

GROWTH OF IMPORTANT GROUPS OF MICROORGANISMS IN COW AND GOAT MILK

Němcová M, Kalhotka L.

Department of Agrochemistry, Soil Science, Microbiology and Plant Nutrition, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xnemco13@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of project was to identify growth of microorganisms in chosen samples of goat and cow pasteurized milk. Milk and milk products represent convenient environment for the growth of microorganisms which can positively or negatively influence the quality and biological value of the product by microbial metabolic activity.

Changes of microbial fermentative activity caused by proteolysis, lipolysis, alkaline reaction, milk-slime production, colour changing are ranged among main changes of milk caused by microorganisms.

Samples of goat and cow pasteurized milk were inoculated by chosen microorganisms as *Pseudomonas fluorescens*, *Enterococcus faecium* and *Escherichia coli*. The number of microorganisms was monitored in process of cultivation for 3 days on 6 °C, 25 °C and 30 °C according to the recommendation or standards.

Escherichia coli was cultivated on VRBL (Biokar Diagnostic, France) in 24 hours on 37 °C. *Pseudomonas Fluorescens* on PCA with skimmed milk (Biokar Diagnostic, France) in 72 hours on 30°C and *Enterococcus faecium* on COMPASS ENTEROCOCCUS AGAR (Biokar Diagnostic, France) in 24 hours on 44 °C. There was also made a check up where the total counts of microorganisms was set up on PCA medium with skimmed milk (Biokar Diagnostic, France) in 72 hours on 30°C.

It is evident that after 3 days of cultivation, when total counts of microorganism were compared with total counts of microorganisms of the check sample no matter variety of inoculated bacteria, the similar effect was reached. It depends on a variety of bacteria which is dominant in milk and what changes will happen. In both kinds of milk similar increase was noted although there is a possibility that goat milk represent a better substratum for microbial expansion.

Key words: mikroorganisms, goat pasteurized milk, cow pasteurized milk

ÚVOD

Mléko a mléčné výrobky představují vhodné prostředí pro růst mikroorganismů, které svojí metabolickou činností mohou ovlivnit příznivě nebo nepříznivě kvalitu a biologickou hodnotu výrobku (Griger, Holec, 1990). Mikroorganismy v mléce mohou vyvolat různé změny, které jsou závislé především na druhu mikroorganismu a na složce mléka, které tyto mikroorganismy rozkládají. Mezi hlavní změny, které vyvolávají mikroorganismy v mléce, patří změny vyvolané fermentační činností mikroorganismů, dále změny způsobené proteolýzou, lipolýzou, tvorbou alkalické reakce mléka, případně slizovatění mléka, změny barvy aj. (Cempírková et al., 1997).

Kozí mléko, stejně jako kravské patří mezi kaseinová mléka a v základní složení se mu i podobá. Bílkoviny resp. aminokyseliny obsažené v mléce jsou pro mikroorganismy zdrojem dusíku. Kozí mléko obsahuje nepatrně více minerálních látek, vyjádřených jako popeloviny, než mléko kravské, obsahy stopových prvků jsou podobné (Gajdůšek, 2002).

Tabulka č. 1 - Průměrné zastoupení základních složek kravského a kozího mléka (Gajdůšek, 2002)

Složka	Kravské mléko	Kozí mléko
Laktosa (%)	4,8	4,4
Tuk (%)	4,0	3,3
Celkové bílkoviny (%)	3,3	3,3
kasein	2,7	2,6
Popeloviny (%)	0,7	0,8
Vápník (mg/100 ml)	120	125
Fosfor (mg/100 ml)	92	97
Hořčík (mg/100 ml)	12	12
Draslík (mg/100 ml)	157	202
Sodík (mg/100 ml)	48	37
Vitamín A (mg/100 ml)	0,030	0,027
Vitamín B2 (mg/100 ml)	0,180	0,184
Vitamín B12 (mg/100 ml)	0,80	0,60
Vitamín C (mg/100 ml)	1,4	1,5
Vitamín D (mg/100 ml)	0,06	0,023
Vitamín E (mg/100 ml)	0,11	--

Mléčný tuk přežvýkavců obsahuje vysoký podíl mastných kyselin C₄ až C₁₀ (tabulka č. 2). Tukové kuličky v kozím mléce jsou mnohem menší než u kravského, proto tuk pomaleji vystává a je

snadněji stravitelný. Obaly tukových kuliček jsou mnohem křehčí, snadněji praskají, volný tuk je přístupný působení endogenních lipáz a zvyšuje se koncentrace volných mastných kyselin (Gajdůšek, 2002). Svým složením tedy mléko tvoří velmi dobré prostředí pro rozvoj mikroorganismů.

Mléko od zdravých dojnic obsahuje malý počet mikroorganismů. Počet mikroorganismů v mléce při opuštění vemene bývá 10^1 - 10^3 v 1 ml mléka. Po nadojení dochází ke značné změně původních mikroorganismů syrového mléka a to v důsledku kontaminace různého původu. Hlavním zdrojem kontaminace mléka po nadojení je ovzduší, dojící zařízení, vemeno, ruce pracovníků, ale i ostatní zdroje např. voda, hmyz apod. (Cempírková et al., 1997). Kontaminace mléka může pocházet jednak primárně přímo z nemocných zvířat a to i bez zjevných klinických příznaků, nebo může jít o sekundární kontaminaci nedodržením hygieny při získávání, uchovávání, přepravě a zpracovávání mléka. Görner et Valík (2004) uvádí, že by počty psychrotrofních bakterií v mléce neměly přesáhnout 50000 KTJ/ml, jako doplňkový údaj pro kravské mléko pak uvádí pro počty koliformních bakterií hodnoty nižší jak 1000 KTJ na ml. Celkové počty mikroorganismů by v syrovém kravském mléce neměly překročit 100000 KTJ v 1 ml. Nařízení ES č. 853/2004 udává pro syrové kozí mléko limit ≤ 1500000 resp. ≤ 500000 mikroorganismů na ml.

Tabulka č. 2 - Průměrné zastoupení vybraných aminokyselin a mastných kyselin v kozím a kravském mléce (Gajdůšek, 2002, Dičáková, 2005)

Složka	Kravské mléko	Kozí mléko
Histidin (mg/100 ml)	90,7	102
Fenylalanin (mg/100 ml)	113,8	158,0
Tyrozín (mg/100 ml)	130,3	158
Lyzin (mg/100 ml)	281,4	194,8
Arginin (mg/100 ml)	131,5	109,9
Glycin (mg/100 ml)	110,3	52,1
Izoleucin (mg/100 ml)	153,8	67,1
Kyselina másečná (%)	3,6	6,4
Kyselina kapronová (%)	2,3	3,1
Kyselina kaprylová (%)	1,3	1,8
Kyselina kaprinová (%)	2,7	9,6
Kyselina palmitová (%)	27,6	29,5
Kyselina stearová (%)	10,1	8
Kyselina olejová (%)	26	25,7
Kyselina linolová (%)	2,5	1,8
Kyselina linolenová (%)	0,4	0,3

Mezi významné mikrobiální kontaminanty mléka patří *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* a *Pseudomonas fluorescens*. Bakterie *Escherichia coli* jsou schopné fermentovat laktosu za vzniku kyseliny mléčné, kyseliny octové, oxidu uhličitého a vodíku (Görner et Valík, 2004; Hayes et Boor, 2001). Griger et Holec (1990) uvádí, že tyto mikroorganismy jsou součástí střevní mikroflóry lidí i zvířat. V mléce jsou proto *E. coli* a koliformní bakterie spolehlivým indikátorem primární a sekundární kontaminace, dále jsou spolehlivým indikátorem sanitace výrobního zařízení a indikují spolehlivost pasterizace. Enterokoky v potravinářské mikrobiologii na první pohled působí protichůdně. Ve fermentovaných potravinách mají probiotické vlastnosti, jsou schopny tvořit bakteriociny a jsou potřebné při zrání sýrů (Greifová et al., 2003). Naopak v nefermentovaných potravinách poukazují na nedostatečné zahřátí suroviny a na nedostatečnou sanitaci výrobního zařízení. (Görner et Valík, 2004). Jsou rovněž významnými producenty biogenních aminů, což jsou dusíkaté látky vznikající dekarboxylací volných aminokyselin. Významným kontaminantem mléka jsou rovněž psychrotrofní mikroorganismy, které jsou definované jako mikroorganismy schopné růst při teplotě 7 °C a nižší bez ohledu na jejich optimální teplotu růstu. Mléko z dobrých hygienických podmínek obsahuje méně než 10 % psychrotrofů z CPM. Ale počet psychrotrofů v mléce získaném v hygienicky nedostatečných podmínkách může být vyšší než 75-80 % z celkové mikroflóry (Burdová et Baranová, 2005). Jejich samotný růst v mléce nezpůsobuje vážné problémy, protože se většinou pasterací devitalizují (Burdová, 1998). Význam psychrotrofních mikroorganismů spočívá v tom, že produkují termostabilní extracelulární enzymy s proteolytickými a lypolitickými účinky, které se mohou podílet na degradaci některých složek mléka (Burdová, 1998; Griegr et Holec, 1990). Například bakterie s proteolytickými enzymy, štěpí a rozkládají bílkoviny za tvorby peptonu a peptidů, které se dále mohou rozkládat na amoniak, sirovodík, indol a skatol, biogenní aminy a jiné (Burdová O., 2000). Nejčastěji izolovaným rodem z mléka je r. *Pseudomonas*, potom r. *Flavobacterium* a r. *Alcaligenes* (Burdová, 1998).

CÍL

Cílem této práce bylo zjistit dynamiku růstu počtů vybraných druhů bakterií ve vzorcích kozího a kravského pasterovaného mléka.

ZPŮSOB ŘEŠENÍ - METODIKA

Lahvičky s 10 ml kozího nebo kravského pasterovaného mléka byly inokulovány bakteriemi *Pseudomonas fluorescens* (kravské mléko $1,12 \cdot 10^7$, kozí mléko $9,36 \cdot 10^8$), *Enterococcus faecium* (kravské mléko $5,5 \cdot 10^7$, kozí mléko $1,12 \cdot 10^8$) a *Escherichia coli* (kravské mléko $2,23 \cdot 10^7$, kozí mléko $1,39 \cdot 10^8$).

V průběhu jejich kultivace (3dny) při 6 °C, 25 °C a 30 °C byly podle norem nebo doporučení stanovovány jejich počty.

Escherichia coli byla kultivována na VRBL (Biokar Diagnostic, France) za 24 hodin při 37 °C. *Pseudomonas fluorescens* na PCA whit skimmet milk (Biokar Diagnostic, France) za 72 hod při 30°C a *Enterococcus faecium* na COMPASS ENTEROCOCCUS AGAR (Biokar Diagnostic, France) za 24 hodin při 44 °C. U kontrolních neinokulovaných vzorků mléka se stanovoval celkový počet mikroorganismů na PCA whit skimmet milk (Biokar Diagnostic, France) za 72 hod při 30 °C.

VÝSLEDKY

Ve vybraných vzorcích kozího a kravského pasterovaného mléka byly zjištěny počty mikroorganismů, které jsou uvedeny v tabulkách č. 5, 6, 7. Výchozí vzorky pasterovaného kozího a kravského mléka před inokulací vybranými mikroorganismy, obsahovaly relativně nízké počty mikroorganismů (viz tab. 4).

Pasterované kravské a kozí mléko bez inokulovaných mikroorganismů bylo použito jako kontrola (viz tabulka č. 3). Z výsledků je zřejmé, že již po 24 hodinách vzrostly počty CPM z 10^2 resp. 10^3 na 1 ml na hodnoty 10^6 až 10^7 na ml. Tento nárůst není v podstatě ovlivněn teplotou kultivace. Při 6°C budou však v mléce převládat psychrotrofní bakterie, byť jejich počet na počátku pokusu byl v mléce velmi malý. Množství koliformních bakterií v kontrole dosahovalo v průběhu sledování relativně nízkých hodnot, což je způsobeno buď nízkou kultivační teplotou (6 °C) nebo jsou bakterie potlačeny ostatní kontaminující mikroflórou (25 °C, 30 °C).

Velmi podobný trend můžeme sledovat i u enterokoků.

Výsledky sledování počtů jednotlivých druhů bakterií inokulovaných do kravského nebo kozího mléka při teplotách 6 °C, 25 °C a 30°C po dobu 3 dnů jsou uvedeny v tab. 5, 6, 7. *Pseudomonas fluorescens* (tab 5) byla inokulována do kravského mléka v množství cca 10^7 / ml a do kozího mléka v množství řádově 10^8 / ml. Vezmeme-li při porovnání v úvahu množství inokula je dynamika růstu této bakterie v obou vzorcích mléka podobná. Při 6°C se počty mikroorganismů pohybují velmi blízko stanovené hodnotě množství inokula a oscilují kolem této hodnoty v rozmezí 1 řádu. U ostatních teplot kultivace (25 °C a 30 °C) lze říci, že již po 24 hod nastává vzrůst počtů cca o jeden řád. Tyto počty se během kultivace v podstatě nemění. Velmi podobné hodnoty byly zjištěny též u *Escherichia coli* a u *Enterococcus faecium*. (viz. tab. 6 a 7). U *E.coli* při 6 °C byl v kravském i kozím mléce zaznamenán mírný pokles počtu bakterií nebo se hodnoty podstatně neměnily. U kultivace při 25 °C se počty *E.coli* v kravském mléce podstatně nemění a v kozím mléce se jejich množství zvyšuje z 10^8 na 10^9 v ml. Ve 30 °C lze pozorovat třetí den pokles počtu v obou druzích mléka vyvolaný pravděpodobně rychlejším metabolismem bakterií vedoucím k vyčerpání živin a nahromadění toxických metabolitů.

Počty bakterie *Enterococcus faecium* při 6 °C se v průběhu 72 hodin sledování příliš nemění a setrvávají prakticky na stejných hodnotách. Patrný je pouze pokles jejich počtu v porovnání s množstvím inokula. U 25 °C je patrný nárůst třetí den kultivace, jinak se ale hodnoty pohybují v rozmezí řádu v jakém byly do vzorku inokulovány.

Tabulka č. 3 - Počty mikroorganismů u kontrolního vzorku kravského a kozího mléka kultivované 3 dny při daných teplotách

Kontrola	dny	Kultivace při 6 °C		Kultivace při 25 °C		Kultivace při 30 °C	
		Kravské mléko	Kozí mléko	Kravské mléko	Kozí mléko	Kravské mléko	Kozí mléko
CPM		$1,01 \cdot 10^7$	$6,03 \cdot 10^6$	$2,87 \cdot 10^8$	$2,63 \cdot 10^8$	$2,72 \cdot 10^6$	$2,63 \cdot 10^8$
		$1,03 \cdot 10^7$	$5,82 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$	$3,15 \cdot 10^8$	$3,56 \cdot 10^7$	$3,55 \cdot 10^8$
		$8,69 \cdot 10^6$	$4,95 \cdot 10^7$	$1,78 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^8$	$2,53 \cdot 10^8$	$2,09 \cdot 10^8$
Koliformní MO		Méně jak 10	18	Méně jak 10	18	4	18
		Méně jak 10	4	Méně jak 10	4	4	18
		Méně jak 10	Méně jak 10	Méně jak 10	4	4	40
Enterokoky		22	4	15	13	9	45
		12	4	10	18	15	45
		13	13	13	18	80	45

Tabulka č. 4 - Počty mikroorganismů stanovené u pasterovaného kravského a kozího mléka

Počty mikroorganismů	Kravské mléko	Kozí mléko
Celkové počty mikroorganismů	212	1530
Psychrotrofní mikroorganismy	7	6
Koliformní mikroorganismy	14	1
Enterokoky	Méně jak 10	8

Tabulka č. 5 – Růst bakterie *Pseudomonas fluorescens* v kravském a kozím mléce

<i>Pseudomonas</i>	dny	Kultivace při 6 °C	Kultivace při 25 °C	Kultivace při 30 °C
Kravské mléko	1	$6,85 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^8$
	2	$6,38 \cdot 10^6$	$6,65 \cdot 10^8$	$4,8 \cdot 10^8$
	3	$1,55 \cdot 10^6$	$3,67 \cdot 10^8$	$8,14 \cdot 10^7$
Kozí mléko	1	$1,33 \cdot 10^7$	$2,66 \cdot 10^9$	$3,34 \cdot 10^9$
	2	$7,36 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^9$	$1,77 \cdot 10^9$
	3	$7,09 \cdot 10^9$	$1,77 \cdot 10^9$	$1,72 \cdot 10^9$

Tabulka č. 6 - Růst bakterie *Enterococcus faecium* v kravském a kozím mléce

<i>Enterococcus faecium</i>	dny	Kultivace při 6 °C	Kultivace při 25 °C	Kultivace při 30 °C
Kravské mléko	1	$5,58 \cdot 10^6$	$1,91 \cdot 10^7$	$4,82 \cdot 10^7$
	2	$3,66 \cdot 10^6$	$4,73 \cdot 10^7$	$9,45 \cdot 10^7$
	3	$4,03 \cdot 10^6$	$6,42 \cdot 10^8$	$6,23 \cdot 10^7$
Kozí mléko	1	$5,23 \cdot 10^6$	$5,53 \cdot 10^8$	$4,53 \cdot 10^8$
	2	$3,91 \cdot 10^6$	$1,96 \cdot 10^8$	$2,42 \cdot 10^8$
	3	$5,66 \cdot 10^6$	$8,65 \cdot 10^8$	$4,91 \cdot 10^8$

Tabulka č. 7 - Růst bakterie *Escherichia coli* v kravském a kozím mléce

<i>Escherichia coli</i>	dny	Kultivace při 6 °C	Kultivace při 25 °C	Kultivace při 30 °C
Kravské mléko	1	$1,45 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
	2	$3,63 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$	$1,04 \cdot 10^7$
	3	$4,5 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^7$	$9,1 \cdot 10^5$
Kozí mléko	1	$3,98 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^9$	$2,01 \cdot 10^8$
	2	$7,50 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^9$	$1,28 \cdot 10^9$
	3	$6,02 \cdot 10^7$	$1,22 \cdot 10^9$	$8,98 \cdot 10^8$

ZÁVĚR:

Pasterace při 72 °C po dobu asi 30 sekund není zákrok, který 100% zlikviduje veškerou mikroflóru mléka. Syrové kozí mléko bývá více kontaminováno, proto je i větší množství přežitých bakterií, byť jsou jejich počty relativně nízké.

Porovnáme-li počty mikroorganismů bez ohledu na druh inokulované bakterie s počty CPM u kontrolního vzorku je z tabulek patrné, že po 3 dnech kultivace je dosaženo velmi podobných hodnot a záleží pak na druhu bakterie, který v mléce převládá a jaké následné změny v mléce provede.

Už po 24 hodinách kultivace je v mléce velké množství bakterií, které se mohou podílet na kažení potravin a to bez rozdílu kultivačních teplot.

U obou druhů mléka je nárůst mikroorganismů podobný, přesto se však kozí mléko do jisté míry jeví jako lepší substrát pro rozvoj mikroorganismů

LITERATURA

BURDOVÁ O., *Kvalita mliečnych výrobkov v závislosti od mikrobiálnej kontaminácie surového mlieka*, Mliekarstvo 1998/29/ 4, s.44 - 45

BURDOVÁ O., *Hygiena surového mlieka určeného na výrobu sýrov*. Mliekastro 2000/31/3, s.4-5

BURDOVÁ O., BARANOVÁ M., *Vplyv technologicky nežiadúcej mikroflóry na kvalitu mlieka a mliečnych výrobkov*. Mliekarstvo 2005/36/2, s.18-20

CEMPÍRKOVÁ E., LUKÁŠOVÁ J., HEJLOVÁ Š., *Mikrobiologie potravin*, Skriptum Jihočeská univerzita, České Budějovice, 1997, s. 99-107

DÍČÁKOVÁ Z. et al, *Porovnanie aminokyselinového zloženia mlieka troch druhov hospodárskych zvíreat*, Mliekarstvo, 2005/36/2, s.28- 31

DUCKOVÁ V., ČANIGOVÁ M., *Psychrotrofná mikroflóra mlieka*. Mliekarstvo, 2004/35/3, s.32-35

GAJDŮŠEK S., *Laktologie*, Brno: MZLU, 2008, 84 s, ISBN 80- 7157- 657- 3

GÖRNER F., VALÍK Ľ., *Aplikovaná mikrobiológia potravín*, Bratislava: Male cetrum, ISBN: 80- 967064-9-7, s. 528

GRIEGR C., HOLEC., *Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov*, Bratislava: Príroda, 1990, s.39-49
ISBN 80- 07- 00253- 7

HAYES M. C., BOOR K., *Raw Milk and fluid milk products*. In. Marth E.H., Steele J.L., *Applied Dairy Microbiology*. New York, ISBN 0-8247-0536- X, s. s. 744

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 853/2004