleko, ki vsebuje od 400.000 do 600.000 somatskih celic v enem mililitru mleka je drugi kakovostni razred, medtem ko mleko z več kot 600.000 somatskih celic ne more biti razvrščeno višje kot v tretji kakovostni razred (Mavrin in Oštir, 2002).

Avtomatsko štetje somatskih celic v mleku poteka na principu fluoro-opto-elektronskega štetja. Somatske celice so definirane kot vse tiste celice, ki po obarvanju jedrne DNK s fluorescenčnim barvilom in pod vplivom obsevanja s ksenonovo žarnico, oddajajo svetlobo. Svetlobni signali se pretvorijo v elektronske signale, ki jih foto-diodni sistem v instrumentu šteje avtomatsko. Rezultat na zaslonu je število somatskih celic v tisočih na mililiter mleka (Bajt in sod., 1998).

2.6 NADZOR KAKOVOSTI MLEKA V MLEKOMATIH

Nadzor kakovosti mleka v mlekomatih je vzpostavljen na dveh nivojih. Za prvi nivo mora poskrbeti lastnik mlekomata oz. nosilec dejavnosti sam. Vzpostaviti mora notranji nadzor, ki temelji na načelih sistema HACCP. HACCP je preventivni sistem, ki omogoča nadzor nad dejavniki, ki bi lahko ogrožali zdravje ljudi, v vseh fazah pridelave, predelave in prodaje živil. Za drugi nivo, uradni nadzor nad kakovostjo mleka in ustreznost upravljanja mlekomata, pa skrbi veterinarska uprava. Nadzor vključuje nenapovedane odvzeme vzorcev mleka ter pregled kontrolnih kartic, ki jim omogočajo vpogled v stanje mlekomata za mesec dni nazaj (Mlekomat, 2010).

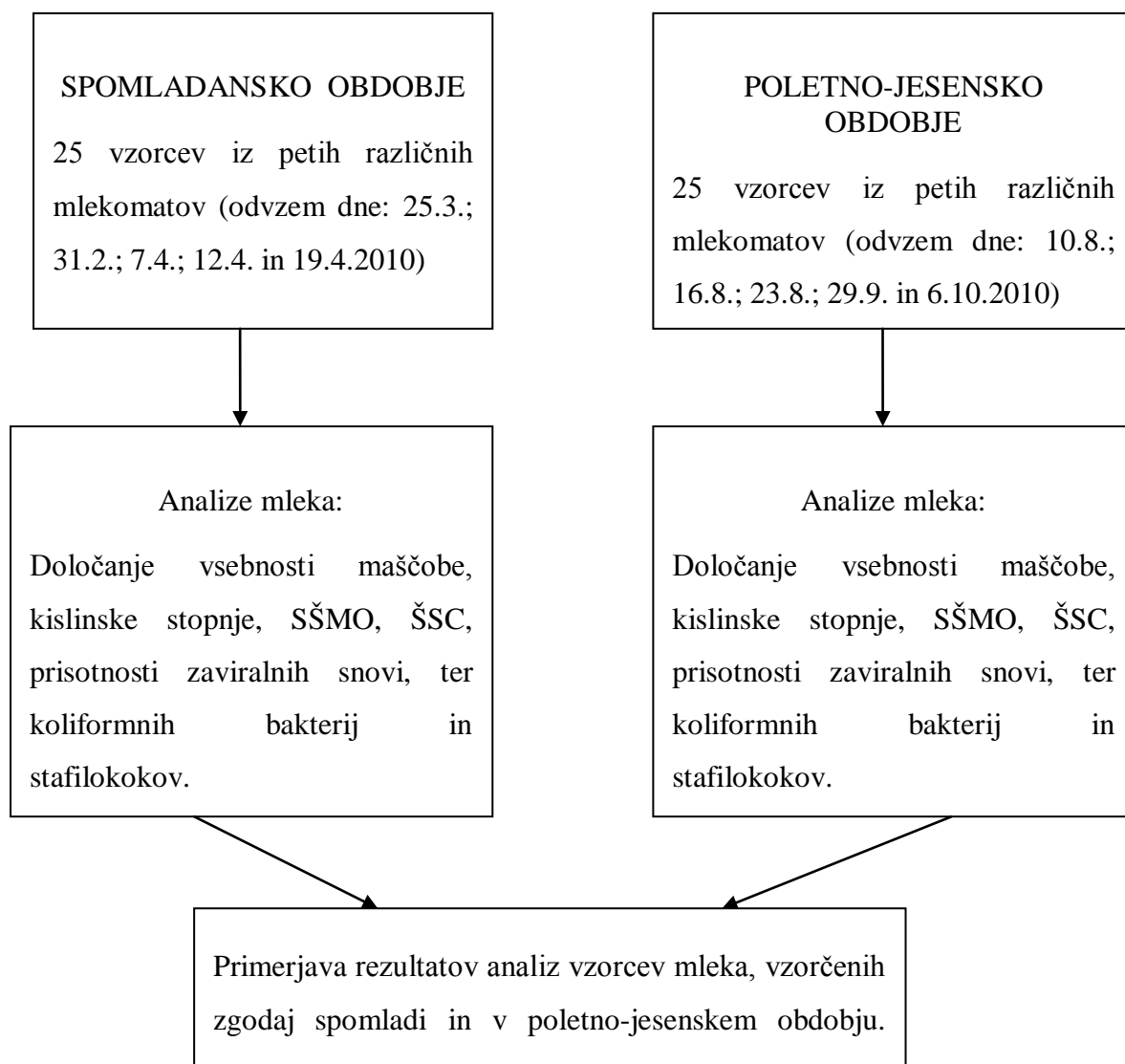
Lastnik mora redno nositi vzorce mleka iz mlekomata v pooblaščen laboratorij na analize, kjer preverjajo število somatskih celic, SŠMO ter vsebnost maščob in beljakovin. V Sloveniji je registriranih skoraj 100 mlekomatov. Veterinarska uprava je od aprila 2010, ko je prevzela nadzor nad mlekomati, opravila analize vzorcev mleka iz 61-ih mlekomatov. Ker je pri nekaterih od teh vzorcev odkrila nepravilnosti, je izdala opozorila.

Mleko ni le pomembno živilo ter sestavni del zdrave in uravnotežene prehrane ljudi, ampak je zaradi svoje bogate sestave tudi izvrsten rastni medij za različne mikroorganizme, tako tehnološko pozitivne kot tudi kvarljivce ali celo patogene bakterije. Slednje, med katere prištevamo tudi stafilokoke, listerije, salmonelle in druge, so zdravju škodljive, zato uživanje surovega mleka odsvetujejo predvsem bolj občutljivim skupinam ljudi, med katere sodijo nosečnice, novorojenčki, starejši ljudje in ljudje z zmanjšano imunsko odpornostjo.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS POSKUSA IN NAČRT DELA

V poskusu smo analizirali mleko, odvzeto iz petih, naključno izbranih mlekomatov. Mleko smo vzorčili enkrat tedensko, pet tednov zapored in sicer v dveh različnih obdobjih leta 2010, zgodaj spomladi in v poletno-jesenskem obdobju (Slika 2). Odvzetim vzorcem mleka smo v okviru kemijske kakovosti določevali vsebnost maščobe, v okviru fizikalne kakovosti kislinsko stopnjo, medtem ko smo v okviru higienske kakovosti določali skupno število mikroorganizmov, število somatskih celic ter morebitno prisotnost koliformnih mikroorganizmov, stafilokokov in zaviralnih snovi.



Slika 2: Načrt dela diplomske naloge

3.2 MATERIAL

3.2.1 Vzorci mleka iz mlekomatov

Mleko iz mlekomatov smo vzorčili v plastenke, ki smo jih kupili na avtomatu za embalažo pri mlekomatu (Slika 3). Tako odvzeto mleko smo v hladilni torbi čim hitreje prenesli do Inštituta za mlekarstvo in probiotike na Biotehniški fakulteti v Domžalah, kjer smo takoj začeli z analizami.



Slika 3: Vzorčeno mleko v plastenkah (Foto B. Špalir)

3.2.2 Reagenti za določanje vsebnosti maščobe

- Žveplena kislina H_2SO_4 (Merck, Darmstadt, Nemčija, kat. št. 112080)
- Amilni alkohol (Merck, kat. št. 1.00978.1000)

3.2.3 Reagenti za določanje kislinske stopnje

- Raztopina 0,25 M NaOH (Merck, kat. št. 1.06498)
- 2 % alkoholna raztopina fenolftaleina v 96 % etanolu (Merck, kat. št. 7754)
- 5 % vodna raztopina kobaltovega sulfata ($CoSO_4 \times 7H_2O$) (Merck, kat. št. 1.02556)

3.2.4 Komplet za določanje zaviralnih snovi

Za določanje zaviralnih snovi v mleku smo uporabili komercialen komplet Delvotest[®] SP-NT/ SP MINI-NT (DSM Food Specialties, Delft, Nizozemska, kat. št. 8609.0409.3). Komplet vsebuje ampule s trdnim gojiščem, ki vsebuje spore bakterij *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in hranila za rast ter barvni indikator bromkrezol škrlatno.

3.2.5 Gojišča, raztopine za razredčevanje in dodatki

3.2.5.1 Trdno gojišče VRBL

Trdno gojišče Violet Red Bile Lactose (VRBL; Merck, kat. št. 1.01406.05000) smo uporabili za določanje števila koliformnih mikroorganizmov. Po navodilih proizvajalca (Merck) smo zatehtali 39,5 g gojišča, ga raztopili v 1000 ml destilirane vode ter segrevali toliko časa, da se je popolnoma raztopilo.

3.2.5.2 Trdno gojišče PCA

Trdno gojišče Plate-Count-Agar (PCA) smo uporabili za določanje skupnega števila mikroorganizmov v vzorcih mleka. 22,5 g gojišča (Merck, kat. št. 1.05463.0500) smo raztopili v 1000 ml destilirane vode in mu dodali 0,1 % posnetega mleka v prahu (Merck, kat. št. 1.15363.0500). Tako pripravljeno gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.2.5.3 Trdno gojišče BP z dodatkom kunčje plazme in fibrinogena

Trdno gojišče Baird Parker (BP) smo uporabili za določanje števila koagulaza pozitivnih stafilokokov (*Sta. aureus* in sorodnih vrst). V 1000 ml destilirane vode smo odtehtali in raztopili 58 g gojišča BP (Biolife, Italija, Milano, kat. št. 4011162) ter ga 15 minut avtoklavirali pri 121 °C.

3.2.5.4 Kunčja plazma in fibrinogen (Rabbit Plasma Fibrinogen = RPF)

Suplement RPF je sestavljen iz fibrinogena (380 mg), tripsin inhibitorja (1,5 mg) in kunčje plazme (3,0 ml). RPF (Biolife, kat. št. 423101) smo v aseptičnih pogojih raztopili v 50 ml sterilne destilirane vode in ga primešali k 150 ml avtoklaviranega in na 45-50 °C ohlajenega gojišča BP. Tako pripravljeno gojišče smo dobro premešali in takoj uporabili za analizo, da ne bi prišlo do precipitacije fibrinogena.

3.2.5.5 Ringerjeva raztopina ¼ jakosti

Za razredčevanje vzorcev mleka smo pri mikrobioloških metodah (razredčevanje po Kochu) uporabili Ringerjevo raztopino ¼ jakosti, ki smo jo pripravili skladno z navodili proizvajalca (Merck) s pomočjo Ringerjevih tablet (Merck, kat. št. 1.5525.0001). Po 9,3 ml Ringerjeve raztopine smo prenesli v epruvete in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

3.2.6 Laboratorijska oprema

- avtoklav (Kambič, Slovenija),
- mikrovalovna pečica (Bosch, Nemčija),
- tehtnica (EB 300 M Mettler Toledo, Švica),
- magnetno mešalo (Tehtnica, Slovenija),
- centrifuga (Gerber, Funke) za določanje vsebnosti maščobe, 350 ± 50 g ogrevana na temperaturo 50 do 60 °C,
- umerjeni butirometri (mednarodni standard ISO 488) z ustreznimi zamaški,
- pipeta za mleko, posamezno graduirana, trebušasta, označen volumen v ml,
- avtomatska pipeta, sterilni nastavki,
- vodna kopel za butirometre, naravnana na 65 ± 2 °C,
- termometer,
- stojalo za butirometre,
- bireta,
- pipete 50 ml, 2 ml in 1 ml,
- erlenmajerice,
- plinski gorilnik,
- mehanski stresalnik (Tehtnica, Slovenija),
- sterilne petrijeve plošče,
- sterilne epruvete z zamaški,
- števec kolonij EŠKO (Labo, Slovenija),

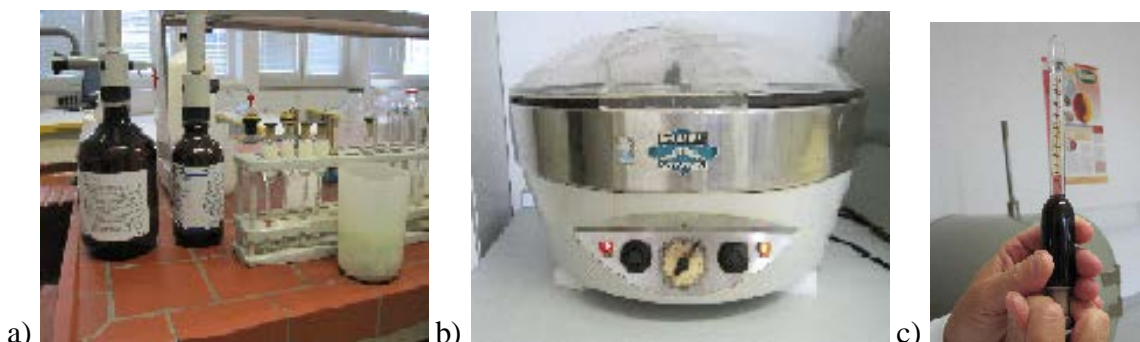
- birete za titracijo,
- hladilnik (LTH, Slovenija),
- inkubatorji (Labo, Slovenija).

3.3 METODE

3.3.1 Določanje vsebnosti mlečne maščobe

Vsebnost mlečne maščobe smo določali z butirometrično metodo po Gerberju (ISO 2446). Metoda temelji na obdelavi mleka z žvepleno kislino, pri čemer razgradimo beljakovinski ovoj, ki obdaja maščobne kroglice. Sproščeno maščobo v butirometrih centrifugiramo, dodatek amilnega alkohola pa olajša izločanje maščobe in vzpostavi ostro mejo med maščobo ter kislino in preostankom mleka. Količino izločene maščobe odčitamo na skali butirometra, ki je umerjena za direkten odčitek vrednosti maščobe v masnih odstotkih.

Vzorci mleka smo s počasnim obračanjem plastenk najprej previdno premešali, da ni prišlo do penjenja, a da smo dosegli enakomerno porazdelitev maščobe. V čist in suh butirometer smo nato nalili 10 ml žveplove (VI) kisline, dodali 11 ml mleka, ki smo ga počasi, pod kotom 45°, spustili v butirometer in pri tem pazili, da se ni zmešalo z žveplovo kislino. Pazljivo smo dodali še 1 ml amilnega alkohola, butirometre zamašili, jih stresali do učinkovitega premešanja sestavin ter centrifugirali. Po 5-minutnem centrifugiranju pri 1100 obratih na minuto smo vsebnost maščobe direktno odčitali na skali butirometra (Slika 4).



Slika 4: a) vzorci mleka v butirometrih; b) centrifuga; c) odčitavanje vsebnosti maščobe s skale butirometra (Foto A. Čanžek Majhenič)

3.3.2 Določanje kislinske stopnje mleka

Za določanje kislinske stopnje mleka uporabljamo titracijsko metodo po Soxhlet-Henklu (Methodenbuch, 2000). Kislinska stopnja nam pove porabo 0,25 M NaOH, ki jih potrebujemo za titracijo 100 ml mleka, da ob dodatku barvnega indikatorja fenolftaleina kot indikatorja dosežemo standardno barvo primerjalnega vzorca. Primerjalni vzorec pripravimo z dodatkom kobaltovega sulfata v mleko. Pri titraciji z 0,25 M NaOH, ki predstavlja premik vrednosti pH, zajamemo proste kisline kot tudi kisle oziroma puferske soli in kisle skupine beljakovin. Pri analizi smo najprej pripravili standardno barvo tako, da smo v čašo odpipetirali 50 ml mleka in mu dodali 1 ml kobaltovega sulfata. Za titracijo smo odpipetirali 50 ml mleka in mu dodali 2 ml barvnega indikatorja fenolftaleina (Slika 5). Med stalnim mešanjem smo vzorec titrirali z 0,25 M NaOH do rožnate barve standarda. Kislinsko stopnjo posameznega vzorca mleka smo izračunali iz števila porabljenih ml 0,25 M NaOH, ki smo jih pomnožili z 2, ter rezultat izrazili v enotah SH. Po pravilniku (Pravilnik o kakovosti mleka..., 1993) je dovoljena kislinska stopnja za sveže surovo mleko do 7,2 SH.



Slika 5: Priprava vzorcev mleka za določevanje kislinske stopnje (Foto A. Čanžek Majhenič)

3.3.3 Določanje števila somatskih celic

Za določanje števila somatskih celic v vzorcih mleka iz mlekomatov smo uporabili referenčno avtomatizirano metodo, ki deluje na principu fluorescenčne mikroskopije (ISO 13366-2). Premešane vzorce mleka postavimo na tekoči trak aparata fossomatic. Aparat avtomatsko odpipetira vzorec mleka in ga zmeša z raztopino pufru in raztopino barvila (etidijev bromid). Pripravljeno mešanico mleka in reagentov nato aparatúra v obliki tankega filma nanese na rotirajoči disk, ki predstavlja objektno steklo za mikroskopiranje. Jedra somatskih celic se obarvajo s fluorescenčnim barvilom etidijevim bromidom in nastane fluorescenčen kompleks, ki ob obsevanju s ksenonovo žarnico oddaja svetlobo. Vsaka obarvana celica, ki jo mikroskop zazna, povzroči električni impulz, ki se ojači in avtomatsko zabeleži. Število somatskih celic je direkten odčitek v tisočih na mililiter mleka.

3.3.4 Določanje posameznih skupin mikroorganizmov s štetjem na petrijevih ploščah

Vzorci mleka iz mlekomatov smo za mikrobiološke analize pripravili v aseptičnih pogojih, skladno s standardom ISO 6887-5.



Slika 6: Razredčitve vzorcev mleka in petrijeve plošče, prelite z gojiščem (Foto B. Špalir)

Mleko smo najprej premešali in po 1 ml prenesli v 9 ml Ringerjeve raztopine $\frac{1}{4}$ jakosti ter tako dobili razredčitev 10^{-1} . Z metodo po Kochu smo nadaljevali z razredčevanjem in vzorce razredčili do primernih razredčitev (Slika 6). Izhodiščni vzorec mleka iz mlekomatov in izbrane razredčitve smo cepili na trdna gojišča VRBL, BP+RPF in PCA ter inkubirali v pogojih, ustreznih za posamezno skupino mikroorganizmov (Preglednica 3).

Preglednica 3: Pogoji inkubacije, uporabljeni za posamezno skupino mikroorganizmov

Mikroorganizmi	Gojišče	Temperatura	Čas
SŠMO	PCA	30 ± 1 °C	72 ur \pm 3 ure
Koliformne bakterije	VRBL	30 ± 1 °C	24 ur \pm 2 uri
<i>Staphylococcus</i> ssp.	BP+RPF	37 °C	24 ur \pm 2 uri

Skupno število mikroorganizmov, s štetjem na petrijevih ploščah, smo v vzorcih mleka določali skladno s standardom ISO 4833. Po 1 ml izbranih razredčitev smo prenesli na petrijeve plošče, ter jih prelili z raztopljenim in primerno ohlajenim (45 ± 2 °C) gojiščem PCA z dodatkom mleka v prahu. Po inkubaciji smo prešteli vse kolonije na števni ploščah.

Koliformne mikroorganizme smo v vzorcih mleka določali po navodilih standarda ISO 4832. Po 1 ml izbranih razredčitev smo prenesli na petrijeve plošče, ter jih prelili z raztopljenim in primerno ohlajenim (45 ± 2 °C) gojiščem VRBL (Slika 7). Ko se je gojišče z vmešanim vzorcem strdilo, smo čez prelili še tanek sloj istega gojišča in pustili da se strdi. Po inkubaciji smo prešteli koliformne mikroorganizme, ki tvorijo značilne temno rdeče kolonije, premera 1 - 2 mm in so obdani z rdečkasto precipitacijsko cono.



Slika 7: Razredčitve vzorcev mleka v petrijevih ploščah in plošče prelite z gojiščem VRBL
(Foto B. Špalir)

Skladno s standardom ISO 6888-2 smo v vzorcih mleka določali število koagulaza pozitivnih stafilokokov. Po 1 ml izbranih razredčitev smo prenesli na petrijeve plošče, ter jih prelili z raztopljenim in primerno ohlajenim (45 ± 2 °C) gojiščem BP z dodanim RPF. Po inkubaciji so koagulaza pozitivni stafilokoki zrasli kot značilne, črne oziroma sive (lahko tudi bele) kolonije obdane s cono precipitacije. Ker gojišče BP z RPF temelji na koagulazni aktivnosti precipitacije fibrina, potrditveni testi niso potrebni.

Po inkubaciji smo kolonije na posameznih gojiščih prešteli na števcu kolonij. Prešteli smo plošče, na katerih je zraslo od 10 do 300 kolonij, razen pri določanju števila koliformnih mikroorganizmov, kjer smo za števne plošče upoštevali tiste, na katerih je zraslo od 10 – 150 kolonij. Za izračun števila mikroorganizmov (N) v ml mleka pa smo uporabili naslednjo formulo (ISO 7218):

$$N = \frac{\Sigma KE}{(n_1 + 0,1 * n_2)} * R$$

N – število mikroorganizmov

ΣKE – vsota kolonij, prešteti na vseh ploščah

n_1 – število števni petrijevih plošč (10-300 oz. 10-150 kolonij) prve razredčitve

n_2 – število števni petrijevih plošč (10-300 oz. 10-150 kolonij) druge razredčitve

R – razredčitveni faktor prve razredčitve

3.3.5 Določanje prisotnosti zaviralnih snovi v mleku

Prisotnost zaviralnih snovi v mleku smo ugotavljali s standardno difuzijsko metodo, z uporabo kompleta Delvotest[®]SP-NT / SP MINI-NT (DSM Food Specialties). Test je zelo občutljiv za prisotnost različnih antibiotikov. Indikatorska bakterija pri tej metodi je za zaviralne snovi izredno občutljiv *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, katerega spore so dodane trdnemu gojišču, ki je nalito v ampule. V tako predpripravljeno ampulo smo dodali 0,1 ml mleka in pričeli s 3–urno inkubacijo ampul pri temperaturi $64 \pm 0,5$ °C. Med inkubacijo spore vzklijejo in preidejo v vegetativno obliko, vegetativne celice pa zaradi metabolne aktivnosti kmalu proizvedejo toliko kisline, da barva indikatorja, dodanega gojišču, preide iz vijolične v rumeno. Sprememba barve gojišča iz vijolične v rumeno pomeni odsotnost zaviralnih snovi v koncentraciji enaki ali nad mejo detekcije testa. Nasprotno pa, če so v analiziranem vzorcu mleka prisotne zaviralne snovi, delujejo zaviralno na bakterijske celice in ni metabolne aktivnosti, ter ne pride do spremembe barve gojišča. Na sliki 8 je prikazan termostat za inkubacijo vzorcev.



Slika 8: Termostat za inkubacijo vzorcev pri določanju prisotnosti zaviralnih snovi
(Foto B. Špalir)

4 REZULTATI

Mleko za analize smo odvzeli s petih naključno izbranih mlekomatov. Vzorčenje je potekalo enkrat tedensko, pet tednov zapored, izvedli pa smo ga v dveh letnih časih in sicer v zgodnje spomladanskem in poletno-jesenskem obdobju.

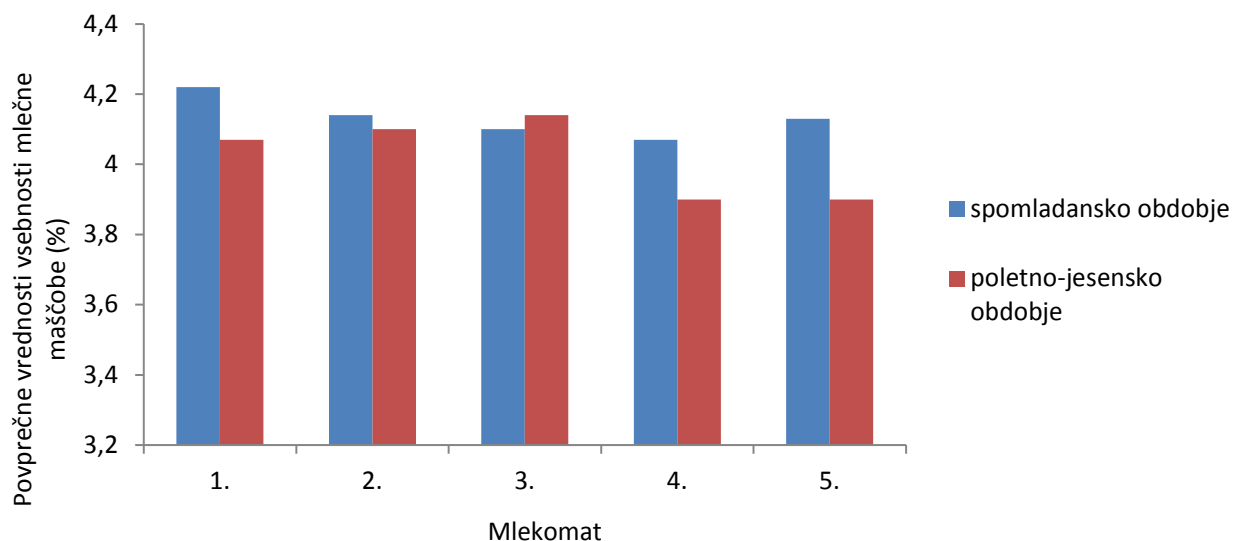
4.1 VSEBNOST MLEČNE MAŠČOBE

V okviru kemijske kakovosti smo v vzorcih mleka iz mlekomatov določali vsebnost mlečne maščobe, dobljene povprečne vrednosti mlečne maščobe pa so prikazane v preglednici 4 oz. na sliki 9. Kot vidimo, so razlike povprečnih vrednosti med obdobjema majhne.

Preglednica 4: Povprečne vsebnosti mlečne maščobe (%) v vzorcih mleka v spomladanskem (n = 5) in poletno-jesenskem obdobju (n = 5)

	1. mlekomat	2. mlekomat	3. mlekomat	4. mlekomat	5. mlekomat
Spomladansko obdobje	4,22 ± 0,16	4,14 ± 0,04	4,10 ± 0,08	4,07 ± 0,07	4,13 ± 0,07
Poletno-jesensko obdobje	4,07 ± 0,14	4,10 ± 0,25	4,14 ± 0,12	3,90 ± 0,18	3,94 ± 0,11

Največja razlika je bila pri vzorcih mleka iz petega mlekomata, kjer je v spomladanskem obdobju povprečna vsebnost mlečne maščobe večja za 0,19 %. Najmanjša razlika povprečnih vrednosti vsebnosti mlečne maščobe pa je bila pri vzorcih iz mlekomata 2 in 3, in sicer 0,04 %.



Slika 9: Povprečna vsebnost mlečne maščobe v spomladanskem in poletno-jesenskem obdobju

Kot že rečeno, so bile razlike vsebnosti mlečne maščobe v vzorcih mleka med spomladanskim in poletno-jesenskim obdobjem majhne, pa vendar se je pri vzorcih mleka kar štirih mlekomatov pokazalo, da je povprečna vsebnost mlečne maščobe v poletno-jesenskem obdobju nižja v primerjavi s spomladanskim obdobjem. Lahko pa rečemo, da je pri vseh analiziranih vzorcih surovega mleka vsebnost mlečne maščobe primerno visoka in ustrezna.

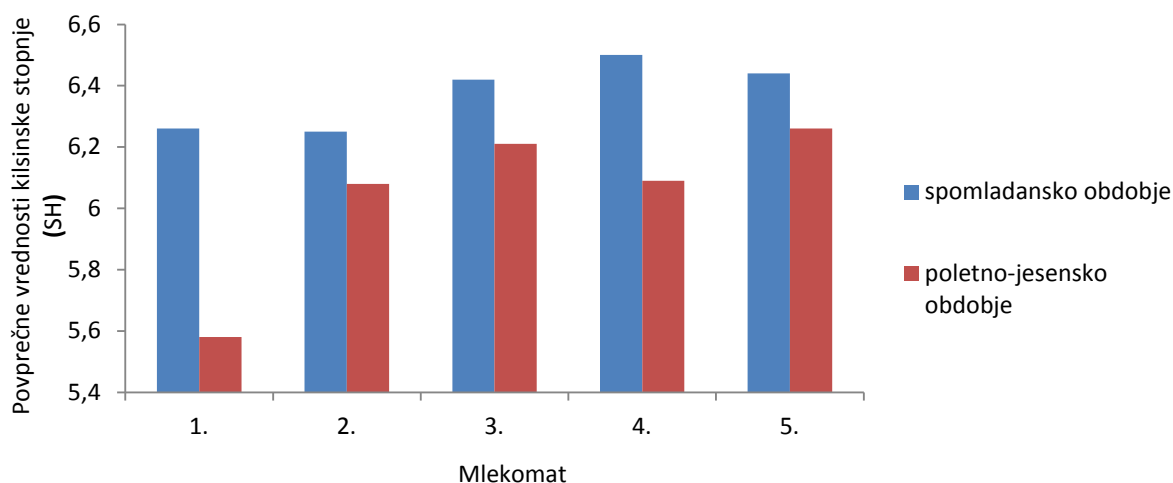
4.2 KISLINSKA STOPNJA MLEKA

Od parametrov fizikalne kakovosti smo pri vzorcih mleka določali kislinsko stopnjo. Tudi pri kislinski stopnji mleka smo opazili razlike med spomladanskim in poletno-jesenskim obdobjem (Preglednica 5). V spomladanskem obdobju so bile povprečne vrednosti nekoliko večje kot v poletno-jesenskem obdobju.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti kislinske stopnje (SH) mleka v spomladanskem (n = 5) in poletno-jesenskem obdobju (n = 5)

	1. mlekomat	2. mlekomat	3. mlekomat	4. mlekomat	5. mlekomat
Spomladansko obdobje	6,26 ± 0,18	6,25 ± 0,15	6,42 ± 0,14	6,50 ± 0,18	6,44 ± 0,14
Poletno-jesensko obdobje	5,58 ± 0,12	6,08 ± 0,13	6,20 ± 0,16	6,09 ± 0,19	6,26 ± 0,11

Največja razlika povprečnih vrednosti kislinske stopnje se je pokazala pri vzorcih mleka mlekomata 1, kjer je razlika znašala kar 0,68 SH, najmanjša pa pri vzorcih mleka mlekomata 2, kjer je bila 0,17 SH. Največjo povprečno vrednost kislinske stopnje so imeli vzorci iz mlekomata 4 v spomladanskem obdobju (6,50 ± 0,18 SH), najmanjšo vrednost pa vzorci mleka mlekomata 1 v poletno-jesenskem obdobju (5,58 ± 0,12 SH).



Slika 10: Povprečne vrednosti kislinske stopnje vzorcev mleka v spomladanskem in poletno-jesenskem obdobju

Kljub nihanjem povprečnih vrednosti kislinske stopnje med obdobjema (Slika 10) pa so vse vrednosti ustrezne, saj ne presegajo dovoljene vrednosti 7,2 SH, ki jo za surovo mleko predpisuje Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv (1993).

4.3 ŠTEVILO SOMATSKIH CELIC

V sklopu ugotavljanja higienske kakovosti mleka smo določali tudi število somatskih celic, ki je pomemben indikator zdravstvenega stanja molzne živali oz. mlečne žleze in hkrati eden od parametrov oblikovanja odkupne cene mleka. Število somatskih celic, določeno v posameznih vzorcih mleka petih mlekوماتov, je prikazano v preglednicah 6a (spomladansko obdobje) in 6b (poletno-jesensko obdobje).

Preglednica 6: Število somatskih celic v vzorcih mleka (ŠSC/ml), vzorčenih v spomladanskem obdobju (6a) in v poletno-jesenskem obdobju (6b)

a) spomladansko obdobje (ŠSC/ml)

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	239.000	219.000	291.000	479.000	231.000
2.	303.000	470.000	216.000	541.000	112.000
3.	296.000	282.000	251.000	538.000	271.000
4.	374.000	275.000	281.000	400.000	243.000
5.	278.000	223.000	206.000	345.000	470.000

b) poletno-jesensko obdobje (ŠSC/ml)

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	176.000	221.000	472.000	311.000	306.000
2.	192.000	210.000	260.000	231.000	90.000
3.	171.000	238.000	390.000	481.000	243.000
4.	830.000	187.000	342.000	297.000	310.000
5.	163.000	139.000	285.000	353.000	228.000

Legenda: odebeljene so vrednosti somatskih celic, ki presegajo mejno vrednost 400.000 celic/ml

Kot vidimo iz rezultatov je pri vzorcih mleka mlekوماتov 1, 2, 3 in 5 število somatskih celic, ne glede na obdobje vzorčenja, preseglo dovoljeno mejo 400.000 SC/ml (Uredba o določitvi..., 2001) le pri enem vzorčenju, medtem ko je bila pri mlekوماتu 4 v spomladanskem obdobju ta vrednost presežena kar pri treh vzorčenjih, pri enem vzorčenju pa je bila ravno na meji. Mleko iz mlekوماتa 4 je tudi v poletno-jesenskem obdobju pri enem vzorčenju vsebovalo več kot 400.000 SC/ml. Velika števila SC v ml mleka opozarjajo na slabo zdravstveno stanje živali, katerih mleko so prodajali v mlekوماتu 4.

4.4 SKUPNO ŠTEVILO MIKROORGANIZMOV

Skupno število mikroorganizmov smo v vzorcih mleka določali s standardno metodo štetja na petrijevih ploščah (Slika 11).



Slika 11: Zrasle kolonije na gojišču za določanje skupnega števila mikroorganizmov (Foto A. Čanžek Majhenič)

V preglednici 7 so prikazani rezultati SŠMO v vzorcih mleka petih mlekomatov, odvzetih v spomladanskem (7a) oz. poletno-jesenskem obdobju (7b).

Preglednica 7: Skupno število mikroorganizmov v vzorcih mleka (KE/ml), vzorčenih v spomladanskem (7a) in poletno-jesenskem obdobju (7b)

a) SŠMO (KE/ml) v spomladanskem obdobju

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	47.000	10.000	12.000	200.000	350.000
2.	480.000	11.000	81.000	83.000	62.000
3.	100.000	33.000	5.000	75.000	49.000
4.	94.000	19.000	10.000	43.000	46.000
5.	100.000	17.000	81.000	53.000	44.000

b) SŠMO (KE/ml) v poletno-jesenskem obdobju

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	87.000	46.000	170.000	35.000	27.000
2.	36.000	55.000	30.000	350.000	10.000
3.	130.000	53.000	140.000	450.000	190.000
4.	350.000	110.000	53.000	54.000	35.000
5.	83.000	21.500.000	29.000	180.000	34.000

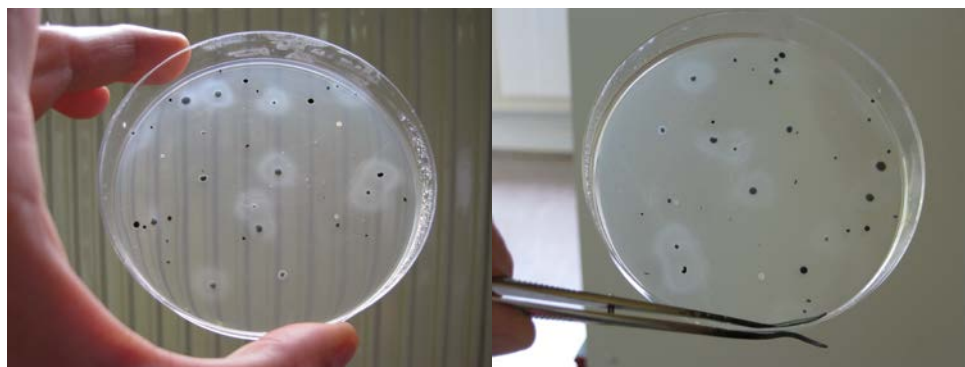
Legenda: odebeljene so vrednosti SŠMO, ki presegajo zgornjo mejo 100.000 KE/ml mleka

Iz primerjave rezultatov SŠMO v vzorcih mleka, odvzetih v spomladanskem in poletno-jesenskem obdobju vidimo, da so bili vzorci mleka v spomladanskem obdobju boljše mikrobiološke kakovosti. Pri vzorcih mleka v spomladanskem obdobju iz mlekomatov 2 in 3 se je izkazalo, da SŠMO pri nobenem od vzorcev mleka ni preseglo mejne vrednosti 100.000

KE/ml, medtem ko je bila ta vrednost pri vzorcih mleka mlekomatov 1, 4 in 5 presežena le pri enem vzorčenju. Nasprotno pa je v poletno-jesenskem obdobju SŠMO pogosteje preseglo mejno vrednost 100.000 KE/ml in sicer pri vzorcih mleka mlekomatov 1, 2 in 3 pri dveh vzorčenjih, medtem ko so pri mlekomatu 4 mejno vrednost SŠMO presegli kar trije vzorci mleka. Pri mlekomatu 5 je bila mejna vrednost tudi v poletno-jesenskem obdobju presežena le pri enem vzorčenju. Zanimiv je rezultat 5. vzorca mleka mlekomata 2, kjer smo pri določanju SŠMO našli kar 21.500.000 KE/ml. Ker je število zelo visoko domnevamo, da najverjetneje ni posledica samo neustrezne higijene in rokovanja z mlekom, temveč tudi vpliva dodatnega faktorja, na primer prisotnosti biofilma, ki se je v vzorec mleka odluščil med točenjem mleka iz mlekomata.

4.5 PRISOTNOST KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOOV

Po nacepljanju vzorcev mleka na gojišče BP+RPF in končani inkubaciji, smo prešteli samo kolonije, obdane s precipitacijsko cono fibrinogena, ki so značilne za koagulaza pozitivne stafilokoke (Slika 12).



Slika 12: Kolonije koagulaza pozitivnih stafilokokov, obdane s precipitacijsko cono fibrinogena (Foto A. Čanžek Majhenič)

V preglednici 8 so prikazani rezultati števila koagulaza pozitivnih stafilokokov, prisotnih v vzorcih mleka petih mlekomatov, ki smo jih vzorčili v spomladanskem (8a) in poletno-jesenskem obdobju (8b).

Preglednica 8: Število koagulaza pozitivnih stafilokokov v vzorcih mleka (KE/ml), vzorčenih v spomladanskem (8a) in poletno-jesenskem (8b) obdobju

a) spomladansko obdobje (KE/ml)

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	7.000	1.700	600	1.500	0
2.	4.200	1.000	800	3.300	0
3.	3.800	820	550	900	0
4.	3.100	7.300	360	200	100
5.	3.100	1.900	1.000	2.000	0

b) poletno-jesensko obdobje (KE/ml)

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	1.300	800	600	100	2.200
2.	700	320	180	1.200	0
3.	1.000	360	270	400	0
4.	1.400	6.000	0	500	0
5.	2.000	640	200	0	0

Spremljali smo prisotnost in število koagulaza pozitivnih stafilokokov (Preglednica 8) v vzorcih mleka petih mlekomatov v dveh letnih obdobjih. Glede na priporočila Smernic za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku (2009), število koagulaza pozitivnih stafilokokov v vzorcih surovega mleka, ki je namenjeno uživanju brez predhodne toplotne obdelave, ne sme preseči 500 KE/ml. Če naše rezultate primerjamo s priporočili smernic lahko vidimo, da so se najslabše odrezali vzorci mleka mlekomatov 1 in 2, saj je, razen pri drugem in tretjem vzorčenju mlekomata 2 v poletno-jesenskem obdobju, število koagulaza pozitivnih stafilokokov vedno preseglo priporočeno vrednost. Najboljše rezultate smo zasledili pri vzorcih mlekomata 5, saj razen presežene vrednosti pri prvem vzorčenju v poletno-jesenskem obdobju, v vzorcih mleka koagulaza pozitivnih stafilokokov nismo zasledili oz. je bilo njihovo število pod priporočeno mejo. Tudi za vzorce mlekomatov 3 in 4 lahko rečemo, da je število, posebej v spomladanskem obdobju, previsoko, precej boljše pa je bilo stanje v poletno-jesenskem obdobju, ko je bilo, razen prvega vzorčenja mlekomata 3 in drugega vzorčenja mlekomata 4, število koagulaza pozitivnih stafilokokov vedno pod priporočeno mejo. Rezultati kažejo, da je precej pregledanih vzorcev mleka neustreznih z vidika števila koagulaza pozitivnih stafilokokov. Kljub temu pa je potrebno poudariti, da noben od pregledanih vzorcev mleka ni dosegal oz. presegel vrednosti 10^4 KE/ml nad katero je potrjena tvorba stafilokoknega enterotoksina.

4.6 PRISOTNOST KOLIFORMNIH BAKTERIJ

V vzorcih mleka smo ugotavljali tudi prisotnost koliformnih bakterij, katerih število je pokazatelj higienskih pogojev v proizvodni verigi. Gojišče VRBL je selektivno in diferencialno, na njem pa po inkubaciji zrastejo koliformne bakterije kot temno rdeče kolonije, premera 1-2 mm, obdane z rdečkasto precipitacijsko cono žolčnih soli (Slika 13).



Slika 13: Značilne kolonije koliformnih bakterij na gojišču VRBL (Foto A. Čanžek Majhenič)

V preglednici 9 so predstavljeni rezultati števila koliformnih bakterij v vzorcih mleka, odvzetih v spomladanskem (9a) in poletno-jesenskem obdobju (9b).

Preglednica 9: Število koliformnih bakterij v vzorcih mleka (KE/ml), vzorčenih v spomladanskem (9a) in poletno-jesenskem obdobju (9b)

5) spomladansko obdobje (KE/ml)

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	3.400	1.200	180	6.300	100
2.	1.300	200	60	7.400	30
3.	100	110	54	3.500	10
4.	9.500	2.500	80	1.100	20
5.	630	330	370	480	10

b) poletno-jesensko obdobje (KE/ml)

vzorčenje	MLEKOMAT				
	1	2	3	4	5
1.	350	600	75	380	200
2.	1.000	400	5.000	7.700	1.800
3.	1.900	250	20	2.000	300
4.	6.400	330	2.300	340	72
5.	570	380	550	5.500	100

Čeprav se sami prisotnosti koliformnih bakterij v surovem mleku skoraj ne moremo izogniti, pa je njihovo število dober pokazatelj higienskih pogojev rokovanja z mlekom. Pri dobri

higieni pridobivanja, transporta in skladiščenja ter ustreznemu hlajenju, število koliformnih bakterij v mililitru surovega mleka naj ne bi preseglo 100 KE (Rogelj, 2003). Iz naših rezultatov je razvidno, da se je temu kriteriju najbolj približala večina vzorcev mleka iz mlekomatov 3 in 5. Precej slabši pa so bili po številu koliformnih bakterij vzorci mleka iz mlekomatov 1 in 4. Število koliformnih bakterij je bilo, ne glede na obdobje vzorčenja, preseženo tudi v vseh vzorcih mlekomata 2, vendar pa so bile vrednosti, razen pri dveh vzorcih v spomladanskem obdobju, nižje od 1000 KE/ml.

4.7 PRISOTNOST ANTIBIOTIKOV

V vseh odvzetih vzorcih mleka smo ugotavljali tudi morebitno prisotnost zaviralnih snovi, ki so v mleku lahko posledica malomarnosti ali neznanja. Ugotovili smo, da je bil pri vseh vzorcih rezultat na prisotnost zaviralnih snovi negativen.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Mleko je kot najbolj popolna naravna hrana tudi idealen medij za rast in razvoj mikroorganizmov, zato smo se odločili analizirati mleko iz nekaj slovenskih mlekomatov. Pri tem smo pregledovali nekatere parametre kemijske, fizikalne, higienske in mikrobiološke kakovosti mleka, zanimalo pa nas je tudi ali obstajajo kakšne razlike analiziranih parametrov, če mleko vzorčimo spomladi ali poleti. Mlekوماتi so pri nas že dodobra uveljavljeni, nadzor nad mlekom pa le naključen in redek, zato nas je zanimalo ali mleko iz mlekomatov ustreza nekaterim kakovostnim merilom.

5.1.1 Fizikalno - kemijska kakovost

Od fizikalno–kemijskih parametrov smo preverjali kislinsko stopnjo mleka in vsebnost maščobe. Pri kemijski kakovosti smo analizirali vsebnost maščobe v mleku. V surovem mleku je delež mlečne maščobe povprečno 3,8 %, lahko pa niha v območju od 2,5 do 6 % (Mavrin in Oštir, 2002). V preiskovanih vzorcih mleka je bila vsebnost mlečne maščobe primerno velika, saj so povprečne vrednosti vsebnosti mlečne maščobe petih vzorcev mleka posameznega mlekomata v spomladanskem obdobju znašale od 4,07 do 4,22 %, medtem ko so bile povprečne vrednosti v poletno-jesenskem obdobju, razen pri vzorcih mleka iz mlekomata 3, rahlo manjše in sicer od 3,90 do 4,14 %. Če primerjamo rezultate naših vzorcev mleka z podatki o vsebnosti mlečne maščobe odkupljenega mleka leta 2010, ki se gibajo od 3,99 do 4,24 %, v povprečju pa je 4,11 % (Odkupljeno kravje mleko..., 2012), vidimo da so naše vsebnosti mlečne maščobe manjše.

Določanje kislinske stopnje, je najpogostejša metoda za ugotavljanje svežosti mleka. Kislinska stopnja surovega svežega mleka se giblje od 6,2 do 7,5 SH (Mavrin in Oštir, 2002). Kislinska stopnja mleka iz kontroliranih mlekomatov je bila od 5,58 do 6,5 SH, kar kaže na sveže mleko. Opazili pa smo manjšo razliko v povprečnih vrednostih kislinske stopnje med obdobjema, v poletno-jesenskem obdobju so bile povprečne vrednosti kislinske stopnje vzorcev mleka posameznega mlekomata nekoliko manjše in sicer od 5,58 do 6,26 SH, v spomladanskem obdobju pa so bile povprečne vrednosti kislinske stopnje večje, od 6,25 do 6,50 SH.

5.1.2 Higienska kakovost

Največ pozornosti smo posvetili higieni kakovosti mleka iz mlekomatov. Določali smo morebitno prisotnost antibiotikov, mikrobiološko kakovost in število somatskih celic, ki odraža zdravstveno stanje molznih živali, od katerih je bilo mleko pridobljeno.

Ugotovili smo, da pri nobenem od preiskovanih vzorcev mleka ni bilo prisotnih zaviralnih snovi v mleku. Vsi testi so bili negativni, tako da ni nikakršnih razlik med vzorci, niti med obdobjema. Protimikrobne oz. zaviralne snovi so v mleku nezaželene, saj povzročajo velike težave pri kasnejši predelavi mleka v fermentirane mlečne izdelke, prepovedane pa so tudi zaradi varovanja zdravja potrošnikov.

Somatske celice so naravno prisotne v mleku, saj se odmrle epitelne celice stalno izločajo v mleko, njihovo povečano število pa je večinoma pokazatelj bolezni v čredi. Dovoljena vrednost je 400.000 SC/ml (Uredba o določitvi..., 2001). Na podlagi naših rezultatov lahko ugotovimo, da v čredah na splošno vlada dobro zdravstveno stanje, razen v čredi, katere mleko so prodajali v mlekomatu 4.

5.1.3 Mikrobiološka kakovost

Znotraj mikrobiološke kakovosti smo določali skupno število mikroorganizmov (SŠMO) ter prisotnost koliformnih bakterij in koagulaza pozitivnih stafilokokov.

SŠMO smo v mleku določali s standardno metodo štetja na petrijevih ploščah. Njihovo število določa higieni kakovost surovega mleka, ki je odraz bakteriološke okužbe med pridobivanjem mleka. Majhno skupno število mikroorganizmov je znak dobre higieni oz. dobre proizvodne prakse, medtem ko je veliko število, nad 100.000 KE/ml znak slabe higieni. V mlekarstvu razvitih deželah, kot tudi v Sloveniji, velja za higieni sprejemljivo mleko tisto, ki ne preseže 100.000 KE/ml (Rogelj, 2003). Iz naših rezultatov smo ugotovili, da je bila v splošnem higieni oz. mikrobiološka slika vzorcev mleka boljša v spomladanskem obdobju. V spomladanskem obdobju je bila mejna vrednost pri naših vzorcih skupno presežena pri treh vzorčenjih, v poletno-jesenskem obdobju pa kar pri 10-ih vzorčenjih.

Koliformne bakterije so v surovem mleku vedno prisotne, njihova številčnost pa je odličen pokazatelj higieni hleva in molzne opreme ter pogojev transporta in skladiščenja mleka. Ob dobri praksi in hitremu ohlajanju v mililitru surovega mleka ni več kot 100 KE koliformnih bakterij (Rogelj, 2003). Iz naših rezultatov vidimo, da temu pogoju zadostijo samo vzorci

mlekوماتа 5, medtem ko imajo ostali večinoma večje vrednosti, ne glede na čas vzorčenja, bodisi v spomladanskem ali v poletno-jesenskem obdobju. Vseeno pa po številčnosti izstopajo vzorci mleka mlekomatov 1 in 4, kar je najverjetneje znak slabih higienskih pogojev pridobivanja mleka.

Bakterije rodu *Staphylococcus* pridejo v mleko zaradi okužbe vimena ali pa jih prenaša molznik. V nalogi smo preverjali prisotnost koagulaza pozitivnih stafilokokov, ki so značilni povzročitelj vnetja mlečne žleze, poleg tega pa zaradi sposobnosti tvorbe stafilokoknega enterotoksina predstavljajo zdravstveno tveganje za potrošnika. Po priporočilih Smernic za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku (2009) sme biti v surovem mleku, namenjenem uživanju brez predhodne toplotne obdelave do 500 KE koagulaza pozitivnih stafilokokov na ml mleka. Med analizo pa se je izkazalo, da je večina naših preiskovanih vzorcev mleka neustreznih. Znano pa je, da je veliko živil, ki v manjšem številu vsebujejo koagulaza pozitivne stafilokoke in *Sta. aureus* in jih vseeno lahko zaužijemo brez nevarnosti za zdravje. Poudariti moramo, da je po veljavnih ocenah potrebno zaužiti 100 – 200 ng stafilokoknega enterotoksina, da pride do stafilokokne zastrupitve. Tolikšno količino enterotoksina lahko proizvede $10^5 - 10^6$ KE/ml živila (Rajkovic, 2012). Vidimo torej, da z varnostnega vidika tudi vzorci mleka s povišanim številom koagulaza pozitivnih stafilokokov ne pomenijo neposredne nevarnosti za zdravje potrošnika, seveda pa moramo ob tem izključiti občutljivejše skupine ljudi kot so otroci, nosečnice, starejši in bolni. Tudi če upoštevamo oceno varnosti živila, ki ga v prilogi 3 podajajo Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku (2009), da je pri vrednosti $\geq 10^4$ KE koagulaza pozitivnih stafilokokov in *Sta. aureus* v enem ml oz. g živila potrjena sposobnost tvorbe stafilokoknega enterotoksina vidimo, da nobeden od pregledanih vzorcev mleka ni presegel te vrednosti.

5.2 SKLEPI

- Vsebnost mlečne maščobe je bila pri vseh vzorcih primerna, povprečna vsebnost je v spomladanskem obdobju znašala od 4,07 do 4,22 % in v poletno-jesenskem od 3,90 do 4,14 %.
- Kislinska stopnja vzorcev mleka je bila primerna in ni preseгла predpisane vrednosti 7,2 SH.
- Število somatskih celic je bilo, ne glede na obdobje vzorčenja, pri vzorcih mleka mlekomatov večinoma zadovoljivo, razen pri mlekomatu 4, kjer predvidevamo, da je bilo,

vsaj v spomladanskem obdobju, zdravstveno stanje v čredi slabo.

- Mikrobiološka slika vzorcev mleka je bila boljša v spomladanskem obdobju. Od skupno vzetih 25 vzorcev so v spomladanskem obdobju trije (12 %) presegli mejno vrednost 100.000 KE/ml, v poletno-jesenskem obdobju pa kar 10 vzorcev mleka (40 %).
- Kljub prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov v večini preiskovanih vzorcih mleka, smo na podlagi ocen varnosti živil z vidika prisotnosti/števila stafilokokov, ter z vidika potencialnega tveganja prisotnosti toksina ocenili, da koagulaza pozitivni stafilokoki v mleku iz vzorčenih mlekomatov ne predstavljajo zdravstvenega tveganja za potrošnika, kar pa ne velja za občutljivejše skupine ljudi.
- Vzorci mleka iz mlekomatov so vsebovali od 10 pa do 9.500 koliformnih bakterij na ml. Kar 36 % vzorcev je za več kot 10x preseglo 100 KE/ml, ki je zgornja meja, ki kaže na dobro higieno pri pridobivanju, transportu in skladiščenju ter ustreznega hlajenja mleka.
- V nobenem preiskovanem vzorcu mleka nismo našli zaviralnih snovi.

6 POVZETEK

Mlekomati so aparati za točenje surovega mleka, lastniki so kmetje in so odgovorni za njihovo pravilno delovanje. Mlekomati so izdelani tako, da ne izdajajo mleka, ki je starejše od 24 ur in ni primerne temperature. Za kakovost mleka v mlekomatu in za higieno mlekomata pa je odgovoren kmet sam.

Mleko je zaradi svoje sestave idealen medij za razvoj najrazličnejših mikroorganizmov, tako tehnološko koristnih, kot tudi zdravju škodljivih, ki se ob neprimernem rokovanju z mlekom lahko prekomerno namnožijo. Če so se mlekomati v Sloveniji že dodobra uveljavili, pa sta urejenost zakonodaje o mlekomatih in nadzor nad njimi še vedno nedorečena. Zato smo se odločili, da bomo pregledali nekatere kakovostne parametre vzorcev mleka iz petih, naključno izbranih mlekomatov, da bi ugotovili ali ustrezajo predpisani kakovosti.

V hipotezah smo predpostavili, da bodo analizirani vzorci mleka ustrezne kakovosti in da bo v poletno-jesenskem obdobju mikrobiološka slika nekoliko slabša. V vzorcih mleka, ki smo jih vzorčili iz petih mlekomatov v spomladanskem in poletno-jesenskem obdobju, smo določali vsebnost maščobe, kislinsko stopnjo, prisotnost zaviralnih snovi, skupno število mikroorganizmov, število somatskih celic ter prisotnost koagulaza pozitivnih stafilokokov in koliformnih bakterij.

Mleko iz mlekomatov je v povprečju vsebovalo od 3,9 – 4,22 % mlečne maščobe, v povprečju pa je bila vsebnost v poletno-jesenskem obdobju nekoliko manjša kot v spomladanskem. Kislinska stopnja vzorcev mleka je bila primerna, saj v nobenem od vzorcev mleka vrednost ni presegla vrednosti 7,2 SH. V nobenem od vzorcev mleka iz mlekomatov, vključenih v našo raziskavo, ni bilo prisotnih zaviralnih snovi. Skupno število mikroorganizmov je bilo v poletno-jesenskem obdobju višje kot v spomladanskem, ko je bila tudi večkrat presežena predpisana vrednost mikrobiološke ustreznosti 100.000 KE/ml. Ob upoštevanju priporočila Smernic za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku (2009), o številu koagulaza pozitivnih stafilokokov in *St. aureus* v surovem mleku, je večina vzorcev presegla priporočeno vrednost. Kljub prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov pa lahko rečemo, da njihova številčnost v nobenem vzorcu mleka ni presegla 10^4 KE/ml, ki je tista koncentracija, pri kateri je potrjena sposobnost tvorbe stafilokoknega toksina. Razen občutljivejših skupin potrošnikov, kamor sodijo nosečnice, otroci, starejši in ljudje s slabšo imunsko odpornostjo, majhno število koagulaza pozitivnih

stafilokokov v mleku naj ne bi predstavljalo tveganje za zdravje. Število somatskih celic je bilo v večini vzorcev zadovoljivo, razen pri vzorcih mleka mlekomata 4. Število koliformnih bakterij je bilo samo pri vzorcih enega mlekomata zadovoljivo, medtem ko so imeli ostali večinoma večje vrednosti, ne glede na obdobje vzorčenja, vendar pa je bila večina vrednosti manjša od 1000 KE/ml.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili postavljene hipoteze. Mikrobiološka slika preiskovanih vzorcev mleka je bila na splošno slabša v poletno-jesenskem obdobju, medtem ko so po preostalih preiskovanih kakovostnih parametri vzorci mleka v večini ustrezali predpisanim normativom.

7 VIRI

- Bajt N., Golc-Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 142 str.
- Bajt N., Golc-Teger S., Pirkmajer E. 1998. Živilska tehnologija – vaje, 4. zvezek - Mleko in mlečni izdelki. Ljubljana. Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 179 str.
- Carić M., Milanović S., Vucelja D. 2000. Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. Novi sad. Prometej: 204 str.
- Čanžek Majhenič A., Perko B., Rogelj I. 2007. Praktikum pri predmetu mlekarstvo. Domžale, Univerza v Ljubljani, BF, Odd. za zootehniko, Katedra za mlekarstvo: 47 str.
- ISO 13366-2. Milk. Enumeration of somatic cells. Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. 2006: 13 str.
- ISO 2446. Milk – Determination of fat content. 2008: 12 str.
- ISO 4832. Microbiology of food and animal feeding stuffs–Horizontal method for the enumeration of coliforms – Collony-count technique. 2006: 6 str.
- ISO 4833. Microbiology of food and animal feeding stuffs–Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 degrees C. 2003: 28 str.
- ISO 6887-5. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products. 2010: 12 str.
- ISO 6888-2. Microbiology 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 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations. Amendment 1. 1996/Amd.1:2001: 7 str.
- Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 218 str.
- Methodenbuch. 2000. Band VI, C 8.3: Bestimmung des Säuregrades von Milch und flüssigen Milchprodukten. Bonn, VDLUFA – Verlag: 6 str.
- Mihovec P. 2006. Ugotavljanje mikrobiološke kakovosti surovega mleka s standardnimi metodami in postopkom RIDA®CAUNT. Diplomsko delo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 43 str.
http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/vs_mihovec_petra.pdf (14. jan. 2012)
- Mlekomat. 2010. Zavod za zdravstveno varstvo Kranj.
<http://www.zzv-kr.si/datoteke/mlekomat.pdf> (17. dec. 2011)

Mlekomati.

<http://www.mlekomati.com/mlekomati.html> (13. jan. 2012)

Odkupljeno kravje mleko in proizvodnja mlečnih izdelkov v mlekarnah, Slovenija, letno. Statistični urad Republike Slovenije.

<http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/Saveshow.asp> (15. mar. 2012)

Pensilina. Latteria Prometea.

http://milkvending.com/media/pdfs/pensilina_eng.pdf (16. dec. 2011)

Pravilnik o uporabi izraza mleko in uporabi označb za mlečne izdelke. 2001. Ur. l. RS. št. 11-731/01

<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200111&stevilka=731> (21. jan. 2012)

Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv. 1993. Ur. l. RS. št. 21-991/93

<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=199321&stevilka=991> (21. jan. 2012)

Rajkovic A. 2012. Incidence, growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in insufficiently dried traditional beef ham »govedja pršuta« under different storage conditions. Food Control, 27: 369-373

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: 512-537

Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku. 2009. IVZ Republike Slovenije v sodelovanju z Zvezo potrošnikov Slovenije (15. dec. 2005)

<http://www.zzv-go.si/fileadmin/pdfdoc/SmerniceZ.pdf> (5. jan. 2012)

Uredba o določitvi minimalne odkupne cene kravjega mleka za namen izvajanja ukrepov v okviru ureditve trga z mlekom in mlečnimi izdelki. 2001. Ur. l. RS. št 15-950/01

<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200115&stevilka=950> (21. mar. 2013)