

INFLUENCE OF PARITY AND STAGE OF LACTATION ON SOMATIC CELL AND BACTERIA COUNTS IN RAW SHEEP MILK

Králíčková Š., Kuchtlík J.

Department of Animal Breeding, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkralic0@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The evaluation of influence of parity (PA), the stage of lactation (SL) and the interaction of PA x SL on ewe's milk somatic cell and bacteria counts was performed on the base of analyses of milk samples from 20 sheep of East Friesian. 10 ewes were on the 2nd lactation and another 10 ewes were on the 3rd lactation. The milk records and samplings were carried out three times during the lactation on average 75th, 132th and 190th day of lactation. During the experiment all ewes were reared on permanent pasture. The determination of somatic cell count (SCC) was made using fluoro-opto-electronic apparatus. Milk was analyzed using standard plate count methods for total bacteria count (TBC), psychrotrophic bacteria count (PBC) and total coliform count (TCC). The analysis involved a total of 60 milk samples. The collected data were statistically analysed using the mathematical-statistical program STATISTICA 9.0. The PA had a significant effect only on SCC, but on the other hand the PA had not significant effect on chosen groups of microorganisms. The results of this study indicate that significant effect of the SL was found on SCC and also on all chosen microbiological indicators (TBC, PBC, TCC). The interaction of PA x SL had a significant effect on PBC. The milk of PA3 ewes had a significantly greater amount of somatic cells than the PA2 ewes. SCC significantly decreased with advanced lactation. Among SCC and all chosen groups of microorganisms were found positive and significant correlations, also among particular groups of microorganisms were found positive and significant correlations.

Key words: raw sheep milk, parity, stage of lactation, somatic cell, microorganisms, psychrotrophs, coliform bacteria, correlations

Acknowledgement: This project was supported by IGA TP 8/2011 and QH91271.

ÚVOD

Mléko je obecně považováno za výborný živný substrát pro různé druhy mikroorganismů. Mléko v mléčné žláze zdravých zvířat obsahuje malý počet mikroorganismů, které jsou usazeny ve strukovém kanálku a přecházejí do mléčné cisterny vemene. Za normálního stavu se ve strukovém kanálku nachází 10^1 až 10^3 mikroorganismů v 1 ml mléka, nutno však podotknout, že špatnou těsnicí funkcí strukového svěrače se počet mikroorganismů v 1 ml mléka může zvýšit řádově až na 10^5 . Primárně může být mléko dále kontaminováno krevním oběhem nebo lymfogenní cestou. Z mikroorganismů, které se mohou dostat do mléka ještě před opuštěním vemene, jsou nejzajímavější patogenní kmeny *Staphylococcus aureus*, které se do mléka dostávají ve vyšších počtech při mastitidních onemocněních. Obecně je známo, že první stříky obsahují nejvíce mikroorganismů, zatímco poslední stříky obsahují jen asi 10 až 15 % z počátečního množství (Cempírková et al., 1997). Během dojení a po nadojení dochází ke značné změně původní mikroflóry vlivem sekundární kontaminace, která nejčastěji pochází z povrchu mléčné žlázy, ze vzduchu, prachu, krmiva, steliva, dojícího zařízení, rukou pracovníků, k ostatním zdrojům patří také voda a hmyz (Smetana, 2009).

Množství mikroorganismů v mléce vypovídá o úrovni hygieny v prvovýrobě, přičemž dodržováním zásad správné hygienické praxe lze do značné míry výskytu i pomnožení mikroorganismů v mléce zabránit. Limit pro CPM v ovčím mléce je dán Nařízením evropského parlamentu a rady (ES) č. 853/2004, které udává zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Podle výše uvedeného nařízení nemá u malých přežvýkavců překročit obsah mikroorganismů (při 30 °C) v mléce 1 500 000 na 1 ml. A dále, pokud je mléko určeno na výrobu mléčných výrobků postupem, který nezahrnuje tepelnou úpravu, musí obsahovat méně než 500 000 mikroorganismů na 1 ml. V ČR není stanoven limit pro počet somatických buněk v ovčím mléce, nicméně např. Bianchi et al. (2004) uvádějí hranici pro subklinickou mastitidu ovcí na úrovni 500 000 SB/ml a pro chronickou mastitidu na úrovni 1 000 000 SB/ml mléka.

MATERIÁL A METODIKA

K laboratorním analýzám byly použity vzorky ovčího mléka z ekologické farmy v Habří. Do pokusu bylo zařazeno 20 kusů bahnic plemene Východofříská ovce, přičemž 10 bahnic bylo na druhé laktaci a dalších 10 na třetí laktaci. Během pokusu byly všechny sledované bahnice chovány v identických podmínkách a vykazovaly dobrý zdravotní stav. Denní krmná dávka bahnic byla založena na ad libitní celodenní pastvě na trvalém travním porostu. Doplněk krmné dávky tvořil organický mačkaný oves (přidávaný v průběhu dojení) jehož průměrná denní spotřeba na bahnici činila 0,05 kg a minerální liz (Millaphos Schaumann, *ad libitum*). Vzhledem k nedostatečné

produkci zelené hmoty v důsledku sucha byly bahnice od května do července přikrmovány jetelotravním senem (0,5 kg/den/kus) a jetelotravní siláží (1 kg/den/kus).

S dojením se započalo v průběhu měsíce května, přičemž po celou dobu sledování byly bahnice dojeny vždy jednou denně v 8 hodin ráno. Odběry vzorků byly realizovány třikrát a to v období od května do září 2009, konkrétně jednotlivé odběry odpovídaly průměrnému 75., 132. a 190. dni laktace. Vzorky byly ihned po odběru vychlazeny na teplotu ± 5 °C a následně v termoboxu převezeny do laboratoře pro rozborů mléka v Brně-Tuřanech (LRM) a mikrobiologické laboratoře na MENDELU v Brně. Mléko pro mikrobiologická stanovení bylo odebíráno ručně do sterilních zkumavek. V rámci analýz byly sledovány následující ukazatele kvality ovčím mléka: počet somatických buněk (PSB) v tisících/ml vzorku mléka, celkový počet mikroorganismů (CPM) v KTJ/ml, počet psychrotrofních mikroorganismů (PPM) v KTJ/ml a počet koliformních bakterií (PKB) v KTJ/ml.

PSB byl stanoven fluoro-opto-elektronickou metodou dle ČSN EN ISO 13366-2; tato metoda průtokové cytometrie byla prováděna na přístroji Bentley 2500. Počty mikroorganismů byly stanoveny plotnovou kultivační metodou dle příslušných norem. 1 ml vzorku mléka nebo příslušného ředění byl inokulován do Petriho misky a zalit příslušnou živnou půdou o teplotě 45 °C. Po ukončení kultivace byly na jednotlivých miskách odečteny narostlé kolonie a výsledek byl vyjádřen v jednotkách KTJ na 1 ml vzorku.

Tab. 1 Podmínky kultivace sledovaných skupin mikroorganismů

	číslo normy	živná půda	teplota (°C)	doba (hod.)
CPM	ČSN EN ISO 4833	PCA	30	72
PPM	ČSN ISO 6730	PCA	6,5	10
PKB	ČSN ISO 5541/1	VRBL	37	24

Celkově bylo odebráno a zanalyzováno 60 vzorků syrového ovčím mléka. Zjištěné údaje byly statisticky vyhodnoceny metodou nejmenších čtverců s pomocí matematicko-statistického programu STATISTICA verze 9.0. přičemž byly zohledněny následující systematické efekty: pořadí laktace (2 třídy), fáze laktace (3 třídy) a interakce mezi pořadím a fází laktace (PL x FL).

VÝSLEDKY A DISKUZE

L.S.M. a S.E.M. hodnoty počtu somatických buněk a bakterií v závislosti na pořadí a fázi laktace jsou uvedeny v tabulce 2.

Z údajů uvedených v této tabulce lze konstatovat, že pořadí laktace (PL) mělo průkazný vliv na počet somatických buněk (PSB) v mléce, když bahnice na 3. laktaci měly vyšší PSB oproti bahnicím na 2. laktaci. Fáze laktace (FL) měla také průkazný vliv na PSB, což je v souladu se závěry, jež uvádějí ve své studii Sevi et al. (2004). Z tabulky 2 je dále patrné, že L.S.M. hodnoty PSB u bahnic na druhé laktaci (PL2) byly poměrně vyrovnané. Stejný trend zaznamenali na PL2

také Paape et al. (2006). L.S.M. hodnoty PSB u bahnic na třetí laktaci (PL3) byly 75. a 132. den laktace v podstatě totožné, nicméně mezi 132. a 190. dnem laktace se PSB výrazně snížil. Podobně vyrovnaný průběh hodnot mezi 75. a 132. dnem laktace zaznamenali opět ve své studii Paape et al. (2006). Paape et al. (2006) dále uvádějí, že faktory jako je PL a FL mají pouze minimální vliv na PSB v mléce. Vliv interakce PL x FL na PSB nebyl průkazný, což je v souladu se závěry, jež konstatují Sevi et al. (2000). V rámci našeho experimentu byla zaznamenána pozitivní a průkazná korelace mezi PL a PSB a negativní a průkazná korelace mezi FL a PSB (viz tabulka 3). Naproti tomu Dulin et al. (1983), Luengo et al. (2004) a Raynal-Ljutovac et al. (2006) ve svých studiích uvádějí rostoucí PSB se zvyšující se FL. Nicméně, Paape et al. (2006), shodně s výsledky našeho sledování, zaznamenaly se zvyšující se FL snižování PSB. V individuálních vzorcích mléka se průměrný PSB v průběhu laktace pohyboval pod hranicí 100 000 v 1 ml vzorku. Respektující výše uvedené, je možno konstatovat, že žádná z bahnic v průběhu sledování netrpěla subklinickou mastitidou, když Bianchi et al. (2004) uvádějí mezní hranici počtu somatických buněk pro subklinickou mastitidu ovcí na úrovni vyšší jak 500 000 SB/ml.

Na základě údajů uvedených v tabulce 2, lze především konstatovat, že PL nemělo průkazný vliv na CPM ani na PPM. Naproti tomu, FL měla průkazný vliv na CPM v mléce, což je v souladu se závěry, jež publikují Micari et al. (2002). Nicméně je nutno podotknout, že jimi zjištěné hodnoty CPM v jarních měsících jsou výrazně vyšší než námi zjištěné údaje ve stejném ročním období. Také Malá et al. (2010) uvádějí ve své studii hodnoty CPM vyšší při stejném způsobu dojení. FL měla také průkazný vliv na PPM, což se shoduje s výsledky, jež uvádějí Sevi et al. (2000). Opět je nutno podotknout, že oproti výsledkům studie Seviho et al. (2000), kteří udávají průměrný PPM v měsíci květnu na úrovni 10^4 až 10^5 KTJ/ml, se námi zjištěné hodnoty PPM pohybují na úrovních podstatně nižších. Dále je možno konstatovat, že dynamiky změn CPM a PPM v průběhu laktace měly shodný trend, když mezi 75. a 132. dnem byl zjištěn v obou případech průkazný nárůst jejich počtů, nicméně následně mezi 132. a 190. dnem laktace byl zaznamenán průkazný pokles jejich počtů. Co se týká zhodnocení vlivu systematického efektu PL x FL, zde je možno obecně konstatovat, že tato interakce měla průkazný vliv pouze na PPM. Závěrem k výše uvedenému je také nutno doplnit, že námi zjištěné L.S.M. hodnoty CPM nepřekročily ani v jednom případě limitní hranici 1 500 000 KTJ/ml, kterou stanoví Nařízením evropského parlamentu a rady (ES) č. 853/2004.

PL nemělo v rámci našeho sledování průkazný vliv na PKB, což je v rozporu s výsledky Seviho et al. (2000), kteří ve své studii průkazný vliv PL na PKB zaznamenali. Naproti tomu FL měla průkazný vliv na PKB, stejné závěry publikovaly ve svých studiích také Sevi et al. (2000) a Sevi et al. (2004). Koliformní bakterie jakožto významné indikátory primární a sekundární kontaminace syrového mléka (Görner a Valík, 2004) se ve vzorcích mléka v rámci naší studie vyskytovaly pouze ojedinele, když 23 vzorků z 30 analyzovaných bylo na průkazkoliiformních bakterií negativní. PKB byl v průběhu laktace velmi vyrovnaný a to na obou laktacích PL2 i PL3. Stejně vyrovnaný trend hodnot na obou laktacích uvádějí ve své studii také Sevi et al. (2000), nicméně jimi zjištěné údaje jsou podstatně vyšší. Také Malá et al. (2010), zaznamenali při stejném způsobu dojení vyšší

průměrné hodnoty PKB. Vliv systematického efektu PL x FL na PKB nebyl zaznamenán, což dokládají také výsledky studie Seviho et al. (2000).

Přehled jednotlivých korelačních závislostí je uveden v tabulkách 3 a 4. Obecně je známo, že existuje vztah mezi PSB a mikrobiologickou kvalitou mléka, což také konstatují ve své studii Benciny a Pulina (1997). Toto tvrzení dokládají i výsledky naší studie, když mezi CPM a PSB byla zjištěna pozitivní a průkazná korelace (viz tabulka 4). Gonzalo et al. (2006) a Králíčková et al. (2011) ve svých studiích také konstatují, že s rostoucím CPM roste i PSB. Co se týká vzájemných vztahů mezi jednotlivými mikrobiologickými ukazateli kvality syrového ovčímho mléka, je možno konstatovat, že mezi všemi uvedenými ukazateli (viz tabulka 4) byly zjištěny pozitivní a průkazné korelace.

Tab. 2 L.S.M. a S.E.M. hodnoty počtu somatických buněk a bakterií v závislosti na pořadí a fázi laktace

	Průměrný den laktace	n	Pořadí laktace (PL)				Průkaznost		
			PL2		PL3		Pořadí laktace	Fáze laktace (FL)	PL x FL
			L.S.M.	S.E.M.	L.S.M.	S.E.M.			
PSB (10 ³ /ml)	75.	10	*		*				
	132.	10	76,20 ^a	26,97	114,30 ^a	72,90			
	190.	10	55,90 ^{ab}	43,73	117,40 ^a	143,52	*	*	NS
	celkem ¹		34,00 ^b	22,74	28,00 ^b	17,58			
			55,37	35,87	86,57	99,57			
CPM (KTJ/ml)	75.	10	*		**				
	132.	10	42,70 ^a	26,49	49,70 ^A	43,26			
	190.	10	133,50 ^b	144,66	150,30 ^B	112,36	NS	**	NS
	celkem ¹		41,20 ^a	65,86	31,50 ^A	27,45			
			72,47	99,93	77,17	86,93			
PPM (KTJ/ml)	75.	10			*				
	132.	10	6,10	5,74	5,50 ^{ab}	2,32			
	190.	10	15,90	24,31	45,50 ^a	61,04	NS	**	*
	celkem ¹		0,90	1,52	2,20 ^b	3,85			
			7,63	15,31	17,73	39,54			
PKB (KTJ/ml)	75.	10	*						
	132.	10	0,00 ^a	0,00	0,00	0,00			
	190.	10	0,90 ^b	1,45	0,80	1,03	NS	*	NS
	celkem ¹		0,00 ^a	0,00	0,50	1,27			
			0,30	0,92	0,43	0,97			

¹ průměrný počet somatických buněk a mikroorganismů za sledované období

L.S.M = nejbližší přibližná hodnota průměru; S.E.M. = střední chyba průměru

Mezi hodnotami v řádcích s rozdílnými písmeny (A, B, C) je statisticky vysoce průkazný ($P \leq 0,01$) rozdíl

Mezi hodnotami v řádcích s rozdílnými písmeny (a, b, c) je statisticky průkazný ($P \leq 0,05$) rozdíl

** ($P \leq 0,01$); * ($P \leq 0,05$); NS = není signifikantní

Tab. 3 Přehled korelačních závislostí (Pearsonovy korelace) mezi pořadím a fází laktace a vybranými ukazateli kvality ovčího mléka

	PSB	CPM	PPM	PKB
Pořadí laktace	0,21 *	0,03	0,17	0,07
Fáze laktace	-0,35 **	-0,04	-0,06	0,11

** ($P \leq 0,01$); * ($P \leq 0,05$)

Tab. 4 Přehled korelačních závislostí (Pearsonovy korelace) mezi jednotlivými ukazateli kvality ovčího mléka

	CPM	PPM	PKB
PSB	0,49 **	0,54 **	0,34 **
CPM		0,65 **	0,54 **
PPM			0,34 **

** ($P \leq 0,01$)

ZÁVĚR

Z výsledků našeho sledování vyplývá, že pořadí laktace mělo průkazný vliv pouze na počet somatických buněk, naproti tomu průkazný vliv tohoto faktoru na počty jednotlivých skupin mikroorganismů zaznamenán nebyl. Fáze laktace měla, oproti pořadí laktace, průkazný vliv na všechny námi sledované ukazatele kvality ovčího mléka. V rámci naší studie jsme sledovali také vliv interakce mezi pořadím a fází laktace (PL x FL) na počet somatických buněk (PSB) a počet mikroorganismů. Výše uvedený systematický efekt průkazně ovlivňoval pouze PSB. Dále byla zaznamenána pozitivní a průkazná korelace mezi pořadím laktace a PSB a negativní a průkazná korelace mezi fází laktace a PSB. Co se týká ostatních korelací mezi jednotlivými ukazateli kvality ovčího mléka, všechny korelace byly pozitivní a průkazné.

LITERATURA

Benciny R., Pulina G. (1997): The Quality of Sheep Milk: A Rewiew. Wool Technology and Sheep Breeding 45 (3), 182-220. ISSN 0043-7875/97

Bianchi L., Bolla A., Budelli E., Carovi A., Fazoli C., Pauselli M., Duranti E. (2004): Effect of Udder Health Status and Lactation Phase on the Characteristics of Sardinian Ewe Milk. Journal of Dairy Science, 87, 2401-2408.

Cempírková R., Lukášová J., Hejlová Š. (1997): Mikrobiologie potravin. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: s. 101

ČSN EN ISO 13366-2 Mléko - Stanovení počtu somatických buněk - Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje

ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ČSN ISO 6730 Mléko. Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie psychotrofních mikroorganismů. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 6,5 °C

ČSN ISO 5541/1 Mléko a mléčné výrobky. Stanovení počtu koliformních bakterií. Část 1: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

Dulin A.M., Paape M.J., Schultze W.D., Weinland B.T. (1983): Effect of Parity, Stage of Lactation, and Intramammary Infection on

Concentration of Somatic Cells and Cytoplasmic Particles in Goat Milk. *Journal of Dairy Science*, 66, 2426-2433

Gonzalo C., Carriedo J.A., Beneitez E., Juárez M.T., De La Fuente L.F., San Primitivo F. (2006): Short Communication: Bulk Tank Total

Bacterial Count in Dairy Sheep: Factors of Variation and Relationship with Somatic Cell Count. *Journal of Dairy science* 89, 549-552

Görner F., Valík, L. (2004): Aplikovaná mikrobiologie požívatin. Malé centrum v Bratislavě. ISBN 80-967064-9-7. 528 s.

Králíčková Š., Kuchtík J., Pokorná M., Kalhotka L., Filipčík R. (2011): Počty vybraných skupin mikroorganismů v syrovém ovčím mléce v průběhu laktace. *Animal Breeding*. ISBN 978-80-7375-446-4, 69-76

Králíčková Š., Konečná L., Pokorná M., Kuchtík J. (2011): Vzájemné vztahy mezi vybranými ukazateli složení a kvality ovčího mléka.

Sborník příspěvků XXXVII. Semináře o jakosti potravin a potravinových surovin - Ingrový dny. ISBN 978-80-7375-495-2, 178-183

Nařízením evropského parlamentu a rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.

Malá G., Švejcarová M., Knížek J., Peroutková J. (2010): Je mikrobiologická kvalita ovčího mléka ovlivněna způsobem dojení? Sborník referátů ze semináře farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VII, MENDELU v Brně: 37-38

Micari P., Caridi A., Colacino T., Caparra P., Cufaro A. (2002): Physicochemical, microbiological and coagulating properties of ewe's milk produces on the Calabrian Mount Poro plateau. *International Journal of Dairy Technology* 55, 204-210

Luengo C., Sanchez A., Corrales J.C., Fernandes C., Contreras A. (2004): Influence of Intramammary Infection and Non-infection Factors on Somatic Cell Counts in Dairy Goats. *Journal Dairy Research* 71, 169-174

Paape M.J., Wiggans G.R., Bannerman D.D., Thomas D.L., Sanders A.H., Contreras A., Moroni P., Miller R.H. (2006): Monitoring Goat and Sheep Milk Somatic Cell Counts. *Small Ruminant Research*, 68, 124-125

Raynal-Ljutovac K., Pirisi A., De Crémoux R., Gonzalo C. (2006): Somatic Cell of Goat and Sheep Milk: Analytical, Sanitary, Productive and technological aspects. *Small Ruminant Research* 68, 126-144

Sevi A., Albenzio M., Marino R., Santillo A., Muscio A. (2004): Effect of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research* 51, 251-259

Sevi A., Taibi L., Albenzio M., Muscio A., Annicchiarico G. (1999): Efect of Parity on Milk Yield, Composition, Somatic Cell Count,

Renneting Parameters and Bacteria Counts of Comisana Ewes. *Small Ruminant Research* 37, 99-107

Smetana P., Hlaváček J., Samková E., Rozsypal R. (2009): Metodika pro praxi: Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství. Bioinstitut, Olomouc. ISBN 978-80-904174-5-8. 21-24