

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

**Катедра „Качество и безопасност на храните и
ветеринарно законодателство“**

ДЕСИСЛАВА РУСЕВА БАНГИЕВА

**ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,
LISTERIA SPP. И *ESCHERICHIA COLI* В СУРОВО
КРАВЕ МЛЯКО И БЯЛО САЛАМУРЕНО СИРЕНЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА
И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ „ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНА ЕКСПЕРТИЗА“
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ 6.4. ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА
ОБЛАСТ НА ВИСШЕ ОБРАЗОВАНИЕ 6. АГРАРНИ НАУКИ И ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА**

Научен ръководител: доц. д-р Валентин Русев

СТАРА ЗАГОРА

2022 г.

Дисертационният труд е написан на 174 страници и е илюстриран с 10 фигури и 24 таблици. Библиографската справка включва 305 литературни източника, от които 20 на кирилица и 285 на латиница. Номерацията на включените в автореферата фигури, таблици и раздели не съответства на тази в дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден на 31.05.2022 г. от Разширен катедрен съвет, определен със заповед № 19/ 14.04.2022 г. на Декана на ВМФ при Тракийски университет и е насочен за защита пред научно жури.

Изказвам своята безгранична благодарност на Моето семейство и приятели за търпението и подкрепата!

Най-дълбока признателност и уважение дължа на своя научен ръководител доц. Валентин Русев за напътствията, отзивчивостта, доверието и моралната подкрепа при изготвянето на дисертационния труд.

Изказвам сърдечна благодарност на проф. Тодор Стоянчев за ценните съвети при разработването и осъществяването на микробиологичните и молекулярно-биологичните изследвания.

Благодаря на колектива на секция „Качество и безопасност на храните“ за полезните съвети, разбиране и безрезервна подкрепа.

Благодарна съм на екипа на Централна научно-изследователска лаборатория, Тракийски университет – Стара Загора, които ми оказаха съдействие при реализирането на някои от методиките, включени в този труд.

Д. Бангиева

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от часа в на Ветеринарномедицински факултет, при Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в отдел „Научен“ на ВМФ и интернет страницата на Тракийски университет: www.uni-sz.bg.

Съдържание:

1. УВОД.....	4
2. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ.....	5
2.1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	5
2.2. Материали и методи.....	6
2.2.1. Опитен материал.....	6
2.2.2. Опитна постановка.....	6
2.2.3. Вземане на проби.....	7
2.2.4. Методи за изследване на пробите сурово краве мляко и „домашен“ тип бяло саламурено сирене.....	8
2.2.5. Статистическа обработка на данните.....	15
2.3. РЕЗУЛТАТИ.....	16
2.3.1. Определяне на общия брой соматични клетки (ОБСК) в сурово краве мляко.....	16
2.3.2. Определяне на общия брой микроорганизми (ОБМ) в сурово краве мляко.....	18
2.3.3. Изолиране на <i>Staphylococcus aureus</i> в сурово краве мляко.....	19
2.3.4. Изолиране на <i>Listeria spp.</i> в сурово краве мляко.....	21
2.3.5. Изолиране на колиформи и <i>Escherichia coli</i> в сурово краве мляко.....	22
2.3.6. Определяне на микробиологичните показатели на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.....	24
2.3.7. Определяне на физикохимичните показатели при зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.....	30
2.3.8. Определяне на антибиотичната резистентност на изолати <i>Staphylococcus aureus</i> от сурово краве мляко.....	35
2.3.9. Определяне токсигенния потенциал на изолати <i>Staphylococcus aureus</i> от сурово краве мляко.....	39
3. ОБСЪЖДАНЕ.....	40
3.1. Общ брой соматични клетки и общ брой микроорганизми в сурово краве мляко.....	40
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria spp.</i> и <i>Escherichia coli</i> в сурово краве мляко.....	41
3.3. Преживяемост на <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria spp.</i> и <i>Escherichia coli</i> в „домашен“ тип бяло саламурено сирене по време на производство и зреене.....	43
3.4. Промени в съдържанието на натриев хлорид, водна активност, обща титруема киселинност и рН при зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене.....	46
3.5. Антибиотична резистентност при <i>Staphylococcus aureus</i> от изследваните проби сурово краве мляко.....	48
3.6. Способност за продукция на ентеротоксини от <i>Staphylococcus aureus</i> в изследваните проби сурово краве мляко.....	49
4. ИЗВОДИ.....	51
5. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА.....	52
6. ПРИНОСИ.....	53
7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СЪОБЩЕНИЯ И ЦИТИРАНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	54
8. SUMMARY.....	56

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

CFU – колония образуващи единици

PCR – полимеразна верижна реакция

ELISA – ензимно-свързан имуносорбентен анализ

ОБМ – общ брой микроорганизми

ОБСК – общ брой соматични клетки

БСС – бяло саламурено сирене

NaCl – натриев хлорид

a_w – водна активност

ОТК – обща титруема киселинност

1. УВОД

Млякото и млечните продукти са едни от основните храни, присъстващи в почти всяко едно домакинство. Млякото предоставя биологично пълноценни и напълно усвоими от човека вещества. Хипократ го определя като „най-съвършеният продукт на храненето“.

Поради състава си млякото и млечните продукти са благоприятна среда за развитие не само на полезни, но и на вредни микроорганизми, които могат да попаднат в резултат на вторична контаминация при различни етапи от производствения процес. Основните показатели за технологична хигиена и безопасност на храните са общият брой микроорганизми и наличието на опасна за човека микрофлора (*Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, позитивни на коагулаза стафилококи и техните ентеротоксини). Патогенните бактерии представляват сериозна заплаха за здравето на хората и са причина за около 90% от всички заболявания, провокирани от консумацията на мляко и млечни продукти.

Според Световната здравна организация всяка година в световен мащаб приблизително 600 милиона души (почти 1 на 10 души) се разболяват след консумация на замърсена храна, а 420 000 умират. Заболяванията, възникнали след консумация на контаминирана храна, възпрепятстват социално-икономическото развитие чрез пренатоварване на системите за здравеопазване и се отразяват негативно върху икономиката, туризма и търговията.

Разпространената напоследък амбулантна търговия с мляко и млечни продукти предизвиква допълнителни въпроси, свързани с техния произход и безопасност. Амбулантните търговци нямат достатъчно познания за безопасността на хранителните продукти, не поддържат добри хигиенни практики за производство и предлагане на храни, което силно застрашава общественото здраве.

Друг тревожен момент е нарастващата през годините бактериална устойчивост към антимикробни продукти по света, което затруднява третирането на някои болести при хората и животните. Редица проучвания в тази област отбелязват храната и животните като един от основните двигатели за пренасянето на антимикробна резистентност.

Развитието на млекопреработвателната промишленост е в пряка зависимост от постиженията на микробиологичното тестване на храните. Не е проучен въпросът за преживяемостта на патогените *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* в „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено ръчно в малки фамилни ферми по традиционна за региона технология. В тази връзка настоящият дисертационен труд е насочен към проучване върху безопасността на суровото краве мляко, обект на амбулантна търговия и „домашен“ тип бяло саламурено сирене в периода на зреене.

2. СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

2.1. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

С настоящия дисертационен труд си поставихме за цел да проучим наличието на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* в сурово краве мляко и тяхната преживяемост по време на производствения процес и зреенето на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.

За постигането на тази цел си поставихме следните задачи:

1. Да проучим безопасността на суровото краве мляко по показателите:
 - Общ брой соматични клетки;
 - Общ брой микроорганизми;
 - Наличие и количество на *Staphylococcus aureus*;
 - Наличие и количество на *Listeria spp.* и
 - Наличие и количество на *Escherichia coli*.
2. Да проучим преживяемостта на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* по време на производството и процеса на зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от:
 - сурово краве мляко и
 - термично обработено краве мляко.
3. Да проучим промените в съдържанието на натриев хлорид, водна активност, обща титруема киселинност и рН при зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от:
 - сурово краве мляко и
 - термично обработено краве мляко.
4. Да проучим изолатите *Staphylococcus aureus* от изследваните проби сурово краве мляко за:
 - антибиотична резистентност и
 - способност за продукция на ентеротоксини.

2.2. Материали и методи

2.2.1. Опитен материал

Обект на изследване бяха:

а) проби сурово краве мляко, закупени от кравеферми, търговски обекти (в т.ч. млекомати) и амбулантни търговци (Таблица № 1);

б) „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово краве мляко и термично обработено краве мляко.

Таблица № 1. Разпределение на получените проби сурово краве мляко.

	Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци	Общо
Благоевград	20	11	9	40
Смолян	21	13	16	50
София	22	20	8	50
Стара Загора	41	16	33	90
Хасково	13	16	31	60
Общо	117	76	97	290

2.2.2. Опитна постановка

За производството на партидите „домашен“ тип бяло саламурено сирене избрахме малка фамилна ферма на територията на област Хасково. За да се избегне кръстосана контаминация, помещението за производство на млечни продукти от „домашен“ тип представлява самостоятелна постройка, разположена извън сградите на фермата, в които се отглеждат животните. Опитните постановки бяха проведени в периода май-юли 2018 г., като за производството на сиренето се използва краве мляко от вечерното доене на животните.

2.2.2.1. Опитна постановка № 1 – „Домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово краве мляко

Непосредствено след издояване, 14 литра от все още топлото пълномаслено сурово мляко се поставиха в подходящ съд. При постоянно внимателно разбъркване към млякото с температура около $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ се прибави само сирищна мая (Аполон-69 ЕООД, град Троян, България) с активност 1:12 000 в количество 10-12 ml без закваска от стартерна култура. След разбъркване, млякото беше оставено в покой за подсирване (около 40 min) до образуване на плътен коагулум. Сиренината бе раздробена до кубчета с размери около 2 cm. За да отделят суроватката, сиренините кубчета останаха в покой около 30 min. Цедилката със сиренините кубчета се завърза в голяма

пита, която остана в покой за самоотцеждане на суроватката в продължение на 1-1,5 h. След отстраняване на цедилката върху оформения блок сиренина се постави плоскост и тежест с маса 3 kg. Пресоването продължи около 5 часа. Блокът пресована сиренина се нарязва с нож по шалбон с размери 10 x 10 cm за получаване на кубични форми. Оформиха се 8 бучки сирене с обща маса $2\ 000 \pm 100$ g, които бяха наредени в пластмасова кутия в два реда, като между тях се разпредели 200 g морска сол и след това се доля 1 l суроватка. Зреенето протече в сух термостат с охлаждане ТЛСО 80/80 с програмируем контролер RT08-L, COMECO при $10 \pm 2^\circ\text{C}$ в продължение на 45 дни.

2.2.2.2. *Опитна постановка № 2 – „Домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от термично обработено краве мляко*

От издоеното сурово пълномаслено мляко 14 литра се преляха в подходящ съд, който се постави на електрически котлон. Загряването продължи до постигане на температура в млякото 72°C . Котлонът се изключи, но съдът престоя върху него, докато млякото се охлади до температура на подсирване $32 \pm 2^\circ\text{C}$. За подсирване на млякото се използва само сирищна мая (Аполон-69 ЕООД, град Троян, България) с активност 1:12 000 в количество 10-12 ml без закваска от стартерна култура. След разбъркване, млякото беше оставено в покой за подсирване (около 40 min) до образуване на плътен коагулум. Сиренината бе раздробена до кубчета с размери около 2 cm. За да отделят суроватката, сиренините кубчета останаха в покой около 30 min. Цедилката със сиренините кубчета се завърза в голяма пита, която остана в покой за самоотцеждане на суроватката в продължение на 1-1,5 h. След отстраняване на цедилката върху оформения блок сиренина се постави плоскост и тежест с маса 3 kg. Пресоването продължи около 5 часа. Блокът пресована сиренина се нарязва с нож по шалбон с размери 10 x 10 cm за получаване на кубични форми. Оформиха се 8 бучки сирене с обща маса $2\ 000 \pm 100$ g, които бяха наредени в пластмасова кутия в два реда, като между тях се разпредели 130 g морска сол и след това се доля 1 l суроватка. Зреенето протече в сух термостат с охлаждане ТЛСО 80/80 с програмируем контролер RT08-L, COMECO при $10 \pm 2^\circ\text{C}$ в продължение на 45 дни.

2.2.3. Вземане на проби

2.2.3.1. *Вземане на проби от сурово краве мляко*

Пробите сурово краве мляко от кравеферми, търговски обекти (в т.ч. млекомати) и амбулантни търговци бяха получени в периода ноември 2016 г. – май 2018 г.

Пробите сурово краве мляко от фермите бяха взети от ваната за съхранение на млякото след предварително хомогенизиране чрез добро

разбъркване със стерилна бъркалка. Пробата се получаваше преди млякото да е достигнало състояние на покой с помощта на стерилна пипета в количество от 100 ml и се поставяше в стерилен контейнер без консервант.

Пробите от търговските обекти (в т.ч. млекомотите) представляваха закупената цяла неотворена опаковка сурово мляко, а от амбулантните търговци се предлагаше в пластмасови бутилки без здравна или идентификационна маркировка и като проба закупувахме цяла опаковка.

Идентификацията на пробите мляко се извършваше чрез поставяне на стикер с номер, дата и място на вземане на пробата. Всяка една проба се описваше обстойно в дневник.

Пробите мляко от търговските обекти (в т.ч. млекомати), амбулантната търговия и кравефермите се поставяха в хладилна чанта с охладители и се транспортираха до лабораторията на катедра „Качество и безопасност на храните и ветеринарно законодателство“ в рамките на деня, в който са взети.

2.2.3.2. Вземане на проби от „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко

Трикатни проби за доказване наличието на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* (~50 ml или g) бяха взети незабавно след доене на млякото, след формирането на сиренината и от сиренето в процеса на зреене: за сирене от сурово мляко на 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 14, 19, 24, 29, 33, 38 и 45 ден и за сирене от термично обработено мляко на 1, 2, 4, 9, 12, 17, 22, 26, 31, 36, 41 и 45 ден. Ден 1 съответства на неосоленото прясно сирене. Пробите бяха получени при спазване на всички изисквания за стерилност. Всяка отделна проба бе нарязана на парченца и поставена в стерилна петриева паничка. Така получените проби се използваха и за физикохимичните анализи.

2.2.4. Методи за изследване на пробите сурово краве мляко и „домашен“ тип бяло саламурено сирене

2.2.4.1. Определяне на общ брой соматични клетки (ОБСК)

Определянето на ОБСК се извърши съгласно изискванията на стандарта ISO 13366-1:2008 (Anonymous, 2008). На предметно стъкло се приготви препарат от 0,01 ml от изследваното мляко, който се остави на стайна температура до пълно изсушаване. Натривките бяха оцветени чрез потапяне в багрилния разтвор. Изброяването на клетъчните елементи се извърши чрез микроскоп, като се отчете броят на клетъчните ядра, които са ясно обособени. Клетъчното съдържание в 1 ml мляко се изчисли съгласно формулата, посочена в стандарта.

2.2.4.2. Микробиологични анализи

2.2.4.2.1. Културален метод за определяне на общ брой микроорганизми (ОБМ) в сурово краве мляко

Количественото определяне на общия брой микроорганизми бе извършено в съответствие с ISO 4833-1:2013 (Anonymous, 2013).

Хомогенизирането на пробите мляко, поставени в епруветки с Maximum Recovery Diluent (MRD) (Merck, Germany), беше извършено чрез разклащане на Vortex миксер VM-300 (Gemmy Industrial Corp., Taiwan). От получената стартова суспензия (10^{-1}) бяха приготвени десетократни степенни разреждания.

От основното разреждане и от всяко степенно разреждане бяха направени посеви с по 1 ml в по две стерилни празни петриеви панички и заляти с разтопен и охладен до 44-47°C Plate Count agar (Merck, Germany). С въртеливи движения пробата внимателно се смеси с разлетия агар.

След втвърдяване на хранителната среда, петрите бяха инкубирани при 30°C за 72 часа. Прораствалите колонии бяха изброени с помощта на брояч (Colony Counter 570, Suntex, Taiwan) и общият брой микроорганизми беше изчислен по следната формула:

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

където: N – брой на CFU в 1 ml проба; $\sum a$ – сума от изброените колонии във всички петри от две последователни разреждания; n_1 – брой петри от по-ниското разреждане; n_2 – брой петри от по-високото разреждане; d – степен на по-ниското разреждане.

2.2.4.2.2. Културален метод за определяне на *Staphylococcus aureus*

За количественото определяне на *Staphylococcus aureus* се използва техника за броене, следваща стъпките, заложи в ISO 6888-1:1999 (Anonymous, 1999).

Хомогенизирането на пробите мляко бе извършено по методиката, описана в точка 2.2.4.2.1. Пробите сирене, претеглени в торбичка за Stomacher, бяха хомогенизирани с помощта на перисталтичен хомогенизатор Stomacher® 400 Circulator (Seward, UK) за 1 min при 256 rpm⁻¹.

От първоначалния хомогенат бяха приготвени десетократни степенни разреждания. От основното разреждане и всяко следващо степенно разреждане с пипета бяха взети по 0,1 ml и прехвърлени върху повърхността на две петри с предварително разлят и втвърден Baird-Parker agar (base) (Merck, Germany), съдържащ жълтъчна емулсия и калиев телурит. Разстилането се извърши със стерилно бастунче на Дригалски. Посетите петри бяха инкубирани в термостат при 37°C за 48 часа.

След изтичане на периода на инкубиране се изброиха колонииите с типична за *Staphylococcus spp.* (черен цвят без зона на просветляване около колонията) и *Staphylococcus aureus* характеристика (черен цвят и просветляване на зоната около колонията).

2.2.4.2.3. Културален метод за определяне на *Listeria spp.*

Хомогенизирането на пробите сурово мляко и саламурено сирене, както и приготвянето на десетократни степенни разреждания бе извършено по методиките, описани в точки 2.2.4.2.1 и 2.2.4.2.2. От първоначалния хомогенат и всяко следващо степенно разреждане с пипета бяха взети по 0,1 ml и прехвърлени върху повърхността на две петри с предварително разлят и втвърден *Listeria agar (base)* acc. Ottaviani and Agosti (Merck, Germany). Разстилането бе извършено със стерилно бастунче на Дригалски. Посетите петри бяха инкубирани в термостат при 37°C за 48 часа.

След изтичане на периода на инкубиране се изброиха колонииите с типична за *Listeria spp.* характеристика (синьо-зелени колонии).

2.2.4.2.4. Културален метод за доказване на *Listeria monocytogenes* в „домашен“ тип бяло саламурено сирене

Културалното изследване за доказване наличието на *Listeria monocytogenes* бе извършено в съответствие с ISO 11290-1:1996 (Anonymous, 1996).

Пробите сирене (25 g) бяха хомогенизирани в 225 ml 1/2 (Half) Fraser Broth (Merck, Germany) с помощта на перисталтичен хомогенизатор Stomacher® 400 Circulator при 256 rpm⁻¹ за 1 min. Така подготвените проби бяха поставени в термостат и инкубирани при 30°C за 24 часа.

За обогатяване, 0,1 ml от предобогатената бактериална суспензия бе прехвърлен в епруветки, съдържащи 10 ml обогатителен бульон по Fraser (Merck, Germany) и инкубирани при 37°C за 24 часа.

От обогатената култура, с помощта на бактериологично ухо, бяха извършени посявки върху *Listeria agar (base)* acc. Ottaviani and Agosti (Merck, Germany) с прибавени селективни добавки ChromoCult® *Listeria Agar Selective-Supplement* (Merck, Germany) и ChromoCult® *Listeria Agar Enrichment-Supplement* (Merck, Germany), като посетите петри бяха инкубирани в термостат при 37°C за 24 часа.

При отчитане на резултата се наблюдаваше за наличието на колонии, показващи типична за *Listeria monocytogenes* характеристика (синьо-зелени колонии с фина просветлена зона около тях).

2.2.4.2.5. Културален метод за определяне на колиформи

Количественото определяне на колиформи бе извършено в съответствие с ISO 4832:2006 (Anonymous, 2006).

От приготвените в съответствие с точка 2.2.4.2.1 основно разреждане и десетократни степенни разреждания бяха направени посявки с по 1 ml в по две стерилни празни петри и заляти с разтопен и охладен до 44-47°C Violet Red Bile Lactose agar (VRB) (Merck, Germany). Пробата внимателно се размеси с разлетия агар чрез въртеливи движения. След застиване на агара се доля около 4 ml VRB агар. След втвърдяване на хранителната среда, петрите бяха инкубирани при 37°C за 24 часа. След изтичане на периода на инкубиране се изброиха колониите с типична за колиформи характеристика (червено-лилави колонии с диаметър не по-малък от 0,5 мм, някои оградени с червеникав ореол от преципитирали жлъчни соли).

2.2.4.2.6. Културален метод за определяне на *Escherichia coli*

За количественото определяне на *Escherichia coli* в сурово краве мляко се използваха първоначалния хомогенат и степенните разреждания от точка 2.2.4.2.1. Претеглянето, хомогенизирането и извършването на десетократни степенни разреждания за определяне броя на *Escherichia coli* в пробите бяло саламурено сирене се изпълни в съответствие с методиката от точка 2.2.4.2.2.

Със стерилна пипета от всяко едно разреждане бяха взети по 0,1 ml и прехвърлени върху повърхността на две петри с предварително разлят и втвърден Tryptone Bile X-glucuronide agar (Merck, Germany). Разстилането бе извършено със стерилно бастунче на Дригалски. Посетите петри бяха инкубирани при аеробни условия в термостат при 44°C за 24 часа. След изтичане на периода на инкубиране се изброиха колониите с типична за *Escherichia coli* характеристика (сини или синьо-зелени колонии). За потвърждаване на съмнителните колонии се направи препосявка върху ENDO agar (Merck, Germany). Посетите петри бяха инкубирани в термостат при 37°C за 24 часа.

2.2.4.3. Идентификация на изолатите, получени при културалните методи на изследване

2.2.4.3.1. Идентификация на микроорганизмите по колониалния растеж

При извършените бактериологични изследвания бяха избрани от 1 до 4 колонии с характеристики на целевите микроорганизми, които бяха многократно препосявани върху петриев панички с предварително разлят и втвърден Tryptic Soy agar (Merck, Germany) (за предполагаеми *Listeria spp.* и *Escherichia*

coli) и Baird-Parker agar (base) (Merck, Germany) (за предполагаеми *Staphylococcus aureus*) с цел получаване на чисти култури.

2.2.4.3.2. Видова идентификация на микроорганизмите от род *Staphylococcus*

Видовата идентификация на бактериите от род *Staphylococcus* бе проведена посредством оцветяване по Грам (HiMedia, India), каталазна реакция с 3% водороден прекис, доказване на плазмокоагулазна активност (Бул Био – НЦЗПБ, София, България) и PCR с видово специфични праймери. При провеждане на различните изпитвания с получените изолати, като положителна контрола беше използван референтен щам *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 6538), закупен от Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури (НБПМКК, гр. София).

Идентификация на микроорганизмите от род *Staphylococcus* чрез полимеразна верижна реакция (PCR)

В проучването бяха включени 561 изолата от сурово краве мляко и 116 изолата, получени от микробиологичните посеви при изследване на бяло саламурено сирене. Изолатите от пробите сурово краве мляко бяха разпределени, както следва: 214 изолата в суровото мляко от кравефермите, 152 изолата в пробите мляко от търговските обекти и 195 изолата в суровото мляко, обект на амбулантна търговия.

Екстракция на ДНК

Геномната ДНК се екстрахира чрез метод на варене. Пречистените изолати бяха съхранявани при -18°C в Tryptic Soy Broth (Merck, Germany) с глицерин и препосяти върху петри с Tryptic Soy agar (Merck, Germany) с цел активиране и намножаване на микроорганизма и получаване на 24-часова бактериална култура един ден преди самото изследване. От получените бактериални колонии се приготвяше бактериална суспензия в 500 μl дестилирана и дейонизирана вода, която се поставяше на кипяща водна баня в продължение на 15 min. След това суспензията се центрофугира при 14 000 rpm^{-1} за 10 min при 4°C . Част от супернатанта, съдържащ ДНК се прехвърли в микроепруветки тип Епендорф и се използва за провеждане на полимеразна верижна реакция.

Условия за провеждане на PCR

За провеждането на PCR анализа се използваха две двойки праймери, синтезирани от Eurofins Genomics (Germany) (Таблица № 2).

Таблица № 2. Праймери, използвани за откриване на 16S rRNA и nuc гени.

Ген	Праймер	Олигонуклеотидна секвенция (5'-3')	Големина на продукта (bp)	Литература
16S rRNA	16s rRNA forw. 16s rRNA rev.	GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC CGC ACA TCA GCG TCA G	228	Monday and Bohach (1999)
nuc	nuc forw. nuc rev.	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	279	Brakstad et al. (1992)

Реакционната смес за PCR беше с обем 20 µl и съдържаше: 1 µl от екстрахираната ДНК, 2 µl Reaction Buffer (Thermo Scientific, USA), 1,2 µl MgCl₂, 2 µl dNTPs, 0,1 µl от всеки праймер, 0,2 µl Taq DNA Polymerase (VWR International, Belgium) и 13,4 µl свободна от нуклеази вода. Полимеразната верижна реакция беше проведена в термосайкълър QB-96, Quanta Biotech при следната програма: първоначална денатурация при 94°C за 3 min, следвана от 35 цикъла на амплификация (денатурация при 94°C за 1 min, анелинг при 55°C за 2 min и екстензия при 72°C за 1,30 min), последвани от финална екстензия при 72°C за 7 min.

Разделянето на амплифицираните ДНК фрагменти стана посредством хоризонтална електрофореза в 2% агарозен гел (TopVision Agarose, Thermo Scientific) при 100 V за 1 час. Гелът беше оцветен с eqGREEN (VWR International, Belgium) и визуализиран и документиран с UV Transilluminator (ImageQuant 150, GE Healthcare). За определяне на молекулното тегло беше използван маркер Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

PCR анализът бе проведен в Централна научно-изследователска лаборатория при Тракийски университет, гр. Стара Загора.

2.2.4.3.3. Видова идентификация на *Listeria spp.* и *Escherichia coli*

Видовата идентификация на *Listeria spp.* и *Escherichia coli* включваше отчитане на колониалната характеристика, оцветяване по Грам (HiMedia, India) и следните биохимични тестове: ENTEROtest 24 N (Erba Lachema s.r.o., Brno, CZ) и HiMotility™ Biochemical Kit for *Listeria* (HiMedia, India), които се изпълниха съобразно инструкциите на производителя. При провеждане на проучванията, като еталони бяха използвани референтни щамове *Listeria innocua* (ATCC 33090) и *Escherichia coli* (ATCC 11775).

Като предполагаеми *Listeria spp.* бяха изследвани 148 изолата в суровото мляко от кравефермите, 152 изолата в пробите мляко от търговските обекти и 194 изолата, получени от амбулантната търговия.

Общо 600 изолата бяха подложени на потвърдителна идентификация за *Escherichia coli*, като от тях 234 изолата бяха в суровото мляко от кравефермите, 164 изолата в пробите мляко от търговските обекти и 202 изолата от амбулантната търговия на мляко.

Биохимичната идентификация на изолатите от бяло саламурено сирене беше проведена върху 180 предполагаеми за *Listeria spp.* изолати и 180 предполагаеми за *Escherichia coli* изолати.

2.2.4.4. Физикохимично изследване на „домашен“ тип бяло саламурено сирене

За определяне **количеството на натриев хлорид** в пробите сирене се използва методът на Мор в съответствие с БДС 8274-82 (Анонимен, 1982).

За **измерване на водна активност (a_w)** бе използван автоматичен анализатор Rotronic HygroLab (Rotronic AG, Bassersdorf, Switzerland). Пробите сирене бяха предварително нарязани на парченца с големина 4-5 mm и поставени в камерата на апарата. Върху така запълнената камера бе поставена мерителната сонда. Резултатите от всяко измерване бяха отчетени директно от дисплея на апарата.

Общата титруема киселинност се определи чрез метода на Тьорнер съгласно БДС 1111-80 (Анонимен, 1980).

За **измерване на рН** сиренето предварително се хомогенизира и темперира до стайна температура. За целта бе използван Sartorius Basic pH Meter със Sartorius PY-P10 ATC Combination Electrode (Goettingen, Germany).

Между отделните измервания по различните показатели всички проби бяха поставени в предварително надписани петриеви панички и съхранявани в хладилник при $6\pm 2^\circ\text{C}$.

2.2.4.5. Определяне на антибиотичната резистентност на изолати *Staphylococcus aureus*

За да се определи антибиотичната резистентност на изолатите *Staphylococcus aureus*, се използваха следните антибиотични дискове (HiMedia, India): Ampicillin 10 μg , Clindamycin 2 μg , Erythromycin 15 μg , Gentamicin 10 μg , Penicillin-G 10 Units, Ciprofloxacin 5 μg , Tetracycline 30 μg и Rifampicin 5 μg . При провеждане на изпитванията за антимикробна активност при получените изолати, като положителна контрола беше използван референтен щам *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923).

Изследването беше проведено с Mueller-Hinton agar (Merck, Germany), който се разливаше в еднократни стерилни петриеви панички с диаметър 90

mm. Потвърдените изолати *Staphylococcus aureus* се препосяха върху петри с Tryptic Soy agar (Merck, Germany) с цел активиране и размножаване на микроорганизма и получаване на 24-часова бактериална култура. От получените бактериални колонии се приготвяше суспензия в стерилен MRD (Merck, Germany) в концентрация 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml), измерена оптична плътност чрез нифелометър при 600 nm. След това, със стерилен памучен тампон се вземаше от суспензията и се щриховаше върху повърхността на разлетите с агар петри. Антибиотичните дискове се поставяха на повърхността на агара, след което петрите се инкубираха аеробно в термостат при температура $35 \pm 1^\circ\text{C}$ за 18 ± 2 часа.

Резистентността се определяше чрез измерване на зоната на инхибиране в mm, чрез милиметрова линия Antibiotic zonescale C (Ridacom). Резултатите се интерпретираха съгласно инструкциите, заложи в CLSI (2017) или EUCAST (2018).

2.2.4.6. Определяне на токсигенния потенциал на изолати *Staphylococcus aureus*

За определяне токсигенния потенциал на изолатите *Staphylococcus aureus* беше използван RIDASCREEN® SET Total ELISA kit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) за комбинирано откриване на стафилококови ентеротоксини А, В, С, D и Е в течни и твърди храни, както и в бактериални култури. При провеждане на тестването, като положителна контрола беше използван референтен щам *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923).

Изследването се проведе върху 180 изолата *Staphylococcus aureus*, получени от пробите сурово краве мляко ($n=180$) от областите Благоевград, Смолян и Стара Загора. Работеше се с предобогатени в Brain Heart Infusion broth (HiMedia, India) изолати, за да се гарантира оптимална продукция на ентеротоксини.

Отчитането на резултатите бе извършено с RT-2100C Microplate Reader (Rayto, China) при дължина на вълната 450/620 nm.

2.2.5. Статистическа обработка на данните

Средните стойности (\bar{x}), стандартното отклонение (SD), стандартната грешка на средната стойност (SEM) и достоверността на разликите (P) бяха установени с програмата GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, San Diego, CA). Еднопосочен анализ на дисперсията (ANOVA) беше използван за определяне на статистически значими разлики между групите. Използвахме корелация на Пирсън за анализиране на връзката между различните физикохимични параметри и броя на микроорганизмите.

2.3. РЕЗУЛТАТИ

2.3.1. Определяне на общия брой соматични клетки (ОБСК) в сурово краве мляко

Резултатите, получени за показателя общ брой соматични клетки в пробите сурово краве мляко, са представени в таблици № 3 и 4.

Таблица № 3. Дескриптивна статистика на общия брой соматични клетки в изследваните проби сурово краве мляко (клетки/ml).

Произход на суровото мляко		Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци
<i>n</i>		117	76	97
Благоевград	Mean ± SD	406 486 ± 190 703	327 909 ± 117 760	509 977 ± 194 233
	Min	177 149	194 836	243 995
	Max	881 572	581 907	832 015
Смолян	Mean ± SD	214 466 ± 71 694	228 021 ± 63 404	339 857 ± 168 043
	Min	111 589	145 517	78 640
	Max	401 762	315 032	649 497
София	Mean ± SD	276 957 ± 93 046	189 516 ± 50 484	437 657 ± 179 563
	Min	137 012	107 419	105 469
	Max	488 866	278 216	647 301
Стара Загора	Mean ± SD	276 261 ± 144 991	201 637 ± 66 643	300 710 ± 165 439
	Min	39 320	117 849	58 980
	Max	749 127	321 021	747 080
Хасково	Mean ± SD	237 264 ± 94 480	247 395 ± 154 955	321 828 ± 175 496
	Min	152 952	98 300	58 980
	Max	530 820	757 720	884 700
	Mean	283 228 ± 142 546*	230 870 ± 104 439	344 628 ± 181 035***

Статистически значима разлика: * (P<0,05), *** (P<0,001); *n* – брой изследвани проби

Средната стойност на показателя общ брой соматични клетки надвишава нормативно установения критерий от 400 000 клетки/ml в суровото краве мляко от амбулантните търговци (509 977 клетки/ml) и кравефермите (406 486 клетки/ml) в област Благоевград, както и при пробите мляко от амбулантните търговци в област София (437 657 клетки/ml).

Най-висока средна стойност за общ брой соматични клетки беше регистрирана за пробите сурово краве мляко от амбулантните търговци

(344 628 клетки/ml), следвана от тази за кравефермите (283 228 клетки/ml) и търговските обекти (230 870 клетки/ml). Статистически най-значима разлика получихме между средните стойности за ОБСК в пробите от амбулантните търговци и търговските обекти ($P < 0,001$), по-малка между средните резултати в пробите от амбулантните търговци и фермите ($P < 0,01$), и най-малка между търговските обекти и фермите ($P < 0,05$).

Средната стойност за общ брой соматични клетки в пробите сурово краве мляко от всички изследвани обекти е 290 044 клетки/ml, при минимална стойност от 39 320 клетки/ml и максимална стойност от 884 700 клетки/ml. Тази средна стойност показва, че суровото краве мляко отговаря на изискването за 400 000 допустим общ брой соматични клетки в 1 ml, но отчетената максимална стойност свидетелства за случаи на повече от двойно превишаване на тази норма.

Таблица № 4. Разпределение на резултатите при определяне на ОБСК в пробите сурово краве мляко от различните региони в България.

Произход на суровото мляко		$\leq 400\ 000/ml$		$> 400\ 000/ml$	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Благоевград	Кравеферми	12	60	8	40
	Търговски обекти	9	81,82	2	18,18
	Амбулантни търговци	3	33,33	6	66,67
Смолян	Кравеферми	20	95,24	1	4,76
	Търговски обекти	13	100	0	0
	Амбулантни търговци	10	62,50	6	37,50
София	Кравеферми	19	86,36	3	13,64
	Търговски обекти	20	100	0	0
	Амбулантни търговци	3	37,50	5	62,50
Стара Загора	Кравеферми	35	85,37	6	14,63
	Търговски обекти	16	100	0	0
	Амбулантни търговци	24	72,73	9	27,27
Хасково	Кравеферми	12	92,31	1	7,69
	Търговски обекти	15	93,75	1	6,25
	Амбулантни търговци	24	77,42	7	22,58
Общо		235	81,03%	55	18,97%

n – брой проби

От всички 290 изследвани проби сурово краве мляко, стойностите при 235 проби (81,03%) бяха под 400 000 клетки/ml, но при 55 проби (18,97%) те надвишаваха допустимите 400 000 клетки/ml. Най-висок процент проби, отговарящи на установения критерий до 400 000 клетки/ml, беше получен от кравефермите ($n=98$; 41,70%), следван от резултатът за търговските обекти ($n=73$; 31,06%) и амбулантните търговци ($n=64$; 27,24%). Най-висок процент проби, неотговарящи на регламентираните изисквания, се установи за

амбулантните търговци (n=33; 60%), следван от резултатът за кравефермите (n=19; 34,55%) и търговските обекти (n=3; 5,45%).

2.3.2. Определяне на общия брой микроорганизми (ОБМ) в сурово краве мляко

Резултатите за общия брой микроорганизми в пробите сурово краве мляко от обследваните обекти са представени в таблици № 5 и 6.

Таблица № 5. Дескриптивна статистика на общия брой микроорганизми (\log_{10} CFU/ml) в изследваните проби сурово краве мляко.

Произход на суровото мляко		Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци
<i>n</i>		117	76	97
Благоевград	Mean \pm SD	5,80 \pm 0,21	5,14 \pm 0,29	5,97 \pm 0,18
	Min	5,01	4,88	5,66
	Max	6,11	5,57	6,32
Смолян	Mean \pm SD	5,58 \pm 0,25	5,19 \pm 0,26	5,89 \pm 0,04
	Min	4,90	4,94	5,82
	Max	5,79	5,70	5,96
София	Mean \pm SD	5,57 \pm 0,26	4,93 \pm 0,09	5,96 \pm 0,41
	Min	5,07	4,69	5,38
	Max	5,91	5,06	6,85
Стара Загора	Mean \pm SD	5,31 \pm 0,48	4,97 \pm 0,24	6,02 \pm 0,61
	Min	4,61	4,64	4,94
	Max	6,94	5,74	8,11
Хасково	Mean \pm SD	5,05 \pm 0,12	5,06 \pm 0,15	5,93 \pm 0,43
	Min	4,78	4,88	5,41
	Max	5,20	5,37	7,20
	Mean	5,46 \pm 0,40^{***}	5,04 \pm 0,22^{***}	5,96 \pm 0,44^{***}

Статистически значима разлика: *** (P<0,001); n – брой изследвани проби

За всички изследвани проби сурово краве мляко (n=290) установихме средна стойност за общ брой микроорганизми от $5,52 \pm 0,52 \log_{10}$ CFU/ml. Най-висока средна стойност за ОБМ беше регистрирана за пробите сурово краве мляко от амбулантните търговци ($5,96 \pm 0,44 \log_{10}$ CFU/ml), следвана от тази за кравефермите ($5,46 \pm 0,40 \log_{10}$ CFU/ml) и търговските обекти ($5,04 \pm 0,22 \log_{10}$ CFU/ml). При сравняване на средните стойности на мезофилните аеробни микроорганизми, получени за различните обекти, се наблюдава значителна статистическа разлика (P<0,001).

Таблица № 6. Разпределение на резултатите при определяне на ОБМ в пробите сурово краве мляко от различните региони в България.

Произход на суровото мляко		≤ 100 000 CFU/ml		> 100 000 CFU/ml	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Благоевград	Кравеферми	0	0	20	100
	Търговски обекти	6	54,55	5	45,45
	Амбулантни търговци	0	0	9	100
Смолян	Кравеферми	1	4,76	20	95,24
	Търговски обекти	6	46,15	7	53,85
	Амбулантни търговци	0	0	16	100
София	Кравеферми	0	0	22	100
	Търговски обекти	15	75	5	25
	Амбулантни търговци	0	0	8	100
Стара Загора	Кравеферми	15	36,59	26	63,41
	Търговски обекти	12	75	4	25
	Амбулантни търговци	2	6,06	31	93,94
Хасково	Кравеферми	4	30,77	9	69,23
	Търговски обекти	5	31,25	11	68,75
	Амбулантни търговци	0	0	31	100
Общо		66	22,76%	224	77,24%

n – брой проби

От всички 290 проби сурово краве мляко, 22,76% отговарят на изискванията на Регламент (ЕО) № 853/2004 по отношение на общ брой микроорганизми, а 77,24% показват завишени стойности, но не се установиха значителни регионални вариации ($P > 0,05$).

Най-висок дял проби, отговарящи на установения критерий до 100 000 CFU/ml, беше получен от търговските обекти ($n=44$; 66,67%), следван от резултатът за кравефермите ($n=20$; 30,30%) и амбулантните търговци ($n=2$; 3,03%). Най-висок процент проби, неотговарящи на регламентираните изисквания за ОБМ, установихме за кравефермите ($n=97$; 43,30%), следван от резултатът за амбулантните търговци ($n=95$; 42,41%) и търговските обекти ($n=32$; 14,29%).

В област Стара Загора беше отчетен най-висок процент проби сурово краве мляко ($n=29$; 32,22%), отговарящи на изискванията за ОБМ, докато дялът на пробите сурово мляко, неотговарящи на изискванията за ОБМ, беше най-висок в област Смолян ($n=43$; 86%).

2.3.3. Изолиране на *Staphylococcus aureus* в сурово краве мляко

От всички изследвани проби сурово краве мляко ($n=290$) бяха изолирани и потвърдени микроорганизми от вид *Staphylococcus aureus*.

Извършената полимеразна верижна реакция (PCR) потвърди наличието на хромозомния *16S rRNA* (228 bp) и *nuc* гена (279 bp) при 199 изолата в суровото мляко от кравефермите, 135 изолата в пробите мляко от търговските обекти и 161 изолата в суровото мляко, обект на амбулантна търговия.

Таблица № 7. Дескриптивна статистика на броя *Staphylococcus aureus* (\log_{10} CFU/ml) в изследваните проби сурово краве мляко.

Произход на суровото мляко		Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци
<i>n</i>		117	76	97
Благоевград	Mean \pm SD	4,61 \pm 0,25	4,32 \pm 0,29	4,79 \pm 0,10
	Min	3,90	3,95	4,61
	Max	4,98	4,79	4,95
Смолян	Mean \pm SD	3,61 \pm 0,28	3,49 \pm 0,24	3,88 \pm 0,33
	Min	3,00	3,00	2,91
	Max	4,12	3,76	4,23
София	Mean \pm SD	3,74 \pm 0,23	3,42 \pm 0,17	4,03 \pm 0,14
	Min	3,20	3,00	3,73
	Max	4,21	3,63	4,15
Стара Загора	Mean \pm SD	3,57 \pm 0,27	3,41 \pm 0,19	3,79 \pm 0,35
	Min	2,94	2,89	3,18
	Max	4,15	3,68	4,67
Хасково	Mean \pm SD	3,30 \pm 0,31	3,42 \pm 0,43	3,97 \pm 0,57
	Min	2,71	2,89	3,04
	Max	3,89	4,43	5,50
	Mean	3,76 \pm 0,48*	3,56 \pm 0,42	3,97 \pm 0,49***

Статистически значима разлика: * (P<0,05), *** (P<0,001); *n* – брой изследвани проби

Броят на патогена в пробите сурово краве мляко варираше от минимум 2,71 \log_{10} CFU/ml до максимум 5,50 \log_{10} CFU/ml, със средна стойност 3,78 \pm 0,49 \log_{10} CFU/ml. В пробите мляко от амбулантните търговци в област Благоевград беше отчетена най-висока средна стойност за наличие на *Staphylococcus aureus* – 4,79 \pm 0,10 \log_{10} CFU/ml. Най-ниска средна стойност на *Staphylococcus aureus* бе регистрирана в пробите сурово краве мляко от кравефермите в област Хасково (3,30 \pm 0,31 \log_{10} CFU/ml).

За пробите сурово краве мляко от амбулантните търговци беше регистрирана най-висока средна стойност на изследвания патоген (3,97 \pm 0,49 \log_{10} CFU/ml), следвана от тази за кравефермите (3,76 \pm 0,48 \log_{10} CFU/ml) и търговските обекти (3,56 \pm 0,42 \log_{10} CFU/ml). Статистически най-значима разлика получихме между средните стойности за *Staphylococcus aureus* в пробите от търговските обекти и амбулантните търговци (P<0,001), по-малка между средните резултати в пробите от кравефермите и амбулантните търговци (P<0,01), и най-малка между търговските обекти и фермите (P<0,05).

Таблица № 8. Разпределение на резултатите при определяне на броя *Staphylococcus aureus* в пробите сурово краве мляко.

Произход на суровото мляко	n	≤ 5 log ₁₀ CFU/ml		> 5 log ₁₀ CFU/ml	
		n	%	n	%
Благоевград	40	40	100	0	-
Смолян	50	50	100	0	-
София	50	50	100	0	-
Стара Загора	90	90	100	0	-
Хасково	60	58	96,67	2	3,33
Общо	290	288	99,31%	2	0,69%

n – брой проби

От таблица № 8 се вижда, че от всички изследвани 290 проби сурово краве мляко, в едва 0,69% броят на *Staphylococcus aureus* надвишава 5 log₁₀ CFU/ml, което би довело до продукция на стафилококови ентеротоксини. Във всички останали проби (n=288) броят на патогена е под тази граница. Двете проби с установени нива на патогенния микроорганизъм над 5 log₁₀ CFU/ml са от амбулантна търговия в област Хасково.

2.3.4. Изолиране на *Listeria spp.* в сурово краве мляко

От всички изследвани 290 проби сурово краве мляко бяха изолирани представители на род *Listeria* с вариации в броя от минимум 2,49 log₁₀ CFU/ml до максимум 5,64 log₁₀ CFU/ml и средна стойност 3,91 ± 0,49 log₁₀ CFU/ml (Таблица № 9). Най-висока средна стойност за *Listeria spp.* (4,66 ± 0,46 log₁₀ CFU/ml) бе регистрирана за пробите сурово краве мляко от амбулантните търговци в област Благоевград, докато най-слаба обсемененост с *Listeria spp.* показаха пробите сурово краве мляко от търговските обекти в област Хасково – 3,43 ± 0,38 log₁₀ CFU/ml.

Най-висока средна стойност отчетохме за пробите сурово краве мляко от амбулантните търговци (4,10 ± 0,59 log₁₀ CFU/ml), следвана от тази за кравефермите (3,87 ± 0,42 log₁₀ CFU/ml) и търговските обекти (3,70 ± 0,35 log₁₀ CFU/ml). Статистически най-значима беше разликата между средните стойности, получени за *Listeria spp.* в пробите от търговските обекти и амбулантните търговци (P<0,001).

Таблица № 9. Дескриптивна статистика на броя *Listeria spp.* (\log_{10} CFU/ml) в изследваните проби сурово краве мляко.

Произход на суровото мляко		Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци
<i>n</i>		117	76	97
Благоевград	Mean \pm SD	4,47 \pm 0,31	4,25 \pm 0,38	4,66 \pm 0,46
	Min	3,96	3,64	4,08
	Max	5,48	4,85	5,62
Смолян	Mean \pm SD	3,72 \pm 0,24	3,69 \pm 0,20	4,07 \pm 0,23
	Min	3,30	3,31	3,36
	Max	4,22	3,99	4,34
София	Mean \pm SD	3,97 \pm 0,26	3,66 \pm 0,16	4,03 \pm 0,14
	Min	3,54	3,41	3,83
	Max	4,81	4,00	4,25
Стара Загора	Mean \pm SD	3,75 \pm 0,34	3,66 \pm 0,13	4,06 \pm 0,68
	Min	3,04	3,47	2,72
	Max	5,00	3,94	5,64
Хасково	Mean \pm SD	3,44 \pm 0,14	3,43 \pm 0,38	4,01 \pm 0,65
	Min	3,18	2,49	3,06
	Max	3,66	4,27	5,55
	Mean	3,87 \pm 0,42	3,70 \pm 0,35	4,10 \pm 0,59^{***}

Статистически значима разлика: *** ($P < 0,001$); *n* – брой изследвани проби

2.3.5. Изолиране на колиформи и *Escherichia coli* в сурово краве мляко

Броят на колиформите във всички 290 проби сурово краве мляко варираше от минимум 3,40 \log_{10} CFU/ml до максимум 5,95 \log_{10} CFU/ml, със средна стойност 4,30 \pm 0,47 \log_{10} CFU/ml. Данните от таблица № 10 показват, че най-висока средна стойност за колиформи се установява в пробите сурово краве мляко, взети от амбулантните търговци в област Благоевград (5,02 \pm 0,41 \log_{10} CFU/ml), докато най-слаба обсемененост установихме в пробите сурово краве мляко от кравефермите в област Хасково (3,74 \pm 0,14 \log_{10} CFU/ml).

Най-висока средна стойност за колиформни бактерии беше регистрирана за пробите сурово краве мляко от амбулантните търговци (4,45 \pm 0,55 \log_{10} CFU/ml), следвана от тази за кравефермите (4,30 \pm 0,45 \log_{10} CFU/ml) и търговските обекти (4,11 \pm 0,31 \log_{10} CFU/ml).

Пълното отсъствие на колиформи е почти невъзможно, предвид че те са известни като показател за биологично контаминиране. Въпреки по-обхватното значение на колиформите като индикатор за фекално замърсяване, ние изследвахме и стойностите на *Escherichia coli* в получените проби сурово краве мляко.

Таблица № 10. Дескриптивна статистика на броя колиформи (\log_{10} CFU/ml) в изследваните проби сурово краве мляко.

Произход на суровото мляко		Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци
<i>n</i>		117	76	97
Благоевград	Mean \pm SD	4,90 \pm 0,40	4,60 \pm 0,24	5,02 \pm 0,41
	Min	4,05	4,25	4,58
	Max	5,76	4,90	5,84
Смолян	Mean \pm SD	4,43 \pm 0,15	4,36 \pm 0,12	4,56 \pm 0,13
	Min	4,04	4,19	4,30
	Max	4,62	4,61	4,74
София	Mean \pm SD	4,18 \pm 0,12	4,01 \pm 0,08	4,41 \pm 0,28
	Min	3,96	3,89	4,07
	Max	4,38	4,15	5,02
Стара Загора	Mean \pm SD	4,17 \pm 0,41	4,05 \pm 0,18	4,47 \pm 0,55
	Min	3,49	3,55	3,86
	Max	5,86	4,31	5,83
Хасково	Mean \pm SD	3,74 \pm 0,14	3,78 \pm 0,20	4,23 \pm 0,66
	Min	3,48	3,53	3,40
	Max	3,94	4,28	5,95
	Mean	4,30 \pm 0,45	4,11 \pm 0,31	4,45 \pm 0,55**

Статистически значима разлика: ** ($P < 0,01$); *n* – брой изследвани проби

От всички изследвани проби сурово краве мляко ($n=290$) бяха изолирани и потвърдени микроорганизми от вида *Escherichia coli*. Броят им варираше от минимум 2,41 \log_{10} CFU/ml до максимум 5,54 \log_{10} CFU/ml, със средна стойност 3,71 \pm 0,57 \log_{10} CFU/ml.

От таблица № 11 се вижда, че най-висока средна стойност за *Escherichia coli* беше установена за пробите сурово краве мляко, получени от амбулантните търговци в област Благоевград (4,62 \pm 0,33 \log_{10} CFU/ml). Най-слаба контаминация с *Escherichia coli* бе отчетена в пробите сурово краве мляко от кравефермите в област Хасково – 3,07 \pm 0,18 \log_{10} CFU/ml.

Най-висока средна стойност за *Escherichia coli* показаха пробите сурово краве мляко от амбулантните търговци (3,87 \pm 0,58 \log_{10} CFU/ml), следвана от средната стойност за кравефермите (3,72 \pm 0,57 \log_{10} CFU/ml) и търговските обекти (3,48 \pm 0,46 \log_{10} CFU/ml). Статистически най-значима разлика получихме между средните стойности за *Escherichia coli* в пробите от търговските обекти и амбулантните търговци ($P < 0,001$) и по-малка между средните резултати в пробите от търговските обекти и кравефермите ($P < 0,01$). Не установихме статистически значима разлика между средните резултати за пробите от кравефермите и амбулантните търговци ($P > 0,05$).

Таблица № 11. Дескриптивна статистика на броя *Escherichia coli* (log₁₀ CFU/ml) в изследваните проби сурово краве мляко.

Произход на суровото мляко		Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци
<i>n</i>		117	76	97
Благоевград	Mean ± SD	4,59 ± 0,46	4,22 ± 0,38	4,62 ± 0,33
	Min	3,71	3,60	4,20
	Max	5,54	4,72	5,04
Смолян	Mean ± SD	3,81 ± 0,28	3,73 ± 0,25	4,06 ± 0,23
	Min	3,32	3,45	3,66
	Max	4,28	4,28	4,34
София	Mean ± SD	3,61 ± 0,30	3,27 ± 0,19	4,02 ± 0,34
	Min	2,97	2,95	3,68
	Max	4,08	3,54	4,76
Стара Загора	Mean ± SD	3,53 ± 0,43	3,42 ± 0,33	3,83 ± 0,52
	Min	2,60	2,76	2,95
	Max	4,76	3,89	5,18
Хасково	Mean ± SD	3,07 ± 0,18	3,08 ± 0,30	3,55 ± 0,63
	Min	2,77	2,67	2,41
	Max	3,37	3,84	5,42
	Mean	3,72 ± 0,57**	3,48 ± 0,46	3,87 ± 0,58***

Статистически значима разлика: ** (P<0,01), *** (P<0,001); *n* – брой изследвани проби

2.3.6. Определяне на микробиологичните показатели на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко

От таблица № 12 се вижда, че резултатите за суровото краве мляко, използвано при производството на сиренето от сурово мляко, показват значително по-висок (6,87 log₁₀ CFU/ml) от нормативно установения от Европейското законодателство (5 log₁₀ CFU/ml) общ брой микроорганизми, което е индикатор за лоша хигиена на млекодобива. Това подкрепят и резултатите за наличието и количеството на *Staphylococcus aureus* (3,56 log₁₀ CFU/ml), *Listeria spp.* (3,46 log₁₀ CFU/ml) и *Escherichia coli* (6,36 log₁₀ CFU/ml).

В сиренината броят на изследваните патогенни микроорганизми се увеличава: най-слабо при *Listeria spp.* (3,72 log₁₀ CFU/g), следва *Staphylococcus aureus* (4,95 log₁₀ CFU/g) и най-силно при *Escherichia coli* (7,80 log₁₀ CFU/g). В неосоленото прясно сирене количествата им нарастват още повече, но отново по-малко при *Listeria spp.* (4,12 log₁₀ CFU/g), по-значимо при *Staphylococcus aureus* (5,10 log₁₀ CFU/g) и най-съществено при *Escherichia coli* (8,01 log₁₀ CFU/g). Статистически се отбелязва значително повишение в броя на

Staphylococcus aureus, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* след началните технологични етапи от производството на сиренето ($P < 0,001$).

Таблица № 12. Резултати от микробиологичното изследване на суровото краве мляко, сиренината, неосоленото прясно сирене и зрялото сирене, произведени от сурово мляко (\log_{10} CFU/ml или CFU/g).

Показатели	Сурово краве мляко		Сиренина		Неосолено прясно сирене		Зряло сирене	
	<i>n</i>	Mean \pm SEM	<i>n</i>	Mean \pm SEM	<i>n</i>	Mean \pm SEM	<i>n</i>	Mean \pm SEM
ОБМ	3	6,87 \pm 0,01	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	3	3,56 \pm 0,07	3	4,95 \pm 0,01	3	5,10 \pm 0,04	3	2,54 \pm 0,07^{***}
<i>Listeria spp.</i>	3	3,46 \pm 0,08	3	3,72 \pm 0,06	3	4,12 \pm 0,02	3	2,73 \pm 0,03^{***}
<i>E. coli</i>	3	6,36 \pm 0,02	3	7,80 \pm 0,01	3	8,01 \pm 0,01	3	6,40 \pm 0,01^{***}

Статистически значима разлика: *** ($P < 0,001$) срещу неосолено прясно сирене; *n* – брой изследвани проби

При представяне на резултатите от микробиологичните анализи, проведени върху саламуреното сирене, произведено от сурово краве мляко, 45-дневният период на зреене беше разделен условно на три периода, всеки обхващащ по 2 седмици. През първите 2 седмици от зреенето на сиренето са представени средните стойности на получените резултати в периода между 2-ри и 14-ти ден, през вторите 2 седмици с период между 15-ти и 29-ти ден и през третите 2 седмици – между 30-ти и 45-ти ден (Таблица № 13).

Значим спад в нивата на *Staphylococcus aureus* се наблюдават през първите (2-14 ден) и последните седмици (30-45 ден) от периода на зреене на сиренето ($P < 0,01$). В зрялото сирене броят на патогенния микроорганизъм е 2,54 \log_{10} CFU/g, значително под първоначалното ниво в суровото мляко (3,56 \log_{10} CFU/ml). Тези резултати показват редукция с 2,56 \log_{10} CFU/g в броя на *Staphylococcus aureus* спрямо най-високия отчетен брой от 5,10 \log_{10} CFU/g в неосоленото прясно сирене и най-ниския в зрялото сирене – 2,54 \log_{10} CFU/g.

Таблица № 13. Резултати от микробиологичното изследване на сиренето, произведено от сурово краве мляко, през периода на зреене (\log_{10} CFU/g).

Показатели	През първите 2 седмици		През вторите 2 седмици		През третите 2 седмици	
	<i>n</i>	Mean \pm SEM	<i>n</i>	Mean \pm SEM	<i>n</i>	Mean \pm SEM
<i>S. aureus</i>	21	3,85 \pm 0,27	9	3,50 \pm 0,04	9	2,57 \pm 0,07^{**}
<i>Listeria spp.</i>	21	4,05 \pm 0,02	9	3,68 \pm 0,05^{***}	9	3,24 \pm 0,14^{***}
<i>E. coli</i>	21	7,59 \pm 0,04	9	7,03 \pm 0,05^{***}	9	6,67 \pm 0,07^{***}

Статистически значима разлика: ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$) срещу периода от първи 2 седмици; *n* – брой изследвани проби

Резултатите показват плавно, но съществено намаляване в броя на *Listeria spp.* ($P < 0,001$). В зрелия продукт количеството на *Listeria spp.* спада до 2,73 \log_{10} CFU/g, под първоначалното ниво в суровото мляко (3,46 \log_{10} CFU/ml).

Спрямо най-високото ниво от 4,12 log₁₀ CFU/g в неосоленото прясно сирене и най-ниското 2,73 log₁₀ CFU/g в зрелия продукт, отчетохме понижение с 1,39 log₁₀ CFU/g в броя на *Listeria spp.* (P<0,001). Патогенът *Listeria monocytogenes* не беше установен в пробите сурово мляко, използвано като суровина за производството на саламуреното сирене, сиренината, неосоленото прясно сирене, продукта през периода на зреене и готовото сирене.

Escherichia coli беше доминиращият по брой микроорганизъм в изследваните от нас проби. Резултатите показват статистически значимо намаляване в броя на патогена (P<0,001). В зрелия продукт броят на *Escherichia coli* достига до 6,40 log₁₀ CFU/g, малко над първоначалното ниво в суровото мляко (6,36 log₁₀ CFU/ml). Сравнявайки най-високото отчетено ниво от 8,01 log₁₀ CFU/g в неосолено прясно сирене и най-ниското от 6,40 log₁₀ CFU/g в зрелия продукт, установихме спад с 1,61 log₁₀ CFU/g в броя на *Escherichia coli* (P<0,001). Смуцаващ е резултатът за количеството на микроорганизма в зрялото сирене, което е дори малко по-високо от това в суровото мляко, използвано като суровина при неговото производство.

От таблица № 14 се вижда, че общият брой микроорганизми в суровото краве мляко, използвано при производството на саламуреното сирене от термично обработено мляко, е значително по-висок (6,48 ± 0,02 log₁₀ CFU/ml) от нормативно установената от Европейското законодателство пределна стойност (5 log₁₀ CFU/ml). Културалното изследване на суровото мляко, използвано за производство на саламуреното сирене, показва наличие на *Staphylococcus spp.* в количество от 3,89 log₁₀ CFU/ml, а на *Staphylococcus aureus* със стойност от 3,43 log₁₀ CFU/ml. Върху селективната хранителна среда липсваше характерен за *Staphylococcus aureus* растеж при изследване на пробите сиренина, неосолено прясно сирене и продукта по време на 45-дневния период на зреене.

Таблица № 14. Резултати от микробиологичното изследване на суровото краве мляко, сиренината, неосоленото прясно сирене и зрялото сирене, произведени от термично обработено мляко (log₁₀ CFU/ml или CFU/g).

Показатели	Сурово краве мляко		Сиренина		Неосолено прясно сирене		Зряло сирене	
	<i>n</i>	Mean ± SEM	<i>n</i>	Mean ± SEM	<i>n</i>	Mean ± SEM	<i>n</i>	Mean ± SEM
ОБМ	3	6,48 ± 0,02	-	-	-	-	-	-
<i>Staph. spp.</i>	3	3,89 ± 0,06	3	3,99 ± 0,02	3	5,02 ± 0,01***	3	4,95 ± 0,01***
<i>S. aureus</i>	3	3,43 ± 0,02	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria spp.</i>	3	3,93 ± 0,02	3	1,83 ± 0,09***	3	3,10 ± 0,07***	3	2,16 ± 0,15***
<i>E. coli</i>	3	6,33 ± 0,02	3	3,16 ± 0,02***	3	6,35 ± 0,03	3	3,85 ± 0,06***

Статистически значима разлика: *** (P<0,001) срещу сурово краве мляко; *n* – брой изследвани проби

В сиренината броят на *Staphylococcus spp.* се увеличава незначително (P>0,05) и по-съществено във все още неосоленото прясно сирене (P<0,001). В края на проучването, значително учеличение в нивата на *Staphylococcus spp.*

(4,95 log₁₀ CFU/g) се наблюдава при вече зрелия продукт в сравнение с броя му в суровото мляко, използвано при неговото производство (P<0,001).

В изследваните проби сурово краве мляко, използвано при производството на бяло саламурено сирене, беше отчетена средна стойност за *Listeria spp.* от 3,93 log₁₀ CFU/ml. След формиране на сиренината се отбеляза понижението на *Listeria spp.* с 2,10 log₁₀ (P<0,001). В неосоленото прясно сирене обаче се отчете значително повишаване нивата на *Listeria spp.* до 3,10 log₁₀ CFU/g (P<0,001). На 45-я ден от зреенето настъпи понижението на стойностите за *Listeria spp.* до 2,16 log₁₀ CFU/g, значително под първоначалното ниво в суровото мляко (P<0,001). Суровото мляко, използвано при производството на сиренето, сиренината, неосоленото прясно сирене и продукта през периода на зреене показаха отрицателен резултат за наличие на *Listeria monocytogenes*.

Escherichia coli отново се отличи като числено преобладаващият патоген (6,33 log₁₀ CFU/ml) в суровото краве мляко, използвано при производството на сирене. След формиране на сиренината се отчете двойно понижението в броя на микроорганизма до 3,16 log₁₀ CFU/g, но увеличението в неосоленото прясно сирене до 6,35 log₁₀ CFU/g. След приключване на 45-дневния период на зреене настъпи значителен спад в броя на *Escherichia coli* до 3,85 log₁₀ CFU/g (P<0,001), почти наполовина спрямо първоначално установеното в суровото мляко, използвано като суровина при производството на сиренето.

На таблица № 15 са представени средните стойности от резултатите за броя на изследваните микроорганизми по време на зреене на сиренето от термично обработено мляко. През първите 2 седмици от зреенето са представени средни стойности на получените резултати в периода между 2-ри и 12-ти ден, през вторите 2 седмици са отчетените резултати между 13-ти и 31-ви ден, а през третите 2 седмици – между 32-ри и 45-ти ден.

Таблица № 15. Резултати от микробиологичното изследване на сиренето, произведено от термично обработено краве мляко, през периода на зреене (log₁₀ CFU/g).

Показатели	Първи 2 седмици		Втори 2 седмици		Трети 2 седмици	
	<i>n</i>	Mean ± SEM	<i>n</i>	Mean ± SEM	<i>n</i>	Mean ± SEM
<i>Staph spp.</i>	12	5,38 ± 0,51	12	6,57 ± 0,09*	9	5,01 ± 0,02
<i>Listeria spp.</i>	12	3,46 ± 0,28	12	3,44 ± 0,05	9	2,44 ± 0,12**
<i>E. coli</i>	12	5,77 ± 0,20	12	5,20 ± 0,06*	9	4,37 ± 0,14***

Статистически значима разлика: * (P<0,05), ** (P<0,01), *** (P<0,001) срещу периода от първи 2 седмици; *n* – брой изследвани проби

На таблица № 15 се вижда незакономерно колебание в нивата на *Staphylococcus spp.* Статистическата обработка на данните отчита значително повишаване в броя на *Staphylococcus spp.* през вторите две седмици от зреенето (P<0,05). Тази тенденция обаче не се запазва през последните 2 седмици, когато настъпва спад с 1,56 log₁₀ CFU/g (P<0,01), но средната

стойност през този период не се отличава съществено от отчетената през началните две седмици от зреенето на сиренето ($P>0,05$).

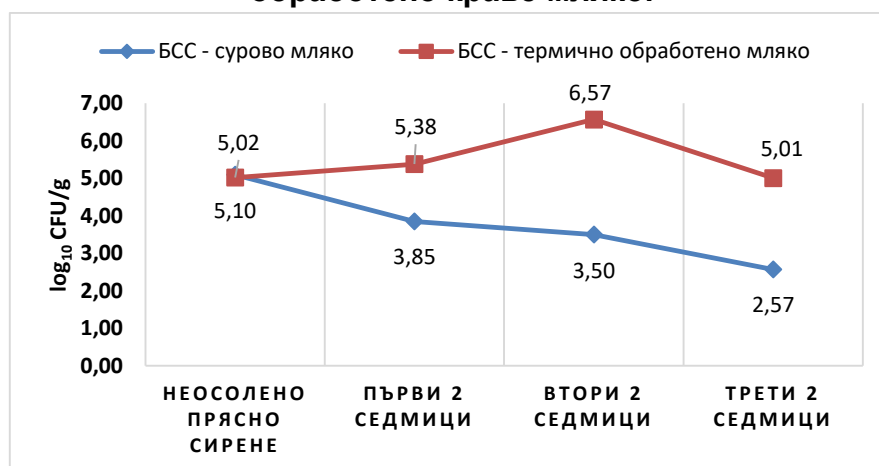
Резултатите за средните стойности на *Listeria spp.* през първия и втория период на зреене почти не се различават ($P>0,05$), но показват плавно намаляване в броя на *Listeria spp.* ($P<0,01$) през 45-дневния период на зреене на сиренето.

Стойностите за броя на *Escherichia coli* отново се отличиха като най-високи сред изследваните микроорганизми, но подобно на *Listeria spp.* плавно намаляват по време на зреене на сиренето. Резултатите показват понижаване в броя на *Escherichia coli* с $1,4 \log_{10}$ CFU/g между първите и последните две седмици на зреенето ($P<0,001$).

Фигури 1, 2 и 3 отразяват промените в броя на *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* при зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.

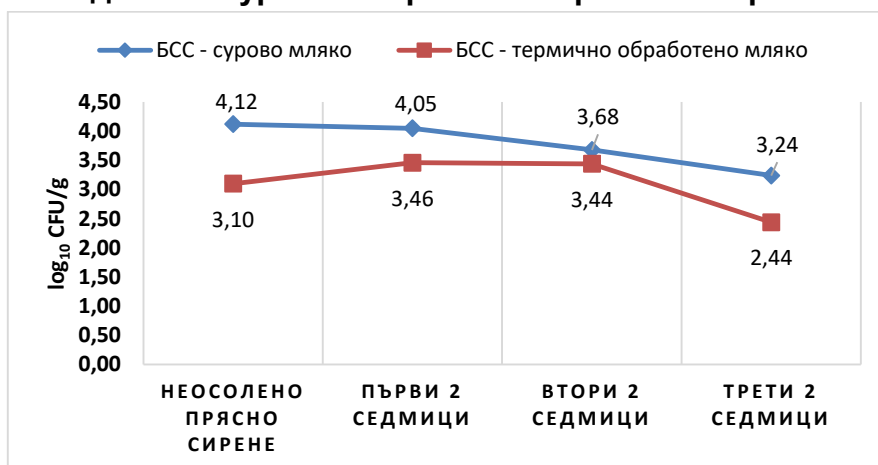
От фигура 1 е видно плавно понижаване в броя на *Staphylococcus aureus* по време на зреене на саламуреното сирене, произведено от сурово мляко. В процеса на зреене на бялото саламурено сирене, произведено от термично обработено мляко, се наблюдава незакономерна динамика в стойностите за броя на *Staphylococcus spp.*

Фиг. 1. Динамика в броя на *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus spp.* при зреене на сиренето, произведено съответно от сурово и термично обработено краве мляко.



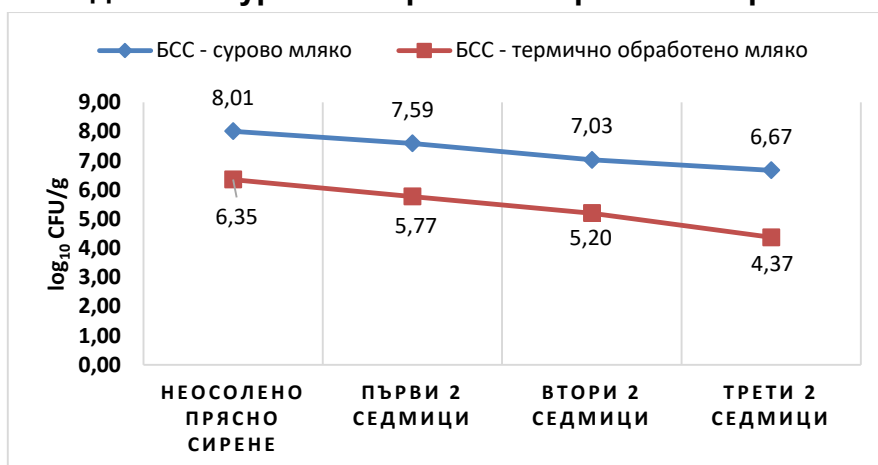
От графично представените данни се виждат по-високите стойности и тяхното колебание към нарастване и последващ спад почти до изходното ниво в броя на *Staphylococcus spp.* по време на зреене на саламуреното сирене от термично обработено мляко.

Фиг. 2. Динамика в броя на *Listeria spp.* при зреене на сиренето, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.



От фигура 2 се вижда понижение в броя на *Listeria spp.* по време на зреене на сиренето, произведено както от сурово, така и от термично обработено мляко. В сиренето от термично обработено мляко се наблюдава незакономерно движение на стойностите за броя на *Listeria spp.*, но и се установява по-ниска средна стойност в края на изследвания период на зреене.

Фиг. 3. Динамика в броя на *Escherichia coli* при зреене на сиренето, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.



Графично представените резултатите на фигура 3 показват плавното понижение в броя на *Escherichia coli* и при двете партии саламурено сирене. Правят впечатление по-високите стойности за броя на *Escherichia coli* в сиренето, получено от сурово мляко, както и по-ниските стойности през финалния период на зреене при сиренето от термично обработено мляко.

2.3.7. Определяне на физикохимичните показатели при зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко

На таблица № 16 са представени средните стойности на получените резултати от физикохимичното изследване на саламуреното сирене от сурово мляко. Първите 2 седмици от зреенето обхващат периода между 2-ри и 14-ти ден, през вторите 2 седмици са отчетените резултати между 15-ти и 29-ти ден, а през третите 2 седмици – между 30-ти и 45-ти ден.

От данните в таблица № 16 се вижда, че неосоленото сирене съдържа едва 0,12% NaCl. През втория период на зреене средната стойност на показателя достига най-висока концентрация от 5,53%. Тенденцията, която се наблюдава през цялото изследване е значително нарастване ($P < 0,01$) на съдържанието на готварска сол, за да достигне стойност от 4,93% в зрелия 45 дни продукт.

Водната активност в зреещото сирене плавно, но значително намалява ($P < 0,001$). Най-значително намаление в стойността на показателя се отбелязва през втория период на зреене, като достигна до 0,935 ($P < 0,001$). Измерената водна активност през последните 2 седмици (0,931) от зреенето не показва съществено понижение спрямо предходния период ($P > 0,05$), като в зрялото 45 дни сирене стойността на изследвания параметър беше 0,927.

Таблица № 16. Резултати по показателите съдържание на натриев хлорид, водна активност (a_w), обща титруема киселинност (ОТК) и рН на сиренето, произведено от сурово краве мляко.

Показатели		NaCl %	a_w	ОТК (°Т)	рН
Неосолено прясно сирене	<i>n</i>	3	3	3	3
	Mean ± SEM	0,12 ± 0,00	0,979 ± 0,006	92 ± 0,41	6,00 ± 0,00
През първите 2 седмици	<i>n</i>	21	21	21	21
	Mean ± SEM	4,33 ± 0,16^{***}	0,959 ± 0,003	106 ± 3,96	6,62 ± 0,02
През вторите 2 седмици	<i>n</i>	9	9	9	9
	Mean ± SEM	5,53 ± 0,14^{***}	0,935 ± 0,003^{***}	115 ± 1,99	5,57 ± 0,03
През третите 2 седмици	<i>n</i>	9	9	9	9
	Mean ± SEM	5,15 ± 0,06^{**}	0,931 ± 0,002^{***}	148 ± 2,21^{***}	5,47 ± 0,02^{**}
Зряло сирене	<i>n</i>	3	3	3	3
	Mean ± SEM	4,93 ± 0,05	0,927 ± 0,001	153 ± 2,65	5,42 ± 0,02

Статистически значима разлика: ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$); *n* – брой изследвани проби

Средната стойност на общата титруема киселинност в неосоленото сирене беше 92°Т, показвайки незначително повишение до 106°Т през първите 2 седмици от зреенето. Тази тенденция на слабо повишаване се запази и през следващия период. Едва през финалния етап от 45-дневния период на зреене се отчете по-сериозно нарастване на общата титруема киселинност до 148°Т. При сравняване на средните стойности на показателя през трите периода от зреенето, се установи статистически значима разлика в резултатите, отчетени в началото и в края на периода от 45 дни ($P < 0,001$).

Пряското неосолено сирене на първия ден от производството показва средна стойност за активна киселинност (рН) 6,00. През първия период на зреене средната стойност на показателя нарасна незначително до 6,62 и слабо се понижи през вторите 2 седмици от зреенето до 5,57. Това продължи и през следващия период на изследването, когато рН достигна средна стойност от 5,47. Анализът на данните показва съществено понижение на рН ($P < 0,01$) до стойност от 5,42 в зрелия 45 дни продукт.

Данните от физикохимичните анализи, проведени върху сиренето от термично обработено мляко през 45-дневния период на зреене, са разделени условно на три периода, всеки обхващащ по 2 седмици. През първите 2 седмици от зреенето са представени средните стойности на получените резултати в периода между 2-ри и 12-ти ден, през вторите 2 седмици са отчетените резултати между 13-ти и 31-ви ден, а през третите 2 седмици – между 32-ри и 45-ти ден.

Таблица № 17. Резултати по показателите съдържание на натриев хлорид, водна активност (a_w), обща титруема киселинност (ОТК) и рН на сиренето, произведено от термично обработено краве мляко.

Показатели		NaCl %	a_w	ОТК (°Т)	рН
Неосолено прясно сирене	<i>n</i>	3	3	3	3
	Mean ± SEM	0,22 ± 0,01	0,981 ± 0,003	36 ± 0,33	6,93 ± 0,01
През първите 2 седмици	<i>n</i>	12	12	12	12
	Mean ± SEM	4,98 ± 0,05***	0,968 ± 0,005*	30 ± 1,69	6,63 ± 0,11
През вторите 2 седмици	<i>n</i>	12	12	12	12
	Mean ± SEM	5,51 ± 0,10***	0,934 ± 0,002***	62 ± 2,25***	6,05 ± 0,06***
През третите 2 седмици	<i>n</i>	9	9	9	9
	Mean ± SEM	5,05 ± 0,05***	0,927 ± 0,002***	117 ± 2,83***	5,70 ± 0,03***
Зряло сирене	<i>n</i>	3	3	3	3
	Mean ± SEM	4,87 ± 0,03	0,924 ± 0,001	128 ± 1,20	5,60 ± 0,03

Статистически значима разлика: * ($P < 0,05$), *** ($P < 0,001$); *n* – брой изследвани проби

От данните в таблица № 17 става ясно, че съдържанието на готварска сол значително нараства по време на зреене. В неосоленото прясно сирене отчетохме най-ниска концентрация на NaCl – едва 0,22%. През началния период от зреенето се отбелязва значително повишение на готварската сол, като средната стойност достигна 4,98% ($P < 0,001$). През вторите 2 седмици от периода на зреене се регистрираха най-високи нива от 5,51% NaCl, но през финалните 2 седмици от зреенето наблюдавахме плавно понижение до 5,05%, за да достигне стойност от 4,87% в зрелия 45 дни продукт.

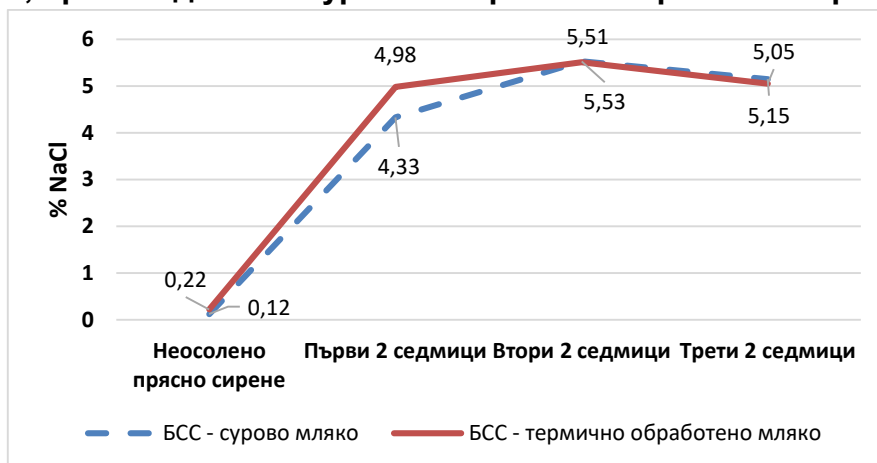
Показателят водна активност показва плавно, но значително понижение през 45-дневния период на зреене ($P < 0,001$). През първите 2 седмици от зреенето средната стойност се понижи до 0,968. Значително намаляване в стойността на показателя се отбелязва и през втория период от 2 седмици, като достигна до 0,934 ($P < 0,001$). Измерената водна активност през последните 2 седмици (0,927) от зреенето не показва съществено понижение спрямо предходния период ($P > 0,05$), като в зрялото 45 дни сирене стойността спадна до 0,924.

Сравнението между средните стойности на показателя обща титруема киселинност, отчетени в началото и в края на периода на зреене, показва статистически значима разлика ($P < 0,001$). Едва през финалния етап от зреенето средната стойност на показателя се увеличи по-сериозно до 117°Т. От данните в таблица № 17 е видно, че общата титруема киселинност на зрялото 45 дни сирене е по-висока (128°Т) от средната, отчетена през финалния период на зреене.

По време на зреенето се забелязва тенденция към плавно, но значително понижение в стойностите на активната киселинност (pH) ($P < 0,001$). През първия период средната стойност на pH се понижи незначително до 6,63. През вторите 2 седмици намаля до 6,05, а през финалните 2 седмици до края на зреенето спадна до 5,70. В зрялото сирене отчетохме pH от 5,60.

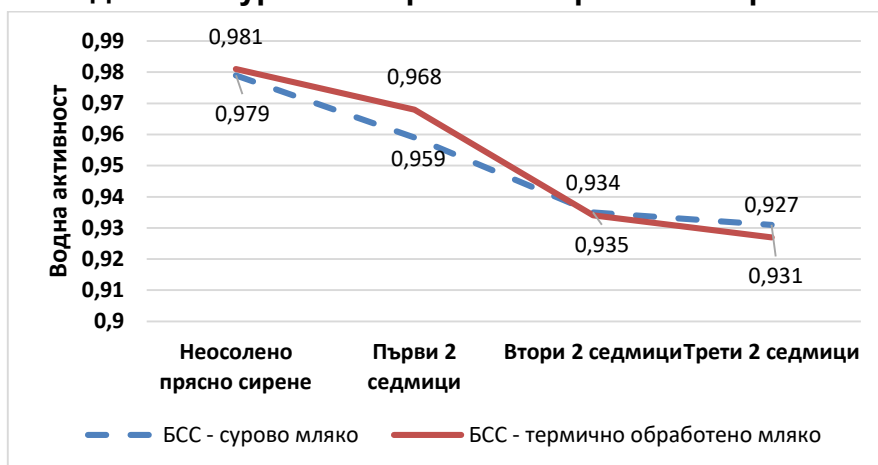
Фигури 4 отразява промените в съдържанието на NaCl при зреене на сирената, произведени от сурово и от термично обработено краве мляко.

Фиг. 4. Динамика в съдържанието на натриев хлорид при зреене на сиренето, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.



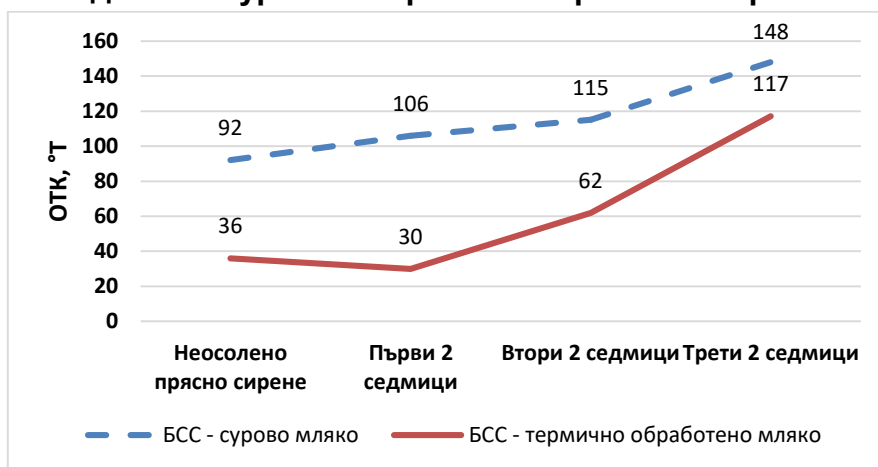
От фигура 4 се вижда ниското и почти сходно съдържание на натриев хлорид в неосоленото прясно сирене, произведено от сурово (0,12%) и термично обработено (0,22%) краве мляко. През целия период на зреене правят впечатление почти сходните средни стойности на показателя, показващи тенденция за чувствително нарастване.

Фиг. 5. Динамика във водната активност при зреене на сиренето, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.



Данните на фигура 5 показват понижаване в стойностите на водната активност в зреещото сирене от сурово и от термично обработено краве мляко. По време на периода на зреене се отчитат почти еднакви средни стойности за показателя. Най-високи са средните стойности в неосоленото прясно сирене, които отбелязват съществен спад в хода на зреене, за да достигнат почти сходни стойности в зрялото 45 дни сирене.

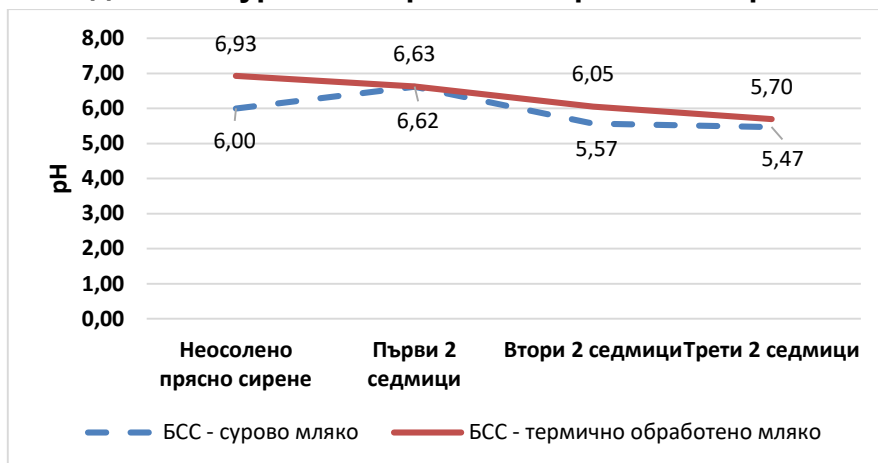
Фиг. 6. Динамика в общата титруема киселинност при зреене на сиренето, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.



От фигура 6 се вижда, че стойността на общата титруема киселинност в неосоленото прясно сирене, получено от сурово мляко, е близо три пъти по-висока (92°Т) от тази в неосоленото прясно сирене, произведено от термично

обработено мляко (36°Т). По време на периода на зреене се отчита повишаване на титруемата киселинност и при двете партии сирене, като достига своя пик през финалните 2 седмици от зреенето. Прави впечатление, че общата титруема киселинност на зрялото саламурено сирене, получено от сурово мляко, е значително по-висока от тази на зрялото сирене, произведено от термично обработено мляко.

Фиг. 7. Динамика в активната киселинност (pH) при зреене на сиренето, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.



Данните на фигура 7 показват, че активната киселинност в неосоленото прясно сирене от сурово мляко е по-ниска (pH 6,00) от тази в неосоленото прясно сирене, произведено от термично обработено мляко (pH 6,93). По време на зреене на сиренето от термично обработено мляко се забелязва тенденция към плавно и значително понижаване на pH, докато при сиренето от сурово мляко се наблюдава понижаване, но с известни колебания в стойностите.

При статистическата обработка на данните от изследването на сиренето от сурово мляко, установихме отрицателна корелационна зависимост между съдържанието на NaCl и броя на *Listeria spp.* ($r=-0,487$; $P<0,01$) и *Escherichia coli* ($r=-0,723$; $P<0,0001$). Коефициентът на корелация на Пирсън показва положителна корелационна зависимост между понижаването на водната активност и намаляването в броя на *Listeria spp.* ($r=0,676$; $P<0,0001$) и *Escherichia coli* ($r=0,778$; $P<0,0001$), което показва същественото влияние на този показател върху растежа и преживяемостта на посочените микроорганизми при зреене на саламуреното сирене. Отчетохме отрицателна корелационна зависимост между общата титруема киселинност и броя на *Listeria spp.* ($r=-0,700$; $P<0,0001$) и *Escherichia coli* ($r=-0,801$; $P<0,0001$). Наблюдавахме положителна корелация на pH с броя на *Staphylococcus aureus* ($r=0,501$; $P<0,01$), *Listeria spp.* ($r=0,589$; $P<0,0001$) и *Escherichia coli* ($r=0,499$; $P<0,01$) по време на периода на зреене.

Статистическата обработка на данните от анализите на саламуреното сирене, произведено от термично обработено краве мляко, показва, че по време на периода на зреене не съществува корелационна зависимост между

съдържанието на NaCl и броя на изследваните микроорганизми. Отчетохме отрицателна корелационна зависимост между понижаването на водната активност и броя на *Staphylococcus spp.* ($r=-0,346$; $P<0,05$) и положителна спрямо броя на *Escherichia coli* ($r=0,505$; $P<0,01$), но отсъствие на корелация спрямо броя на *Listeria spp.* Коефициентът на Пирсън показва отрицателна корелационна връзка между общата титруема киселинност и броя на *Listeria spp.* ($r=-0,526$; $P<0,01$) и *Escherichia coli* ($r=-0,757$; $P<0,0001$). Наблюдавахме положителна корелация между понижаването на рН и броя на *Escherichia coli* ($r=0,502$; $P<0,01$).

2.3.8. Определяне на антибиотичната резистентност на изолати *Staphylococcus aureus* от сурово краве мляко

Обобщените данни от таблица № 18 показват, че в пробите от област Благоевград най-много изолати *Staphylococcus aureus* проявяват резистентност към ампицилин (45,45%) и пеницилин (45,45%), след това към еритромицин (33,64%), тетрациклин (30%), клиндамицин (20%), гентамицин (17,27%), ципрофлоксацин (11,82%) и най-малко към рифампицин (4,55%).

Таблица № 18. Антибиотична резистентност при изолати *Staph. aureus* от изследваните проби сурово краве мляко в област Благоевград.

	Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци	Общо
<i>n</i>	20	11	9	40
Брой изолати <i>Staph. aureus</i>	56	28	26	110
Amp 10 µg	44,64%	39,29%	53,85%	45,45%
Pen 10 U	44,64%	39,29%	53,85%	45,45%
Cip 5 µg	8,93%	7,14%	23,08%	11,82%
Gen 10 µg	14,29%	10,71%	30,77%	17,27%
E 15 µg	33,93%	14,29%	53,85%	33,64%
CD 2 µg	19,64%	10,71%	30,77%	20,00%
TE 30 µg	32,14%	28,57%	26,92%	30,00%
Rif 5 µg	3,57%	3,57%	7,69%	4,55%

n – брой изследвани проби; Amp 10 µg (Ampicillin 10 µg), Pen 10 U (Penicillin-G 10 Units), Cip 5 µg (Ciprofloxacin 5 µg), Gen 10 µg (Gentamicin 10 µg), E 15 µg (Erythromycin 15 µg), CD 2 µg (Clindamycin 2 µg), TE 30 µg (Tetracycline 30 µg) и Rif 5 µg (Rifampicin 5 µg)

В пробите от област Смолян (Таблица № 19) също най-голям брой изолати *Staphylococcus aureus* показват резистентност към ампицилин (36%) и пеницилин (36%), след това към тетрациклин (28%), еритромицин (10%) и клиндамицин (10%), ципрофлоксацин (6%) и гентамицин (6%) и най-малко към рифампицин (2%).

Таблица № 19. Антибиотична резистентност при изолати *Staph. aureus* от изследваните проби сурово краве мляко в област Смолян.

	Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци	Общо
<i>n</i>	21	13	16	50
Брой изолати <i>Staph. aureus</i>	21	13	16	50
Amp 10 µg	42,86%	15,38%	43,75%	36,00%
Pen 10 U	42,86%	15,38%	43,75%	36,00%
Cip 5 µg	9,52%	0%	6,25%	6,00%
Gen 10 µg	14,29%	0%	0%	6,00%
E 15 µg	14,29%	7,69%	6,25%	10,00%
CD 2 µg	9,52%	7,69%	12,50%	10,00%
TE 30 µg	42,86%	15,38%	18,75%	28,00%
Rif 5 µg	4,76%	0%	0%	2,00%

n – брой изследвани проби; Amp 10 µg (Ampicillin 10 µg), Pen 10 U (Penicillin-G 10 Units), Cip 5 µg (Ciprofloxacin 5 µg), Gen 10 µg (Gentamicin 10 µg), E 15 µg (Erythromycin 15 µg), CD 2 µg (Clindamycin 2 µg), TE 30 µg (Tetracycline 30 µg) и Rif 5 µg (Rifampicin 5 µg)

Таблица № 20. Антибиотична резистентност при изолати *Staph. aureus* от изследваните проби сурово краве мляко в област София.

	Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци	Общо
<i>n</i>	22	20	8	50
Брой изолати <i>Staph. aureus</i>	55	46	24	125
Amp 10 µg	40,00%	36,96%	58,33%	42,40%
Pen 10 U	40,00%	36,96%	58,33%	42,40%
Cip 5 µg	20,00%	4,35%	45,83%	19,20%
Gen 10 µg	21,82%	10,87%	25,00%	18,40%
E 15 µg	29,09%	15,22%	50,00%	28,00%
CD 2 µg	29,09%	8,70%	25,00%	20,80%
TE 30 µg	29,09%	23,91%	20,83%	25,60%
Rif 5 µg	16,36%	4,35%	25,00%	13,60%

n – брой изследвани проби; Amp 10 µg (Ampicillin 10 µg), Pen 10 U (Penicillin-G 10 Units), Cip 5 µg (Ciprofloxacin 5 µg), Gen 10 µg (Gentamicin 10 µg), E 15 µg (Erythromycin 15 µg), CD 2 µg (Clindamycin 2 µg), TE 30 µg (Tetracycline 30 µg) и Rif 5 µg (Rifampicin 5 µg)

Данните за област София сочат, че повечето от изолатите *Staphylococcus aureus* са резистентни към ампицилин (42,40%) и пеницилин (42,40%), следва еритромицин (28%), тетрациклин (25,60%), клиндамицин (20,80%), ципрофлоксацин (19,20%), гентамицин (18,40%) и най-малко към рифампицин (13,60%).

Таблица № 21. Антибиотична резистентност при изолати *Staph. aureus* от изследваните проби сурово краве мляко в област Стара Загора.

	Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци	Общо
<i>n</i>	41	16	33	90
Брой изолати <i>Staph. aureus</i>	41	16	33	90
Amp 10 µg	36,56%	43,75%	45,45%	41,11%
Pen 10 U	36,56%	43,75%	45,45%	41,11%
Cip 5 µg	24,39%	37,50%	3,03%	18,89%
Gen 10 µg	19,51%	25,00%	12,12%	17,78%
E 15 µg	31,71%	56,25%	33,33%	36,67%
CD 2 µg	21,95%	31,25%	0%	15,56%
TE 30 µg	34,15%	25,00%	30,30%	31,11%
Rif 5 µg	14,63%	6,25%	30,30%	18,89%

n – брой изследвани проби; Amp 10 µg (Ampicillin 10 µg), Pen 10 U (Penicillin-G 10 Units), Cip 5 µg (Ciprofloxacin 5 µg), Gen 10 µg (Gentamicin 10 µg), E 15 µg (Erythromycin 15 µg), CD 2 µg (Clindamycin 2 µg), TE 30 µg (Tetracycline 30 µg) и Rif 5 µg (Rifampicin 5 µg)

За област Стара Загора установяваме най-високо ниво на резистентност сред изолатите *Staphylococcus aureus* към ампицилин (41,11%) и пеницилин (41,11%), след това към еритромицин (36,67%), тетрациклин (31,11%), ципрофлоксацин (18,89%) и рифампицин (18,89%), гентамицин (17,78%) и най-малко към клиндамицин (15,56%).

Таблица № 22. Антибиотична резистентност при изолати *Staph. aureus* от изследваните проби сурово краве мляко в област Хасково.

	Кравеферми	Търговски обекти	Амбулантни търговци	Общо
<i>n</i>	13	16	31	60
Брой изолати <i>Staph. aureus</i>	26	32	62	120
Amp 10 µg	50,00%	43,75%	40,32%	43,33%
Pen 10 U	50,00%	43,75%	40,32%	43,33%
Cip 5 µg	30,77%	3,13%	12,90%	14,17%
Gen 10 µg	42,31%	9,38%	8,06%	15,83%
E 15 µg	38,46%	9,38%	20,97%	21,67%
CD 2 µg	30,77%	3,13%	8,06%	11,67%
TE 30 µg	30,77%	21,88%	37,10%	31,67%
Rif 5 µg	7,69%	6,25%	19,35%	13,33%

n – брой изследвани проби; Amp 10 µg (Ampicillin 10 µg), Pen 10 U (Penicillin-G 10 Units), Cip 5 µg (Ciprofloxacin 5 µg), Gen 10 µg (Gentamicin 10 µg), E 15 µg (Erythromycin 15 µg), CD 2 µg (Clindamycin 2 µg), TE 30 µg (Tetracycline 30 µg) и Rif 5 µg (Rifampicin 5 µg)

Най-голям е дялът на изолатите *Staphylococcus aureus* в пробите от област Хасково резистентни към ампицилин (43,33%) и пеницилин (43,33%), след това към тетрациклин (31,67%), еритромицин (21,67%), гентамицин

(15,83%), ципрофлоксацин (14,17%), рифампицин (13,33%) и най-малко към клиндамицин (11,67%).

От всички изследвани региони най-много са изолатите *Staphylococcus aureus*, резистентни към ампицилин и пеницилин (42,42%), следват тези към тетрациклин (29,29%), еритромицин (27,47%), клиндамицин (16,36%), гентамицин (16,16%), ципрофлоксацин (14,95%) и най-малко към рифампицин (11,31%). Изпитаните от нас изолати *Staphylococcus aureus* показаха най-висока степен на чувствителност към рифампицин (88,69%), ципрофлоксацин (85,05%), гентамицин (83,84%), клиндамицин (83,64%), еритромицин (72,53%), тетрациклин (70,71%) и в по-малка степен към ампицилин (57,58%) и пеницилин (57,58%).

В изследваните проби сурово краве мляко от област Благоевград, при 29 (72,50%) се установи резистентност на изолатите *Staphylococcus aureus*, а при 11 (27,50%) от пробите всички изследвани изолати бяха чувствителни към използваните антибиотици. В суровото краве мляко от област Смолян, резистентни *Staphylococcus aureus* показаха 29 (58%) проби, а в 21 (42%) от тях се установи чувствителност на изолатите към всички изследвани антиминокробни средства. От област София, 34 (68%) от пробите сурово мляко показаха наличие на резистентни *Staphylococcus aureus*, докато в 16 (32%) проби констатирахме чувствителност към използваните антибиотици. Най-много (n=73; 81,11%) проби сурово мляко с резистентни *Staphylococcus aureus* се установиха в област Стара Загора, докато само в 17 (18,89%) проби наблюдавахме чувствителност към използваните антиминокробни средства. Висок бе делът на пробите с установени резистентни *Staphylococcus aureus* и в област Хасково – 44 (73,33%). В 16 проби (26,67%) се установи чувствителност на изолатите към всички изследвани антибиотици.

От всички изолирани *Staphylococcus aureus* от пробите сурово краве мляко от област Благоевград, 31 (28,18%) изолата са чувствителни към всички изследвани антиминокробни агенти, но повечето – 79 (71,82%) изолати проявяват резистентност към поне един от тестваните антибиотици. От изолатите *Staphylococcus aureus* в пробите сурово краве мляко от област Смолян, 21 изолата (42%) показват чувствителност към използваните антиминокробни агенти, а 29 изолата (58%) са резистентни към поне един химиотерапевтик. Пробите сурово краве мляко от област София показват, че 35 (28%) от изолатите *Staphylococcus aureus* проявяват чувствителност към всички използвани антиминокробни агенти, но преобладават (90 изолата; 72%) резистентните към поне един от тях. Чувствителност към всички изследвани антиминокробни агенти показват 17 (18,89%) изолата *Staphylococcus aureus* в пробите сурово краве мляко от област Стара Загора, но повечето (73 изолата; 81,11%) са резистентни на поне един от тях. Сходни са данните за пробите сурово краве мляко от област Хасково – 32 изолата (26,67%) *Staphylococcus aureus* са чувствителни към всички изследвани антибиотици, но болшинството (88 изолата; 73,33%) проявяват резистентност към поне един от тях.

От всички изследвани изолати, 136 (27,47%) са чувствителни на всички, включени в проучването антимикробни средства, но преобладават резистентните към поне едно от тях (359 изолата; 72,53%).

2.3.9. Определяне токсигения потенциал на изолати *Staphylococcus aureus* от сурово краве мляко

От всички 180 изследвани изолати, при 86 (47,78%) се регистрира продукция на стафилококови ентеротоксини, а при 94 (52,22%) отсъствие на такава (Таблица № 23).

Таблица № 23. Идентификация на токсин-продуциращи изолати *Staph. aureus* от проби сурово краве мляко.

		Благоевград	Смолян	Стара Загора	Общо
Кравеферми	<i>n</i>	20	21	41	82
	Положителни	12	10	12	34
	Отрицателни	8	11	29	48
Търговски обекти	<i>n</i>	11	13	16	40
	Положителни	5	10	8	23
	Отрицателни	6	3	8	17
Амбулантни търговци	<i>n</i>	9	16	33	58
	Положителни	6	6	17	29
	Отрицателни	3	10	16	29

n – брой изследвани изолати

Най-висок дял на изолатите *Staphylococcus aureus*, продуциращи ентеротоксини, установихме в пробите сурово краве мляко от търговските обекти (57,50%; *n*=23), следван от този на амбулантните търговци (50%; *n*=29) и най-нисък беше дялът на изолатите от кравефермите (41,46%; *n*=34). Отсъствие на токсин-продуцираща активност показаха 58,54% (*n*=48) от изолатите, получени от кравефермите, 50% (*n*=29) от изолатите от амбулантната търговия и 42,50% (*n*=17) от търговските обекти.

Резултатите показват, че от всички 40 изолати, получени при микробиологичното изследване на пробите сурово мляко от област Благоевград, 23 (57,50%) показаха способност да продуцират ентеротоксини, докато при 17 (42,50%) изолати такава не се установи. При изследването на 50-те изолати *Staphylococcus aureus* от пробите, получени от област Смолян, 26 (52%) показаха токсин-продуцираща активност, а при 24 (48%) липсваше такава. В област Стара Загора, от пробите (*n*=90) сурово мляко, при 37 (41,11%) изолати установихме токсин-продуциращи *Staphylococcus aureus*. При 53 (58,89%) изолати не се регистрира токсин-продуцираща способност.

3. ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Общ брой соматични клетки и общ брой микроорганизми в сурово краве мляко

Извършените от нас проучвания върху общия брой соматични клетки в сурово краве мляко, показват че най-голям процент проби с ОБСК над 400 000 клетки/ml и най-висока средна стойност (344 628 клетки/ml) на този показател, се отчитат за пробите от амбулантните търговци. Значително по-добри резултати получихме за пробите от кравефермите (283 228 клетки/ml) и търговските обекти (230 870 клетки/ml). В контекста на тези данни, най-висок процент проби с ОБСК под 400 000 клетки/ml установихме в кравефермите и търговските обекти.

Според Sebastino et al. (2020) при кравите, които никога не са страдали от инфекция на млечната жлеза, общият брой соматични клетки в 1 ml сурово мляко варира от 20 000 до 50 000, но намират връзка между отчетения брой на соматичните клетки със стадия на лактация. В нашето проучване изследвахме проби сборно сурово мляко и не разполагаме с информация за периода на лактация при отделните лактиращи животни. Затова не можем да определим връзката между стойностите на ОБСК и стадия на лактация. Това е причината за липсата на статистическа обработка на данните, изследваща зависимостта между общия брой соматични клетки и здравословния статус на животните, които биха обяснили защо получените резултати за общ брой соматични клетки в някои от изследваните области са по-високи.

Резултатите от нашето проучване показват, че при 235 (81,03%) проби сурово краве мляко общият брой соматични клетки е под 400 000 клетки/ml, което е индикатор за добро здраве на вимето, докато при 55 проби (18,97%) надвишава допустимите 400 000 клетки/ml. Вероятно практиката за подобряване на здравето и благополучието на животните е една от причините за значително по-добрите резултати, които отчитаме в пробите от търговските обекти и кравефермите, спрямо амбулантните търговци. Получените от нас стойности за „отговарящо“ и „неотговарящо“ мляко по показателя общ брой соматични клетки, свидетелстват за ефективността на официалния контрол, който се упражнява над регистрираните кравеферми и търговци.

Можем да обобщим, че българските млекопроизводители прилагат добри мениджърски практики за профилактика на маститите. Hohmann et al. (2020) твърдят, че добрият мениджмънт във фермите води не само до редуциране на случаите на мастит, но и до намаляване на бактериалното замърсяване на околната среда и разпространението на инфекциозни агенти сред стадото. Важно е да се отбележи, че въпреки програмите за контрол на маститите, които се прилагат от няколко десетилетия, възпалението на млечната жлеза остава едно от най-значимите заболявания, засягащи млечните крави в световен мащаб, което води до големи икономически загуби за млечната индустрия.

Нашите резултати показват, че средната стойност ($5,52 \pm 0,52 \log_{10}$ CFU/ml) по показателя общ брой микроорганизми на всички включени в проучването проби сурово краве мляко е над допустимата норма от $5,00 \log_{10}$ CFU/ml. В обследваните обекти между 25% и 100% от пробите сурово краве мляко са със завишен и неприемлив общ брой микроорганизми, което представлява сериозен риск за здравето и безопасността на потребителите. Значително по-високи средни стойности за общ брой микроорганизми (над $6 \log_{10}$ CFU/ml) в изследваните проби сурово краве мляко получават Mohamed et al. (2017) в Джибути – $6,78 \log_{10}$ CFU/ml, Guya et al. (2019) в Етиопия – $6,21 \log_{10}$ CFU/ml и Verhanu et al. (2021) в Югозападна Етиопия – $6,2 \log_{10}$ CFU/ml. Тези резултати могат да се обяснят с глада, недоимъка, ниската образованост и лошите здравно-хигиенни норми и навици в страните от Африка, за които има данни в научната литература. В нашата страна обаче, нещата не стоят по този начин и това не дава обяснение за високите стойности на показателя общ брой микроорганизми, отчетени при нашето изследване.

Най-високи резултати за общ брой микроорганизми установихме в пробите сурово краве мляко, взети от амбулантните търговци. Недостатъчната осведоменост на амбулантните търговци по въпросите за хигиената и безопасността на храните, води до неспазване на основните принципи, което може да обясни високия дял на пробите мляко от амбулантната търговия, неотговарящ на нормативните изисквания. В подкрепа на това е констатираното от Verhanu et al. (2021) повишаване на общия брой микроорганизми от 5,0 на $7,2 \log_{10}$ CFU/ml в млякото по цялата хранителна верига. Вероятната причина за това е неспазване на изискванията при отделните етапи на производство, преработка, съхранение и реализация. Това затвърждава тезата за обществения и здравен риск, който представлява млякото, обект на амбулантна търговия.

3.2. *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* в сурово краве мляко

Резултатите от изследванията на изолатите за каталазна и коагулазна активност, и полимеразна верижна реакция показаха наличие на *Staphylococcus aureus* във всички проби сурово краве мляко (100%) в количества от $2,71 \log_{10}$ CFU/ml до $5,50 \log_{10}$ CFU/ml, със средна стойност $3,78 \pm 0,49 \log_{10}$ CFU/ml. Нашите резултати потвърждават тези на Alghizzi and Shami (2021) за 100% положителни за *Staphylococcus aureus* проби сурово краве мляко. Според проучване на Ayele et al. (2017), проведено в Етиопия, 23,4% от пробите мляко са положителни за *Staphylococcus aureus*, но контаминацията е малко по-слаба в пробите, взети от фермите (19,6%) и много по-силна (80%) в пробите, получени от млекосъбирателните центрове. Тези данни показват по-ниска обсемененост на млякото със *Staphylococcus aureus* в сравнение с нашия резултат.

При нашето изследване отчитаме най-високи стойности за *Staphylococcus aureus* в пробите, получени от амбулантните търговци, в сравнение с резултатите за краевфермите и търговските обекти. Това вероятно се дължи на кръстосано замърсяване, лоши практики при събиране, опаковане, съхранение и реализиране на млякото по време на амбулантната търговия. Друга възможна причина за високия брой на патогена е смесването на мляко от здрави и маститни крави или вторична контаминация от съдовете за съхранение на суровото мляко. Не бива да се подценява ролята на хората с носителство на патогена в гърлото, носа, по кожата и косата, без клинична проява на инфекцията. От изложените данни се вижда по-високата средна стойност на *Staphylococcus aureus* в пробите от краевфермите (3,76 log₁₀ CFU/ml), спрямо средната стойност от търговските обекти (3,56 log₁₀ CFU/ml). Вероятна причина са недостатъчните познания на фермерите за значението на добрите хигиенни практики за минимизиране на микробното замърсяване на млякото, което повдига проблемите за общественото здраве. Правилното измиване на ръцете и подготовката на вимето преди доене, заедно с прилагането на добри практики, имат важна роля за понижаване на контаминацията със *Staphylococcus aureus*.

Listeria spp. установихме във всички проби сурово краве мляко с вариация в броя им от 2,49 log₁₀ CFU/ml до 5,64 log₁₀ CFU/ml, със средна стойност 3,91 ± 0,49 log₁₀ CFU/ml. Въпреки, че нашето изследване не включва доказване наличието на *Listeria monocytogenes*, не е по-малко значимо. Това се потвърждава от твърдението на Usman et al. (2016), че идентифицирането на *Listeria spp.* е от особено голямо значение, защото е установено, че дори непатогенните видове причиняват заболявания, както при напълно здрави, така и при имунокомпрометирани индивиди. Нашето проучване показва най-високи стойности за *Listeria spp.* в пробите, получени от амбулантните търговци и пониски резултати за пробите от краевфермите и търговските обекти. Тези разлики вероятно се дължат на лоши санитарно-хигиенни условия, както и на занижена лична хигиена, тъй като произходът на замърсяване на млякото с *Listeria spp.* е разнообразен, но предимно с фекален характер. Тревожен е фактът, че представителите на род *Listeria* могат да колонизират, образувайки биофилми върху оборудването и повърхностите, влизащи в контакт с храните. Това е предпоставка за по-продължителното им задържане в работната среда при производството и търговията на храни. Вероятно една от основните причини за по-малкия брой на *Listeria spp.* в пробите от търговските обекти, е бързото доставяне и реализиране на млякото, което намаля шансовете за замърсяване от страна на персонала и околната среда.

Вторичната бактериална контаминация на суровото мляко се случва на различни етапи, като се започне от процеса на доене или от пропуски при почистване на оборудването. Избраните хигиенни индикатори в настоящото изследване са броят на колиформите и *Escherichia coli*. Наличието на колиформни бактерии, включително *Escherichia coli*, може да е следствие от съмнителен здравен статус на животните, незадоволителни хигиенни практики

или бактериално замърсяване на оборудването за доене. Получената от нас средна стойност ($4,30 \log_{10}$ CFU/ml) за наличие на колиформи в пробите сурово краве мляко от кравефермите е съпоставима с данните на Verhanu et al. (2021) за среден брой от $4,40 \log_{10}$ CFU/ml колиформи в проби фермерско сурово мляко. Значително по-нисък резултат обаче отчитаме в пробите сурово краве мляко от търговските обекти ($4,11 \log_{10}$ CFU/ml), спрямо докладваната от гореспоменатите автори средна стойност в пунктовете за продажба на мляко ($7,0 \pm 0,2 \log_{10}$ CFU/ml). По-високите резултати, които отчетохме за пробите от кравефермите, могат да се дължат на неизмиване на вимето преди доене или почистването му с многократни кърпи, лошите хигиенни условия в помещенията за отглеждане на животните, неправилното почистване на съоръженията за добив и съхранение на сурово мляко. По отношение на *Escherichia coli* ние регистрирахме средна стойност от $3,71 \pm 0,57 \log_{10}$ CFU/ml, с минимална стойност $2,41 \log_{10}$ CFU/ml и максимална $5,54 \log_{10}$ CFU/ml. Значително по-ниски стойности за броя на *Escherichia coli* в млякото посочват Mohamed et al. (2017) – минимална $2,06 \log_{10}$ CFU/ml, максимална $2,98 \log_{10}$ CFU/ml и средна $2,58 \log_{10}$ CFU/ml. В северна Германия Böhnlein et al. (2021) установяват в изследваните проби мляко далеч по-ниска ($1,4 \pm 0,8 \log_{10}$ CFU/ml) от нашата средна стойност за *Escherichia coli*.

Проведеното от нас проучване показва тревожни резултати за броя на изследваните групи микроорганизми. Най-високи средни стойности за *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*, колиформи и *Escherichia coli* се установяват в пробите от амбулантните търговци, по-ниски в пробите от кравефермите и най-ниски в пробите от търговските обекти. Високите резултати от амбулантната търговия могат да бъдат обяснени с лошите практики на събиране, съхранение и продажба на суровото мляко при по-висока температура, позволяваща бързо размножаване на бактериите. Често амбулантните търговци използват пластмасови съдове за доене, съхранение и реализиране на суровото мляко. Те са неподходящи, поради лесно надраскване, което осигурява убежища за микроорганизмите по време на почистване и дезинфекция. Освен това, пластмасата е лош проводник на топлина и следователно би затруднила ефективната дезинфекция чрез висока температура.

3.3. Преживяемост на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* в „домашен“ тип бяло саламурено сирене по време на производство и зреене

От така изложените резултати прави впечатление незадоволителното микробиологично качество на суровото мляко, използвано за производство на партидите сирена. Тревожен е и резултатът за броя на *Staphylococcus aureus* ($5,10 \log_{10}$ CFU/g) в неосоленото прясно сирене от сурово мляко. Макар и незначително, той надвишава прага от $5 \log_{10}$ CFU/g, при който започва синтез

на стафилококови ентеротоксини. Поради тази причина ние не препоръчваме производство на сирене от сурово мляко, защото въпреки понижението в броя на *Staphylococcus aureus* в зрелия продукт, ентеротоксините не губят биологичната си активност и болестотворно действие.

При нашето проучване нито една от пробите сиренина и сирене, получени след термична обработка на млякото, не дадоха положителен резултат за *Staphylococcus aureus*. Това показва, че патогенният микроорганизъм е бил инактивиран по време на загряването и липсва последващо кръстосано замърсяване. Това се подкрепя допълнително от факта, че видовете *Staphylococcus* могат лесно да бъдат елиминирани от храните чрез топлинна обработка. Според изследването на Firstenberg-Eden et al. (1977), десетичното време за редукция (D-стойност) на *Staphylococcus aureus* при температура 52°C е 4,6 min, като с увеличаване на температурата се отчита понижение на D-стойността. Pearce et al. (2012) установяват редукция в популацията на *Staphylococcus aureus* с >6,7 log₁₀ при експозиция на 66,5°C за 15 s.

Установените стойности за броя на *Listeria spp.* бяха по-високи в „домашното“ саламурено сирене, получено от сурово мляко, но спадат от 4,12 log₁₀ CFU/g в неосоленото прясно сирене до 4,05 log₁₀ CFU/g през първите две седмици, до 3,68 log₁₀ CFU/g през вторите две седмици и до 3,24 log₁₀ CFU/g през третите две седмици от зреенето. Незакономерно е движението в броя на *Listeria spp.* по време на зреене на сиренето от термично обработено мляко, като правят впечатление и по-ниските стойности. В неосоленото прясно сирене броят на *Listeria spp.* е 3,10 log₁₀ CFU/g. През първите две седмици от зреенето стойността нараства до 3,46 log₁₀ CFU/g, а през вторите две седмици намалява до 3,44 log₁₀ CFU/g. През третите две седмици спада до 2,44 log₁₀ CFU/g.

Отчитаме числено превъзходство на *Escherichia coli* в бялото саламурено сирене от сурово мляко, спрямо полученото от термично обработено мляко. В саламуреното сирене от сурово краве мляко, регистрираме слабо увеличение в броя на *Escherichia coli* от 7,80 log₁₀ CFU/g в сиренината до 8,01 log₁₀ CFU/g в неосоленото прясно сирене. Противно на това, в бялото саламурено сирене, получено от термично обработено краве мляко, броят на *Escherichia coli*, макар и по-нисък в сиренината (3,16 log₁₀ CFU/g), нараства двукратно в неосоленото прясно сирене (6,35 log₁₀ CFU/g). Вероятно по-ниският брой на микроорганизма се дължи на термичната обработка на суровото мляко, която е довела до отмиране на част от наличните *Escherichia coli*. По време на зреене и при двата вида сирене наблюдаваме закономерно, плавно намаляване в броя на *Escherichia coli*.

При производството на сирене Гауда от непастъризирано мляко, Salazar et al. (2020) установяват, че *Listeria monocytogenes* и *Escherichia coli* O157:H7 се концентрират в сиренината, а в суроватката се откриват в по-малки количества. Campos et al. (2021) също съобщават за увеличаване в броя на колиформите, *Escherichia coli* и коагулазоположителните стафилококи по време на производствения процес, което се обяснява с намножаването на

микроорганизмите по време на коагулиране на млякото и физическото им задържане в сиренината. Tatini et al. (1971) представят същите факти и обясняват повишаването в броя на *Staphylococcus aureus* с физическото им фиксиране в сиренината и способността им за бърз растеж с генерационно време от 0,8 часа при 25°C. Така изложените факти могат да обяснят установеното от нас повишение в броя на *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* в сиренината при сиренето от сурово мляко и в неосоленото прясно сирене от термично обработено мляко.

Може да се обобщи, че наблюдаваме намножаване на *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* по време на производствения процес и значително понижение ($P < 0,001$) на техния брой по време на 45-дневния период на зреене, но не и пълното им отсъствие в „домашното“ бяло саламурено сирене. Arqués et al. (2005) свързват понижаването в броя на *Staphylococcus aureus* по време на зреене с наличието на стартерни култури, произвеждащи бактериоцин. Партидите сирена, изследвани от нас, бяха произведени без добавка на стартерни култури, с цел да се спази характерната за региона традиция за производство на „домашен“ тип сирене без закваска. Вероятно това е една от причините да не отчитаме силна редукция и пълно отсъствие на изследваните микроорганизми след изтичане на 45-дневния период на зреене. Проучванията на някои автори (Jakobsen et al., 2011; Dores et al., 2013; Martins et al., 2015), проведени върху ръчно произведени сирена, показват сходно на нашето изследване увеличаване в броя на *Staphylococcus aureus*, колиформите и *Escherichia coli* през първите часове на обработка на сиренината. Според Diezhandino et al. (2015) ръчната обработка на сиренината и лошата хигиена на оборудването могат да бъдат допълнителна причина за нарастване броя на бактериите, а Rola et al. (2016) препоръчват да се обърне повече внимание на хуманното отношение към животните и хигиенните практики в процеса на производство на традиционните сирена, за да се подобри тяхната микрофлора.

Докато в зрялото саламурено сирене от сурово краве мляко, броят на изследваните микроорганизми намалява спрямо установените в сиренината, то в зрялото сирене от термично обработено краве мляко това не се наблюдава. Напротив, установихме завишени стойности на изследваните бактерии в зрялото сирене спрямо отчетения им брой в сиренината. От получените резултати може да се обобщи, че въпреки установената тенденция към намаляване в броя на *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli*, наличието на техни жизнеспособни клетки в зрялото саламурено сирене, получено от сурово и от термично обработено мляко, свидетелства за риск от неговата консумация.

3.4. Промени в съдържанието на натриев хлорид, водна активност, обща титруема киселинност и рН при зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене

Нашите резултати показват ниска и почти сходна концентрация на сол в неосоленото прясно сирене от двете партии, която се повишава през периода на зреене. През цялото изследване правят впечатление почти еднаквите средни стойности на показателя за сиренето от сурово и термично обработено мляко. На 45-я ден концентрацията на NaCl при двете партии сирене показва лек спад, но също със сходни стойности, съответно 4,93% и 4,87%.

Някои български изследователи (Кестенова и кол., 1982; Ivanov et al., 2015; Balabanova et al., 2017) установяват, че по време на 45-дневния период на зреене при температура 12°C, съдържанието на сол в българското бяло саламурено сирене нараства слабо от 3,3% до 3,6%. По време на зреене на бяло саламурено сирене, произведено от краве мляко, Ivanov et al. (2016) отчитат сходно нарастване в концентрацията на готварска сол от 3,5% на 3,7%. Нашите резултати показват значително повишаване на съдържанието на NaCl, но до по-високи стойности (~5%) в зрялото сирене от двете партии. Beev et al. (2019) констатира повишение в съдържанието на готварска сол през 45-дневния период на зреене от 4,1% до 5,8%, стойности по-високи от нашите резултати за 4,93% NaCl в „домашното“ саламурено сирене от сурово мляко и 4,87% NaCl в сиренето, произведено от термично обработено мляко. Изложените от нас и други изследователи резултати свидетелстват за последователността, в която протича дифузията на сол по време на зреене на сирената. Данните от нашето изследване показват по-бърз темп на нарастване на концентрацията на NaCl през началния период на зреене и забавяне през втория период, финализиращо с понижаване до сходни стойности на NaCl при двете партии сирене.

Най-високи средни стойности за водна активност отчетохме в неосоленото прясно сирене от сурово (0,979) и от термично обработено мляко (0,981). Най-съществен спад в стойностите на показателя се отбеляза през втория период на зреене ($P < 0,001$) – до 0,935 в сиренето от сурово мляко и до 0,934 в сиренето от термично обработено мляко. Lai et al. (2020) докладват за значителна разлика във водната активност между сирене, произведено от сурово и от термизирано овче мляко. Консервиращото действие, което се приписва на NaCl, се дължи именно на ефекта му върху водната активност на хранителната матрица. Установеното от нас повишаване на съдържанието на сол по време на зреене води до значително намаляване на водната активност при сирената от двете партии.

Най-ниска обща титруема киселинност отчетохме в неосоленото прясно сирене от термично обработено мляко (36°Т) и трикратно по-висока (92°Т) в неосоленото прясно сирене, произведено от сурово краве мляко. През целия период на зреене наблюдавахме нарастване в стойностите на показателя, но едва през финалните 2 седмици и при двете партии сирене общата титруема

киселинност достигна своя пик от съответно 148°Т и 117°Т. Valabanova et al. (2017) наблюдават повишаване на титруемата киселинност от 182,22°Т до 265,55°Т при партида сирене, получено след добавяне на сирищна мая, и от 181,11°Т до 270°Т при друга партида с добавена микробиална мая за сирене. Тези стойности са далеч по-високи от отчетените от нас, но трябва да се отбележи, че за производството на сирената е използвана стартерна култура, която липсва при саламурените сирена, обект на нашето изследване. Според Груев (1995), силното нарастване на общата титруема киселинност е свързано с ферментацията на лактозата от млечнокиселата микрофлора, водеща до производството на органични киселини. Между началния и финалния етап на зреене на сирената от двете партиди има статистически значими разлики в стойностите на титруемата киселинност, което означава различна динамика на показателя и предполага различна интензивност на биохимичните процеси.

Данните от проведеното от нас изследване показват, че рН на сиренето, получено от термично обработено мляко без използване на закваска, е по-високо в сравнение с рН на сиренето от сурово мляко. Добре известно е, че термичната обработка на млякото води до промяна на неговата микрофлора, включително до отмиране на част от полезните млечнокисели микроорганизми. Следователно по-ниската стойност на рН на сиренето, получено от сурово мляко, може да се дължи на по-високия брой на млечнокиселите бактерии, в сравнение със сиренето, получено от термично обработено мляко. Saidi et al. (2020) провеждат проучване, сходно на нашето, включващо физикохимично изследване на сирена, произведени от сурово и от пастьоризирано мляко без добавена закваска. В края на периода на зреене, подобно на нас, авторите отчитат по-високи стойности за съдържание на сол в сиренето от сурово мляко (5,54%) и по-ниски в сиренето от пастьоризирано мляко (5,37%). Изследователският колектив отчита по-ниска стойност на рН в края на периода на зреене в сиренето от сурово мляко (рН 4,73) и по-висока в сиренето от пастьоризирано мляко (рН 5,55).

През периода на зреене наблюдаваме по-слабо (само с 0,58) понижение на рН (от 6,00 на 5,42) в саламуреното сирене от сурово мляко и по-силен (с 1,33) спад на рН (от 6,93 на 5,60) в бялото саламурено сирене от термично обработено мляко ($P < 0,001$). Нашите резултати потвърждават констатациите на Chop et al. (2020) за по-ниски стойности на рН (между 4,77 и 5,09) в сирене от сурово мляко в сравнение със сирене от пастьоризирано мляко (рН между 4,98 и 5,26) през ранния период на зреене, което авторите свързват с по-високия брой млечнокисели бактерии до 3-та седмица от зреенето. Valabanova et al. (2017) отчитат понижаване на рН в подсиреното с натурална сирищна мая сирене от 4,72 на 4,20 и в подсиреното с микробиална мая сирене от 4,75 на 4,18. В началото на зреенето на бяло саламурено сирене от биволско мляко, Ivanov et al. (2015) регистрират рН 4,6, но липсват данни за развитието на показателя до края на 60-дневния период на зреене. Прави впечатление, че стойностите на рН за бялото саламурено сирене, установени от българските изследователи, са значително по-ниски от получените при нашето проучване

върху „домашен“ тип бяло саламурено сирене, произведено от сурово и термично обработено краве мляко.

Нашите изследвания върху „домашен“ тип саламурено сирене, получено от сурово и от термично обработено краве мляко, показаха по-високи стойности за съдържание на сол и значително по-ниски за обща титруема киселинност спрямо Националния стандарт БДС 15:2010 „Българско бяло саламурено сирене“. Концентрацията на сол не само определя вкуса, аромата и текстурата на сиренето, но има значителен ефект върху микробния растеж. Прецизният контрол на този показател е съществена част от производството на сирене, за да се гарантира неговото качество и безопасност. Представените резултати и корелационни зависимости между физикохимичните показатели и изследваните микроорганизми, ни дават основание да смятаме, че чрез мониторинг и контрол върху съдържанието на NaCl, водна активност, обща титруема киселинност и рН, би могла да се контролира безопасността на „домашен“ тип бяло саламурено сирене спрямо изследваните микроорганизми. Нашите резултати не позволяват заключението, че изпитаните физикохимични показатели оказват антибактериален ефект.

3.5. Антибиотична резистентност при *Staphylococcus aureus* от изследваните проби сурово краве мляко

Антибиотичната терапия е важен инструмент при лечението на инфекции, свързани със *Staphylococcus aureus*. Според Manyi-Loh et al. (2018) опасностите, свързани с използването на антибактериални средства, включват появата, развитието и разпространението на резистентни бактериални щамове и техни гени, както и наличие на остатъци от антимикуробните средства в суровините и храните от животински произход.

При нашето изследване установихме повишена устойчивост на изолатите *Staphylococcus aureus* към ампицилин (42,42%) и пеницилин (42,42%), и в по-малка степен към тетрациклин (29,29%) и еритромицин (27,47%). Резистентността към останалите химиотерапевтици заемаше различно процентно съотношение: клиндамицин (16,36%), гентамицин (16,16%) и ципрофлоксацин (14,95%). Най-малък процент изолати показаха резистентност към рифампицин (11,31%). Високата резистентност на *Staphylococcus aureus* към пеницилин и ампицилин се потвърждава от резултатите на Schmidt et al. (2015). Ayele et al. (2017) също привеждат данни за висока резистентност към пеницилин (98,5%), еритромицин (69,1%) и тетрациклин (64,7%), въпреки че ние не отчитаме толкова висок процент сред изследваните изолати *Staphylococcus aureus*. Допускаме, че високата устойчивост на *Staphylococcus aureus* може да се дължи на безразборната употреба на антибиотици във фермите от млечния сектор при лечение на заболявания, засягащи основно млечната жлеза. Възможно е високите нива на резистентност, получени при нашето изследване, да са резултат от

способността на *Staphylococcus aureus* да образуват биофилми. Те не само защитават бактериите от процедурите по измиване и дезинфекция, но също така насърчават хоризонталния трансфер на гени в бактериалната популация (Savage et al., 2013). Не бива да се подценява и ролята на кръстосаното замърсяване по време на доене и първична обработка на суровото мляко, което би довело до по-голямо разпространение на резистентни *Staphylococcus aureus* в млякото, отколкото сред самите животни.

По данни на Mphahlele et al. (2020), всички (100%) получени изолати *Staphylococcus aureus* показват резистентност към поне едно антиминокробно средство, докато 62% са мултирезистентни към три или повече категории антиминокробни препарати, но повечето изолати са резистентни към еритромицин (62%) и ампицилин (62%). Противоположни са нашите резултати за изследваните изолати *Staphylococcus aureus*: 27,47% са чувствителни на всички, включени в проучването антиминокробни средства, но преобладават (72,53%) резистентните към поне едно от тях.

Тревожни са данните от нашето проучване, което показва относително висок дял на устойчивост към бета-лактамните антибиотици. Известно е, че *Staphylococcus aureus* притежава способността да продуцира ензима бета-лактамаза, който е и водещ фактор на резистентност при патогена. Ензимът е силно активен спрямо естествените и полусинтетични пеницилини и цефалоспорини. Различията в резултатите от посочените проучвания показват как с течение на времето чрез специфични механизми *Staphylococcus aureus* развива и променя своята резистентност към най-често използваните антибиотици. Изолирането на устойчиви щамове *Staphylococcus aureus* от проби мляко представлява голям проблем и поставя огромно предизвикателство пред хуманната медицина, тъй като сходни медикаменти се използват ежедневно при лечението на хора. Разликите в процента на резистентни *Staphylococcus aureus*, между отделните области от нашето изследване, могат да се припишат на различните схеми и принципи за лечение на инфекциите в обследваните региони. Липсата на строга регулация и мониторинг при отпускането и употребата на антиминокробни средства също може да допринесе за появата на висока резистентност към тези лекарства. Връзката между нарастващата употреба на антиминокробни средства и честотата на резистентност се превръща в заплаха за общественото здраве, поради което въвеждането на национална програма за рационална употреба на антибиотиците е от огромно значение.

3.6. Способност за продукция на ентеротоксини от *Staphylococcus aureus* в изследваните проби сурово краве мляко

Получените от нас резултати показват, че от всички (n=180) изследвани изолати *Staphylococcus aureus* при малко повече от половината (n=94; 52,22%) липсва продукция на стафилококови ентеротоксини, докато тя се регистрира

при 47,78% (n=86) от тях. Jørgensen et al. (2005c) идентифицират производство на ентеротоксини при 22,1% *Staphylococcus aureus*, изолирани от краве мляко в Норвегия, а кодиращите ги гени са открити при 52,5% от изолатите. Нашите проучвания показват двукратно (47,78%) по-висок резултат за продуциращи ентеротоксини *Staphylococcus aureus* в изследваните проби сурово краве мляко. За висок процент ентеротоксигенни *Staphylococcus aureus* докладват Fagundes et al. (2010) в Бразилия (50%) и Riva et al. (2015) в Италия (45,7%), което е напълно съпоставимо с получените от нас данни. По-нисък от нашия резултат отчитат Peles et al. (2007) в Йордания (9,4%), Korpysa-Dzirba and Osek (2019) в Полша (26,1%) и Obaidat et al. (2018) в Унгария (27,1%). За установяване продукцията на ентеротоксини от *Staphylococcus aureus*, Keyvan et al. (2020) използват ELISA анализ и установяват положителен резултат при 2 (1,66%) от 120 проби сурово мляко, а при 3 (16,6%) от 18 изолата на *Staphylococcus aureus* е потвърдено наличието на *seb* и *sec* гени. Нашето изследване показва 47,78% (почти 30 пъти повече) положителни за синтез на ентеротоксини изолати *Staphylococcus aureus*.

Повече от половината проби сурово мляко (57,50%), получени от търговските обекти, показват наличие на ентеротоксигенни *Staphylococcus aureus*. Резултатите за пробите от амбулантните търговци (50%) и кравефермите (41,46%) са по-ниски, но въпреки това обезпокоителни. Тези данни правят суровото мляко от търговската мрежа най-рисково за синтез на стафилококови ентеротоксини. Въпреки че пастьоризацията или стерилизацията на млякото са решаващи за неговата безопасност, спазването на хигиенни стандарти и поддържането на хладилна верига също са от съществено значение, поради термоустойчивата природа на стафилококовите ентеротоксини. Дори топлинната обработка на млякото, елиминираща или понижаваща броя на *Staphylococcus aureus*, не е достатъчна за предотвратяване на стафилококова интоксикация поради наличието на термоустойчиви стафилококови ентеротоксини.

Различията в разпространението на ентеротоксигенни щамове *Staphylococcus aureus* може да се обясни с географските особености, произходът на изолатите и използваните методи на изследване. За суровото краве мляко в обследваните от нас области на България не отчитаме значителни разлики в процента на изолираните *Staphylococcus aureus*, способни да синтезират ентеротоксини. Положителен резултат показаха 41,11% до 57,50% от изолатите, а отрицателен – 42,50% до 58,89% от тях. Въпреки че в едва 0,69% от всички изследвани проби сурово краве мляко броят на *Staphylococcus aureus* надвишава 5 log₁₀ CFU/ml, наличието на токсин-продуциращи щамове може да се счита за потенциална заплаха за общественото здраве. Отложената първична обработка и охлаждане на млякото, лошата лична хигиена и вторично замърсяване са свързани със стафилококов растеж и производството на ентеротоксини. Ето защо е важно да се осигурят високи стандарти за безопасност за предотвратяване на стафилококово хранително отравяне.

4. ИЗВОДИ

1. Изследваното сурово краве мляко показва завишени стойности за общ брой соматични клетки (над 400 000 клетки/ml) при 18,97% от пробите, за общ брой микроорганизми (над 100 000 CFU/ml) при 77,24% от пробите и наличие на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli*.
2. Почти всички изследвани проби сурово краве мляко (99,31%) показват безопасни стойности на *Staphylococcus aureus* (до 5 log₁₀ CFU/ml).
3. След подсирване на млякото за производството на „домашен“ тип бяло саламурено сирене от сурово мляко, се наблюдава повишение в броя на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli*.
4. След подсирване на млякото за производството на „домашен“ тип бяло саламурено сирене от термично обработено мляко, се наблюдава повишение в броя на *Staphylococcus spp.* и понижение в броя на *Listeria spp.* и *Escherichia coli*.
5. По време на зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене от сурово мляко, броят на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* постепенно намалява.
6. По време на зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене от термично обработено мляко, броят на *Listeria spp.* и *Escherichia coli* плавно намалява, докато на *Staphylococcus spp.* се повишава над стойността, установена в суровото мляко, използвано при неговото производство.
7. Периодът на зреене от 45 дни не е достатъчен за пълно елиминиране на *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* в двете партии „домашен“ тип бяло саламурено сирене.
8. Въпреки установената тенденция към намаляване на броя на *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* по време на зреене, наличието на техни жизнеспособни клетки в зрялото бяло саламурено сирене от „домашен“ тип, получено от сурово и от термично обработено мляко, е рисково за неговата безопасност.
9. В бялото саламурено сирене от „домашен“ тип, получено от сурово и от термично обработено краве мляко, не установихме *Listeria monocytogenes*.
10. При зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене от сурово и от термично обработено мляко, съдържанието на сол и общата титруема киселинност нарастват, а водната активност и рН намаляват.
11. Спрямо Националния стандарт БДС 15:2010 „Българско бяло саламурено сирене“, нашите стойности за „домашен“ тип бяло саламурено сирене, получено от сурово и от термично обработено краве мляко, са по-високи за съдържание на сол и значително по-ниски за обща титруема киселинност.

12. Изолираните от суровото краве мляко *Staphylococcus aureus* показват високо ниво на резистентност към ампицилин (42,42%) и пеницилин (42,42%).
13. Изолираните от суровото краве мляко *Staphylococcus aureus* показват високо ниво на чувствителност към рифампицин (88,69%), ципрофлоксацин (85,05%), гентамицин (83,84%) и клиндамицин (83,64%).
14. При почти половината (47,78%) от изследваните изолати *Staphylococcus aureus* се регистрира продукция на ентеротоксини.

5. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Повишаване интензивността на контрола върху санитарните правила за съхранение и реализация на суровото мляко.
2. Осъществяване на мониторинг върху някои физикохимични показатели (съдържание на NaCl, водна активност, обща титруема киселинност и рН), което би контролирало микробиологичната безопасност на „домашен“ тип бяло саламурено сирене, но без да осигурява антибактериален ефект.
3. Въвеждане на национална програма за контрол върху употребата на антимикробни средства за профилактика и лечение на заболяванията в интензивното животновъдство.

6. ПРИНОСИ

1. **Потвърдено** е наличието на *Staphylococcus aureus* в изследваното сурово краве мляко и рискът от синтез на ентеротоксини.
2. **Потвърдено** е размножаването на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* по време на началните етапи от производствения процес и значително понижение на техния брой през периода на зреене, но не и пълното им отсъствие в бялото саламурено сирене от „домашен“ тип, получено от сурово краве мляко.
3. **Потвърдено** е, че бялото саламурено сирене от сурово и термично обработено краве мляко, произвеждано ръчно в малки фамилни ферми, не е безопасно от микробиологична гледна точка.
4. **Потвърдено** е високото ниво на резистентност на *Staphylococcus aureus* към ампицилин и пеницилин, в по-малка степен към тетрациклин и еритромицин, клиндамицин, гентамицин, ципрофлоксацин и най-малко към рифампицин.
5. **Оригинален принос** е установеният висок процент на пробите сурово краве мляко, неотговарящи на европейските и национални нормативни изисквания.
6. **Оригинален принос** е, че почти половината от изолираните от сурово краве мляко *Staphylococcus aureus* продуцират ентеротоксини.
7. **Оригинален принос** е проследяването на преживяемостта на *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* и *Escherichia coli* по време на производство и зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене от сурово и от термично обработено краве мляко, получено в малка фамилна ферма без влагане на закваски.
8. **Оригинален принос** са установените промени в съдържанието на натриев хлорид, водна активност, обща титруема киселинност и рН при зреене на „домашен“ тип бяло саламурено сирене от сурово и от термично обработено краве мляко, получено в малка фамилна ферма без влагане на закваски.

7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СЪОБЩЕНИЯ И ЦИТИРАНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ

1. **Bangieva, D.**, Rusev, V., 2017. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20 (1), 430-436, ISSN: 1311-1477 (print); ISSN: 1313-3543 (online).
2. **Бангиева, Д.**, Русев, В., 2017. *Listeria monocytogenes* – патоген в храните (обзор). В: *Резюмета на Научни доклади по безопасност на храните*, 10^{-та} Юбилейна научна конференция „10 години наука за храните в услуга на потребителите“, София, България, стр. 21-22. (Пълното съдържание на научния доклад е поместено на интернет страницата на Българския контактен център на EFSA към Център за оценка на риска по хранителната верига: <http://focalpointbg.com/?news=888>).
3. **Bangieva, D.**, Rusev, V., 2019. Risk from *Staphylococcus aureus* in informally marketed raw cow milk. *Food Science and Applied Biotechnology*, 2(1), 74-80, e-ISSN: 2603-3380. <https://doi.org/10.30721/fsab2019.v2.i1.67>
4. **Bangieva, D.**, 2020. Microbiological and physicochemical changes during ripening in Bulgarian white brined cheese made from raw cow milk. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 23 (4), 494-503, ISSN: 1311-1477. <http://doi.org/10.15547/bjvm.2019-0009>

ЦИТИРАНИЯ

цитирана статия: Bangieva, D., Rusev, V., 2017. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(1), 430–436.

цитати:

- Ulusoy, B., Chirkena, K., 2019. Two perspectives of *Listeria monocytogenes* hazards in dairy products: the prevalence and the antibiotic resistance. *Food Quality and Safety*, 3 (4), 233-241. (Impact factor: 1.507)
- Babacan, O., 2021. Determination of the presence and antibiotic resistance of listeria species and aerobic mesophilic bacteria count of cow milks. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 92 (1), 16-23.
- Noomi, B., Anwar, S., Salih, S., 2021. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and aborted cow cases at salahudeen province. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 52 (2), 315-321. (SJR: 0.29)

цитирана статия: Bangieva, D., Rusev, V., 2019. Risk from *Staphylococcus aureus* in informally marketed raw cow milk. *Food Science and Applied Biotechnology*, 2(1), 74-80.

цитати:

- Silva, V., Caniça, M., Capelo, J. L., Igrejas, G., Poeta, P., 2020. Diversity and genetic lineages of environmental staphylococci: a surface waters overview, *FEMS Microbiology Ecology*, art. no. fiaa191. (Impact factor: 3.675)

цитирана статия: Bangieva, D., 2020. Microbiological and physicochemical changes during ripening in Bulgarian white brined cheese made from raw cow milk. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 23 (4), 494-503.

цитати:

- Dimov, S. G., 2021. The unusual microbiota of the traditional Bulgarian dairy product Krokmach – A pilot metagenomics study. *International Journal of Dairy Technology*, 75 (1), 139-149. (Impact factor: 4.374)
- Amiri, S., Kohneshahri, S. R. A., Nabizadeh, F., 2021. The effect of unit operation and adjunct probiotic culture on physicochemical, biochemical, and textural properties of Dutch Edam cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 155, art. no. 112859. (Impact Factor: 9.147)
- Balabanova, T., Ivanova, M., 2021. Quality Characteristics of White Brined Cheese Produced from Goat Milk with Different Somatic Cell Count. *Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology*, 45 (2), 9-19. (SJR: 0.18)

УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. Международна научна конференция „Ветеринарната медицина в полза на хората“, 6-7 октомври 2017, Стара Загора, България - Bangieva, D., Rusev, V. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk – a review. (участие с доклад)
2. 10-та Юбилейна научна конференция „10 години наука за храните в услуга на потребителите“, 31 октомври – 2 ноември 2017, София, България - Бангиева, Д., Русев, В. *Listeria monocytogenes* – патоген в храните. (участие с доклад)
3. 65-та Юбилейна научна конференция с международно участие „Хранителна наука, техника и технологии – 2018“, 11-13 октомври 2018, Пловдив, България - Bangieva, D., Rusev, V. Risk from *Staphylococcus aureus* in informally marketed raw cow milk. (участие с доклад)
4. 11-та Научна конференция “Науката – от възможност към действие”, 7-8 ноември 2018, София, България - Bangieva, D., Rusev, V. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in raw cow milk. (участие с постер)

8. SUMMARY

Every day, milk and dairy products provide essential nourishment to billions of people worldwide. Hippocrates defines milk as “nature’s most complete food”, playing currently an important role in the diet of people in the world.

In addition to being a nutritious food for humans, milk provides a favorable environment for the growth of microorganisms, which can contaminate foods at any stage of the manufacturing process. Aerobic plate counts, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, coagulase positive staphylococci and their enterotoxins are groups of microorganisms commonly researched as sanitation and food safety indicators. Foodborne diseases associated with microbial pathogens pose serious health threat. Contaminated milk is responsible for up to 90% of all dairy-related diseases of humans.

According to the World Health Organization, each year worldwide, an estimated 600 million (almost 1 in 10 people) fall ill after eating contaminated food, resulting in 420 000 deaths. Foodborne diseases increase pressure on healthcare and social systems and have a negative impact on global industrial production, economy, trade and tourism.

In recent years, common practice is the informal and unregulated marketing with milk and dairy products. It raises the question about their origin and safety. Ambulant vendors do not have enough knowledge about good hygienic practices that should be applied throughout the dairy chain, which poses a serious threat to public health.

Antimicrobial resistance (AMR) in bacterial pathogens is a worldwide challenge, making infections in both people and animals harder to treat. Transmission routes of AMR are abundant and complex. Antimicrobial resistant bacteria can be transmitted to humans through the environment, animals or food products.

The development of the dairy industry is directly dependent on the achievements of food microbiology testing. The growth and survival of pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.* and *Escherichia coli* has not been studied in a traditional “homemade” white brined cheese produced in small-scale family farms. Therefore, the present dissertation is focused on research on the safety of informally marketed raw cow milk and “homemade” white brined cheese during maturation.