

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Milla Meriluoto

**Lypsytekniikan ja vuodenajan vaikutus raakamaidon
mikrobiologiseen laatuun**

Insinööritö 6.5.2009

Ohjaajat: kehityspäällikkö Juha Nousiainen
johtava tutkija Anu Surakka
Ohjaava opettaja: lehtori Carola Fortelius

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Milla Meriluoto Lypsytekniikan ja vuodenajan vaikutus raakamaidon mikrobiologiseen laatuun 83 6.5.2009
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaajat Ohjaava opettaja	kehityspäällikkö Juha Nousiainen johtava tutkija Anu Surakka lehtori Carola Fortelius
Työn tarkoituksena oli kartoittaa raakamaidon mikrobiologista laatua vuonna 2008. Tavoitteena oli tutkia kolmella eri lypsytekniikalla lypsetyn raakamaidon mikrobiologisen laadun eroja. Tutkimuksessa oli mukana parsinavettoja, joilla on käytössä perinteinen lypsytekniikka, pihattotiloja, joilla on lypsyasema, sekä pihattotiloja, joilla on automaattinen lypsyjärjestelmä. Työssä selvitettiin lisäksi vuodenajan vaikutusta raakamaidon mikrobipitoisuuksiin. Raakamaidon tämän hetkistä mikrobiologista laatua verrattiin Valio Oy:ssä vuonna 1998 tehdyn raakamaidon mikrobiologisen kartoituksen tuloksiin. Tutkitut mikrobiryhmät valittiin tuoteturvallisuus-, prosessi- ja tuotelaatunäkökulmasta. Raakamaidon hygieniaindikaattoreina olivat mesofiiliset aerobiset mikrobit ja enterobakteerit. Pilaajamikrobiryhmään kuuluivat klostridi-itiöt, aerobiset bakteeri-itiöt sekä <i>Bacillus cereus</i> – itiöt. Patogeeneihin kuului <i>Listeria monocytogenes</i>. Mikrobipitoisuudet määritettiin siirrostamalla raakamaitonäytteistä halutut laimennokset sopiville kasvualustoille. Lisäksi positiivisen tuloksen antaneista klostridi-itiöputkista määritettiin <i>Clostridium tyrobutyricum</i> ja <i>Clostridium sporogenes</i> -lajien esiintyvyydet lajispesifisillä PCR-menetelmillä. Tulosten tilastollinen käsittely tehtiin Statistica-tilasto-ohjelmalla ja tulokset analysoitiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä. Jakaumat tehtiin Microsoft Excel –ohjelmalla. Tulosten perusteella raakamaidon mikrobiologista laatua voidaan pitää erittäin hyvänä. Raakamaidon mikrobiologinen laatu on parantunut kymmenen vuoden aikana mesofiilisten aerobisten mikrobien osalta. Klostridi-itiöiden sekä aerobisten bakteeri-itiöiden esiintymistiheydet ja pitoisuudet ovat puolestaan kasvaneet huomattavasti kymmenen vuotta sitten tehtyyn raakamaidon mikrobiologiseen kartoitukseen verrattuna. Aerobisia bakteeri-itiöitä voidaankin pitää tämän tutkimuksen suurimpana raakamaidon mikrobiologiseen laatuun vaikuttavana ongelmana. Tulosten perusteella automaattisella lypsylaitteistolla lypsetyn raakamaidon enterobakteeri-, klostridi-itiö- ja aerobiset bakteeri-itiöpitoisuudet olivat korkeammat kuin perinteisillä lypsytekniikoilla lypsetyissä raakamaidossa. Erot eivät kuitenkaan olleet kohtuuttoman suuria, ja automaattisella lypsytekniikallakin saadaan lypsettyä laadukasta raakamaitoa.	
Hakusanat	raakamaito, mikrobiologia, lypsytekniikka, automaattilypsyjärjestelmä

Author	Milla Meriluoto
Title	The effect of milking techniques and seasons on the microbiological quality of raw milk
Number of Pages	83
Date	6. May 2009
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor	Juha Nousiainen, Development Manager
Instructor	Anu Surakka, Group Leader
Supervisor	Carola Fortelius, Lecturer
The aim of this study was to carry out a research on the quality of raw milk in Finland in 2008. In this research, the quality of raw milk between three different kinds of milking techniques was explored. The three milking techniques were tie stall milking systems, milking parlour systems, and automatic milking systems. The counts of micro-organisms of raw milk between seasons were compared. The results of this study were compared with the previous research on the microbiological quality of raw milk which was made in Valio Ltd. in 1998. The microbe groups were selected using the aspects of milk process, quality and safety. The hygiene indicators were mesophilic aerobic microbes and enterobacteria. The spoiler microbes were clostridia spores, aerobic bacteria spores and <i>Bacillus cereus</i> – spores. <i>Listeria monocytogenes</i> was in the group of pathogens. The microbes were quantified by culturing suitable dilutions of raw milk samples on the suitable culture media. The incidence of <i>Clostridium tyrobutyricum</i> and <i>Clostridium sporogenes</i> were investigated in positive clostridia spore samples by using the polymerase chain reaction method (PCR). The statistical analyses of the results were made by using the Statistica programme. The results were analyzed using a two-way variance analysis. The distributions were made in the Microsoft Excel –programme. The results showed that the microbiological quality of raw milk was very good. The microbiological quality of mesophilic aerobic microbes of raw milk has improved during the last ten years. On the other hand, the incidences and contents of clostridia spores and aerobic bacteria spores have increased remarkably compared to the previous research. Aerobic bacteria spores can be seen as the biggest microbiological quality problem of raw milk in this research. The results showed that the microbe counts in enterobacteria, clostridia spores and aerobic bacteria spores of raw milk using the automatic milking systems were higher than those of the conventional milking techniques. However, the differences were not enormously large; quality milk can also be produced with the automatic milking system.	
Keywords	raw milk, microbiology, milking technique, automatic milking system

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ ABSTRACT

1	Johdanto	6
	KIRJALLISUUSOSIO	7
2	Raakamaito ja sen käsittely tiloilla	7
2.1	Maidon käsittely tilalla	7
2.2	Lypsykone ja sen toimintaperiaate	8
2.3	Parsinavetan lypsykone	9
2.4	Pihatön lypsyasema	10
2.5	Pihatön automaattilypsy	12
2.6	Lypsyhygienia	15
3	Raakamaidon mikrobiologia	18
3.1	Maidon mikrobiologia	18
3.2	Hygieniaindikaattorit	18
3.2.1	Mesofiiliset aerobiset mikrobit	18
3.2.2	Enterobakteerit	19
3.3	Pilaajamikrobit	20
3.3.1	Klostridi-itiöt	20
3.3.2	Aerobiset bakteeri-itiöt	21
3.3.3	<i>Bacillus cereus</i> -itiöt	22
3.4	Patogeenit	23
3.4.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	23
3.5	Maidon laadun kehitys	24
3.6	Aikaisempia tutkimuksia	25
3.7	Tulevaisuus	27

KOKEELLINEN OSA	29
4 Tutkimuksen tavoitteet	29
4.1 Näytteenotto	29
5 Materiaalit ja menetelmät	31
5.1 Mesofiiliset aerobiset mikrobit	31
5.2 Enterobakteerit	31
5.3 Klostриди-itiöt	32
5.3.1 <i>Clostridium sporogenes</i> ja <i>Clostridium tyrobutyricum</i> -lajien tunnistus polymeraasiketjureaktio-menetelmällä (polymerase chain reaction, PCR)	32
5.4 Aerobiset bakteeri-itiöt	35
5.5 <i>Bacillus cereus</i> -itiöt	35
5.6 <i>Listeria monocytogenes</i> kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen määrittäminen	36
5.7 Tulosten tilastollinen käsittely	38
6 Tulokset ja tulosten tarkastelu	40
6.1 Hygieniaindikaattorit	40
6.1.1 Mesofiiliset aerobiset mikrobit	40
6.1.2 Enterobakteerit	45
6.2 Pilaajamikrobit	49
6.2.1 Klostриди-itiöt	49
6.2.2 Aerobiset bakteeri-itiöt	53
6.2.3 <i>Bacillus cereus</i> -itiöt	57
6.3 Patogeenit	57
6.3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	57
7 Yhteenveto	59
Lähteet	62
Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit	68
Liite 2: Klostриди-itiöiden MPN-taulukko	75
Liite 3: Tulokset	76
Liite 4: Listeriamäärittämissä vahaaksi jääneet näytteet	83

1 Johdanto

Automaattilypsytilat ovat yleistymässä Suomessa. Automaattisessa lypsyjärjestelmässä robotti huolehtii lehmän vetimien puhdistamisesta ennen lypsyä. Perinteisillä lypsytekniikoilla eli parsinavetan lypsykoneella ja pihatön lypsyasemalla ihminen puhdistaa lehmän vetimet ja tarkastaa visuaalisesti niiden puhtauden. Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää, lypsetäänkö automaattisella lypsyjärjestelmällä mikrobiologisesti yhtä laadukasta raakamaitoa kuin muilla lypsytekniikoilla, ja vaikuttaako vuodenaika raakamaidon mikrobiologiseen laatuun. Tutkitut mikrobiryhmät valittiin tuoteturvallisuus-, prosessi- ja tuotelaatunäkökulmasta. Raakamaidon hygieenistä laatua kuvasivat mesofii-liset aerobiset mikrobit ja enterobakteerit. Pilaajamikrobiryhmään kuuluivat klostridi-itiöt, aerobiset bakteeri-itiöt sekä *Bacillus cereus* -itiöt. Lisäksi tutkittiin *Listeria monocytogenes*, joka on patogeeninen ihmisille.

Raakamaidon tämän hetkistä mikrobiologista laatua verrattiin Valio Oy:ssä vuonna 1998 tehdyn raakamaidon mikrobiologisen kartoituksen tuloksiin. Tuotantotekniikka on muuttunut nopeasti kymmenen vuoden aikana, sillä vuonna 1998 Suomessa ei ollut käytössä ainuttakaan automaattilypsyjärjestelmää. Tällä hetkellä 9 % Suomen raakamaidosta lypsetään automaattilypsytekniikalla. Automaattilypsytilojen osuuden on arveltu kasvavan voimakkaasti ja korvaavan perinteisiä lypsytekniikoita. Suomessa ei ole aikaisemmin tehty laajempaa tutkimusta automaattilypsytekniikan vaikutuksesta raakamaidon mikrobiologiseen laatuun. Tästä syystä tämä tutkimus tuo uutta arvokasta tietoa maidon tuottajille sekä meijereille raakamaidon jalostusprosesseihin. Lisäksi raakamaidon mikrobiologisen laadun kartoitus on tärkeää tuoteturvallisuuden ja tuotelaadun kannalta.

Raakamaidon mikrobiologinen kartoitus tehtiin Valio Oy:n tutkimus ja tuotekehitys -osaston Mikrobiologinen laatu -laboratoriossa 4.8.2008 – 27.2.2009. Raakamaitonäytteet otettiin Alueosuuskunta Promilkin, Osuuskunta Tuottajain Maidon ja Osuuskunta Maitosuomen alueilta. Työn tulosten perusteella pyrittiin myös arvioimaan raakamaidon mikrobiologisen laadun kehittymistä tulevaisuudessa.

KIRJALLISUUSOSIO

2 Raakamaito ja sen käsittely tiloilla

2.1 Maidon käsittely tilalla

Lehmät lypsetään vähintään kaksi kertaa päivässä. Nykyään lähes kaikki lehmät lypsetään koneellisesti. Ennen lypsyä vetimet ja tarvittaessa utareet ja niiden lähialueet puhdistetaan liasta. Tämän jälkeen otetaan alkusuihkeet, joiden avulla varmistetaan visuaalisesti maidon laatu. Lypsin kiinnitetään lehmään joko käsin, tai lehmä lypsetään automaattisella lypsylaitteistolla, jossa kone kiinnittää lypsimen.

Lypsetty raakamaito siirretään yleensä alipaineen avulla maitoputkea pitkin tilasäiliöön, jossa maito jäähdytetään ja pidetään kylmänä. Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 8/EEO/2002 mukaan raakamaito on lypsämisen jälkeen jäähdytettävä mahdollisimman nopeasti + 6 °C:n lämpötilaan tai sen alapuolelle. Raakamaito on myös säilytettävä tilasäiliössä korkeintaan +6 °C:n lämpötilassa. Mitä lähempänä 0 °C:ta raakamaitoa säilytetään, sitä parempana sen mikrobiologinen laatu säilyy (ICMSF 2005). Asetuksen 8/EEO/2002 mukaan raakamaito ei kuitenkaan saa missään vaiheessa jäätyä. Bakteerikasvu on hidasta lämpötilavälillä 0 °C – 5 °C, mutta raakamaidossa voi silti tapahtua epätoivottuja muutoksia jo muutamassa päivässä. Muutokset riippuvat mikrobilajista, mikrobipitoisuudesta sekä mikrobien tuottamista entsyymeistä. (ICMSF 2005.)

Meijerin maitoauto hakee raakamaidon tilasäiliöstä joka toinen päivä. Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 134/2006 mukaan raakamaidon lämpötila saa olla korkeintaan +6 °C, kun se siirretään tilasäiliöstä maitoauton kuljetussäiliöön. Yksittäisissä tapauksissa kuljetussäiliöön voidaan kuitenkin siirtää raakamaitoa, jonka lämpötila on korkeintaan +10 °C. Tällöin kuljetussäiliössä olevan raakamaidon lämpötila ei kuitenkaan saa ylittää +6 °C:ta.

2.2 Lypsykone ja sen toimintaperiaate

Maidonkäsittelylaitteistoon kuuluvat lypsy-yksikkö, maitoletkut, tyktysletkut, maitoputkisto, tyhjöpumppu, tyhjösäiliö ja jäähdyttäjällä varustettu maidon tilasäiliö. Lypsy-yksiköksi kutsutaan kokonaisuutta, johon kuuluvat lypsin, tarvittavat letkut ja tyktytin. Lypsimeen kuuluvat lyhyet tyktysletkut, neljä nännikuppia sekä yhdyskappale.

Lypettäessä tyktytin saa aikaan jaksoittaisen alipaineen ja normaali-ilmanpaineen vaihtelun tyktyskammiossa eli vetimen ympärillä olevan nännikumin ja hylsyn välisessä tilassa. Tämä saa nännikumin vuorotellen avautumaan ja sulkeutumaan, ja raakamaito pääsee virtaamaan jaksoittaisesti vetimistä lypsykoneen lyhyiden maitoletkujen ja yhdyskappaleen kautta pitkään maitoletkuun ja sieltä maitoputkeen. (Manninen & Nyman 2003.)

On tärkeää, että lypsykoneen nännikumin kaulus saa hyvän otteen nännistä. Tällöin nännin verenkierto pysyy yllä lypsyn aikana eikä nännikumin kauluksen kautta pääse lypsyn aikana ilmaa tai bakteereja lypsimeen. Ilman pääseminen nännikumin kauluksen kautta lypsimeen aiheuttaa paineiskuja, joilla lypsykone siirtää bakteereita nännin sisälle. (Manninen & Nyman 2003.)

Raakamaito siirretään yleensä maitoputkea pitkin kokoojan kautta maituhuoneen tilasäiliöön. Kokoojassa raakamaidosta poistetaan ilma, ja maito siirtyy putkissa ilmatulppien avulla alipaineen voimasta. Ilma otetaan järjestelmään keskuskappaleen ilmareiästä. Tilasäiliössä raakamaito jäähdytetään alle + 6 °C:n lämpötilaan. Tilasäiliön jäähdytysjärjestelmän tulisi käyttää korkeintaan 20 minuuttia maidon jäähdyttämiseen yhtä celsiusastetta kohti. (Manninen & Nyman 2003.)

2.3 Parsinavetan lypsykone

Parsinavetassa lehmät ovat kytkettyinä omissa parsissaan, joissa ne syövät, makaavat ja joissa ne myös lypsetään. Lehmät eivät pääse liikkumaan vapaasti kuten pihattotilojen lehmät. Lypsäjä kiertää kiinnittämässä lypsimen vuorotellen jokaiseen lehmään. Ennen lypsimen kiinnitystä lypsäjä puhdistaa lehmän utareet ja varmistaa maidon laadun alkusuihkeiden avulla.

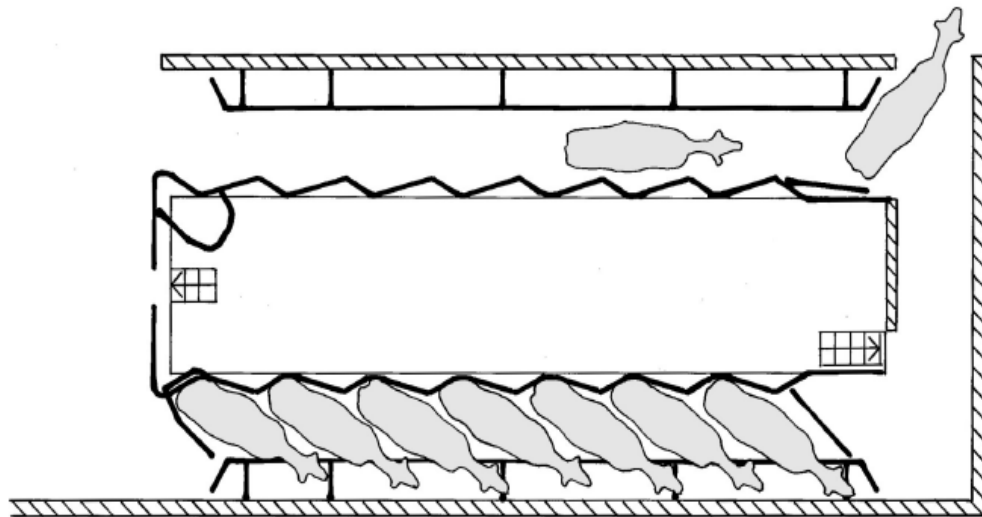
Parsinavetan lypsykoneena käytetään joko sankokonetta tai putkilypsykonetta. Sankokone on rakenteeltaan yksinkertainen ja putkilypsykoneeseen verrattuna helpompi pitää puhtaana. Lypsäjän on kuitenkin itse siirrettävä sankoon lypsetty raakamaito maitohuoneeseen jäähdytettäväksi, mikä tekee työstä raskaan. Sankokone on tarkoitettukin pienten karjojen lypsyä varten. (Manninen & Nyman 2003.)

Käytettäessä putkilypsykonetta raakamaitoa ei tarvitse siirtää itse maitohuoneeseen, vaan maito kulkee tilasäiliöön maidonkokoajan ja maitoputkien kautta. Putkilypsykoneen maito- ja hanaputkistot sijaitsevat navetassa parsien yläpuolella. Tämä aiheuttaa lypsäjälle ergonomisia ongelmia, sillä lypsy-yksiköt kytketään maito- ja tyhjöhanoihin. Lisäksi maidon nostaminen alipaineella korkealle lisää maidon muokkautumista sekä vaikuttaa lypsyalipaineeseen. (Manninen & Nyman 2003.)

2.4 Pihatön lypsyasema

Tässä lypsytekniikassa lehmät lypsetään erillisellä lypsyasemalla (kuva 1). Lypsäjä siirtää lehmät keräilytilaan, jossa lehmät odottavat lypsyvuoroaan. Lypsäjä työskentelee lypsisyvennyksessä, jonka ansiosta lehmien utareet ovat sopivalla korkeudella lypsäjään nähden. Lypsäjä puhdistaa lehmän utareet, ottaa alkusuihkeet ja kiinnittää lypsimen vuorotellen jokaiseen lehmään.

Pihatton lypsyasemavaihtoehtoja ovat kalanruotoasema (kuva 1), ohikulkuasema, rinnakkaisasema, läpikulkuasema ja karuselli. Ulkomailla on myös käytössä muitakin vaihtoehtoja. (Manninen ym. 2002.)



Kuva 1. Pihatön kalanruotoasema (Manninen & Nyman 2003).

Pihatoissa lehmät saavat liikkua vapaasti makuuosaston ja ruokintaosaston välillä. Eläinliikenne on kuitenkin hyvä ohjata lypsyltä suoraan ruokintaosastolle. Tällä vältetään lehmien meno makuulle heti lypsyn jälkeen. Vedinkanava on lypsyn jälkeen auki varsin pitkän aikaa, mikä mahdollistaa bakteerien kulkeutumisen vedinkanavaan varsin lehmien ollessa makuulla. (Manninen ym. 2002.)

Pihattotilojen lypsyasemilla käytetään pääasiassa kahta lypsykonetyyppiä, jotka ovat mittasäilökone ja putkilypsykone. Pihaton putkilypsykone eroaa parsinavetan putkilypsykoneesta siten, että maito- ja hanaputket ovat pihatossa huomattavasti lyhyemmät kuin parsinavetassa, sillä lehmät lypsetään yhdessä paikassa. Parsinavetassa putket kiertävät koko navetan. (Manninen & Nyman 2003.) Yleensä pihatossa maitoputkisto on asennettu lehmän seisonatason alapuolelle lypsisyvennyksen reunaan, jolloin käytetään nimitystä alaputkikone. Alaputkikone on lypsyaseman yleisin lypsykonetyyppi. Maitoputkien ollessa lehmien seisonatason alapuolella vetimeen kohdistuva alipaine ei nouse korkeaksi alhaisenkaan virtauksen aikana. Alaputkikone on maidon laadun kannalta hyvä vaihtoehto, sillä raakamaitoa ei nosteta korkealle, jolloin saattaisi tapahtua maidon muokkaantumista. (Manninen ym. 2002.)

Pihaton putkilypsykone voi olla myös yläputkikone. Siinä maitoputket on asennettu lehmien seisonatasosta noin 1,8 m korkeuteen. Yläputkikone on kuitenkin alaputkikonetta paljon harvinaisempi. Sitä käytetään lähinnä kustannussäästösyistä siirryttäessä parsinavetasta pihattoon. (Manninen ym. 2002.)

Pihaton lypsyasemalla käytetään usein myös mittasäilökonetta, jonka etuna putkikoneeseen verrattuna on yksinkertainen maidon mittaus. Raakamaito lypsetään mittasäiliöön, jossa maidosta erotellaan ilma pois. Ilma kulkeutuu alipaineputkea pitkin kohti tyhjöpumppua, maidon jäädessä mittasäiliöön. Vasta kun lehmä on lypsetty, maito päästetään maidonsiirtoputkea pitkin maidonkokoojalle. Maidonkokoojalta raakamaito pumpataan tilasäiliöön. Mittasäilökoneessa maidon virtaus ei häiritse lypsyalipaineen tasaisuutta. Mittasäilökoneessa on monta komponenttia, mikä tekee sen huollosta hankalamman putkikoneeseen verrattuna. (Manninen & Nyman 2003.)

Lypsyn jälkeen koko lypsyasema pestään sekä käynnistetään lypsykoneen pesuohjelma. Jokaisen lypsytapahtuman jälkeen puhdistetaan myös maito- ja tyhjöletkut. (Manninen ym. 2002.)

2.5 Pihatön automaattilypsy

Automaattilypsylaitteistossa (automatic milking system) robotti lypsää lehmän täysin automaattisesti, ilman ihmisen läsnäoloa. Lypsäjän fyysinen työ vähenee työn painopisteen siirtyessä lehmien hyvinvoinnin tarkkailuun sekä automaattisen järjestelmän valvomiseen. Ulkomaalaisissa tutkimuksissa lypsyn automatisoinnin on todettu nostavan tuotantotasoa noin 7-8 %, sillä hyvin tuottavat lehmät pääsevät lypsylle entistä useammin. (Manninen & Nyman 2003.)

Ensimmäiset automaattilypsylaitteistot otettiin käyttöön vuonna 1992 Hollannissa. Vuoden 2007 lopussa maailmassa oli käytössä noin 5 100 automaattilypsylaitteistoa (Manninen 2009b). Suomessa ensimmäiset automaattilypsylaitteistot otettiin käyttöön vuonna 2000 (Suokannas ym. 2004). Vuodenvaihteessa 2008–2009 niitä oli Suomessa 385 tilalla, ja lypsypaikkoja oli yhteensä 452 (Manninen 2009a). Pohjoismaissa automaattilypsylaitteisto oli tuolloin käytössä 2 314 tilalla ja lypsypaikkoja oli yhteensä 3 809. Automaattilypsytilojen osuus Suomen kaikista lypsytiloista oli 3,2 % vuodenvaihteessa 2008–2009. Tuolloin Suomessa lypsettiin 7,8 % lehmistä automaattilypsyjärjestelmällä ja lypsetty raakamaitomäärä oli 9,0 % koko Suomen raakamaidosta. (Manninen 2009c.)

Automaattilypsytiloilla lehmät saavat liikkua navetassa vapaasti. Lehmien on tultava lypsylle vapaaehtoisesti useita kertoja päivässä. Lypsykertojen lukumäärään voidaan vaikuttaa makuuparsien sijoittelulla ja lypsypaikan houkuttelevuudella esimerkiksi antamalla lehmille väkirehua lypsyn aikana. (Manninen 2002.) Lehmä tulee lypsylle tunnistusportin kautta. Jos lehmä on äskettäin lypsetty, se ohjataan pois lypsylaitteelta. Jos edellisestä lypsystä on kulunut riittävä aika, lehmä lypsetään. (Manninen & Nyman 2003.) Eläinliikenne on hyvä ohjata lypsyltä suoraan ruokintaosastolle, jottei lehmä mene makuulle heti lypsyn jälkeen vedinkanavan ollessa vielä auki (Manninen ym. 2002). Yksi automaattinen lypsylaitteisto lypsää yleensä 50–60 lehmää. (Manninen & Nyman 2003.)

Ennen lypsyä automaattinen lypsylaitteisto puhdistaa lehmän vetimet, joko pyörivien harjarullien (kuva 2) tai pesukupin avulla (Maitohygienialiitto 2007a). Automaattinen lypsykone lypsää alkusuihkeet erilleen muusta maidosta joko pesun yhteydessä tai varsinaisen lypsyn alkaessa. Alkusuihkeet päästetään lattialle tai viemäriin, eikä niitä tarkisteta erikseen. (Suokannas ym. 2004.)



Kuva 2. Vedinten puhdistus harjarullien avulla.

Lasersäde paikantaa vedinten sijainnin ja robottikäsi kiinnittää nännikupit yksi kerrallaan (kuva 3). Jos nännikuppi irtaoo kesken lypsyn, kone kiinnittää sen uudelleen. Automaattinen lypsykone lypsää lehmän neljänneskohtaisesti. Lypsylaitteistosta riippuen voidaan maidosta lypsyn aikana mitata neljänneskohtainen tuotos, lämpötila, sähköjohtokyky sekä väri ja/tai optinen indeksi. (Suokannas ym. 2004.)



Kuva 3. Robottikäsi kiinnittää nännikupit yksi kerrallaan.

Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 8/EEO/2002 mukaan automaattisessa lypsylaitteistossa on oltava erottelujärjestelmä, joka itsenäisesti havaitsee ja ohjaa muuttuneen raakamaidon erilleen elintarvikkeeksi tarkoitettusta raakamaidosta. Järjestelmään tulee myös voida etukäteen ohjelmoida tiedot esimerkiksi lääkityistä eläimistä, joiden maito on automaattisesti ohjattava erilleen. Järjestelmän tulee tallentaa tiedot vetimien puhdistamatta jättämisestä ja lypsylaitteiston sekä raakamaidon jäähdytys- ja varastointilaitteiden puhdistamisen epäonnistumisesta.

Kaikissa automaattisissa lypsylaitteistoissa on pesuohjelma, joka huuhtelee, pesee ja desinfioi koko laitteiston vähintään kolme kertaa vuorokaudessa. Tämän lisäksi on erilaisia huuhtelujärjestelmiä. Kontaminoituneen maidon lypsämisen jälkeen laitteistosta huuhdellaan se osa, jossa eroteltava raakamaito on kulkenut. Kun laite ei ole ollut käytössä vähään aikaan, kone käynnistää välihuuhtelun estääkseen maidon kuivumisen laitteiston pinnoille. Myös tietyn lypsylukumäärän jälkeen laitteisto huuhdellaan. Lypsin huuhdellaan jokaisen lehmän lypsämisen jälkeen. Tällä estetään patogeenien siirtymisen lehmästä toiseen. (Schuiling ym. 2001.)

Automaattisen lypsyjärjestelmän huonona puolena on, että kaikki lehmät eivät välttämättä sovellu siihen. Esimerkiksi epätasainen utarerakenne tai toisiaan lähellä olevat vetimet voivat olla ongelma, sillä nännikupin kiinnittäminen hankaloituu. (Manninen 2002.)

Maa- ja metsätalousministeriön asetuksessa 8/EEO/2002 annetaan automaattilypsyä koskevat erityiset vaatimukset. Kansainvälinen ISO-standardi 20966:2007 määrittää automaattiselle lypsylaitteistolle asetettavat suorituskykyvaatimukset ja testit.

2.6 Lypsyhygienia

Raakamaito on steriiliä lehmän utareessa (Koort & Sivelä 2007). Raakamaidon kontaminoituminen mikrobeilla tapahtuu lypsyn yhteydessä vedinkanavasta, utareen ja vetimien pinnalta, lypsylaitteistosta, maitoputkesta sekä tilasäiliöstä. Myös lypsäjän hygienisyys sekä ympäristö, kuten ilma ja vesi voivat vaikuttaa lypsetyn raakamaidon mikrobipitoisuuteen. Raakamaito voi kontaminoitua lypsyn aikana, etenkin jos ennen lypsyä tehtävä utareiden ja vetimien puhdistus on ollut puutteellinen. Raakamaidon mikrobipitoisuus voi tällöin vaihdella alle sadasta pesäkkeistä muodostavasta yksiköstä useisiin tuhansiin pesäkkeistä muodostaviin yksiköihin millilitrassa. Lypsäjä voi lisäksi huonolla käsihygieniallaan levittää utaretulehdusbakteereita lehmästä toiseen. (ICMSF 2005.)

Lypsyn hygieenisyyteen vaikuttaa siis koko navetan puhtaus. Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 8/EEO/2002 mukaan lypsypaikka, lypsylaitteet ja -välineet sekä maidon jäähdytys- ja säilytystilat on pidettävänä puhtaina ja hyvässä kunnossa. Parsinavetassa ja pihaton lypsyasemalla lypsylaitteet ja -välineet pestään heti lypsytapahtuman jälkeen. Asetuksen 8/EEO/2002 mukaan automaattilypsyssä raakamaitoon kosketuksessa oleva laitteisto on pestävä vähintään kolme kertaa vuorokaudessa ja desinfioitava tarvittaessa. Raakamaidon kanssa kosketuksiin joutuvien pintojen, laitteiden ja välineiden puhdistamiseen ja huuhteluun käytettävän veden on oltava laadukasta, ettei raakamaidon kontaminoituminen johdu käytetystä pesuvedestä. Myös eläinten juomaveden laadun on oltava hyvä. Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 134/2006 mukaan veden laatu on tutkittava säännöllisesti, vähintään kolmen vuoden välein.

Parsinavetassa sekä pihaton lypsyasemalla ihminen puhdistaa lehmien utareet ja vetimet sekä varmistaa niiden puhtauden visuaalisesti. Suositeltava puhdistusmenetelmä on lehmäkohtainen lypsyliina. Lypsyliinaa käytettäessä puhtaalla, kuumassa vedessä (55 °C) olleella, nihkeällä liinalla puhdistetaan utareen pohja ja alaosa sekä vetimet ja erityisesti vedinten päät. (Manninen ym. 2005.)

Automaattisessa lypsyjärjestelmässä lehmien vedinten puhdistuksen hoitaa robotti. Koska automaattilypsyssä ihminen ei kontrolloi utareiden ja vedinten puhtautta ennen

lypsyä, on niiden oltava puhtaita jo lypsylle tultaessa. (Maitohygienialiitto 2007a.) Automaattilypsylaitteisto suorittaa vedinten puhdistuksen joko pyörivien harjarullien tai pesukupin avulla. Pesukuppi puhdistaa vetimet yksi kerrallaan paineilman ja haalean veden avulla. Pesukupit ja harjarullat pestään jokaisen lypsykerran jälkeen. (Suokannas ym. 2004.)

Vedinten pesut saattavat joskus epäonnistua, sillä laite ei välttämättä löydä vedintä, vedin saattaa olla huonossa asennossa pesulaitteeseen nähden tai lehmä saattaa liikahtaa vedinten paikannuksen jälkeen. (Maitohygienialiitto 2007a.) Useissa automaattisissa lypsylaitteistoissa puhdistetaan vain vetimet eikä utareita. Robotti saattaa epäonnistua nännikupin kiinnityksessä yrittäen kiinnittää nännikuppia vetimen viereen. Tällöin nännikuppi voi osua likaiseen, puhdistamattomaan utareeseen, ja raakamaitoon joutuu mikrobeja. (Knappstein ym. 2002.) Vedinpesujärjestelmät eivät pysty puhdistamaan tehokkaasti erittäin likaisia vetimiä. Järjestelmät eivät toistaiseksi pysty määrittämään vedinten puhtautta ennen pesua ja puhdistustulosta pesun jälkeen. (Maitohygienialiitto 2007a.) Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen 134/2006 mukaan vedinten riittävän puhdistamisen varmistamiseksi puhdistustapahtumaa on seurattava säännöllisesti. Seurannasta, havainnoista sekä korjaavista toimenpiteistä on pidettävä kirjaa.

Ruotsalaisessa tutkimuksessa verrattiin vedinten puhdistamisen tehokkuutta automaattisen lypsykoneen (DeLaval VMSTM) ja perinteisen käsintehdyn menetelmän välillä. Ennen lypsyä lehmien vetimet kontaminoitiin *Clostridium tyrobutyricum* -itiöliuoksella. Tutkimuksessa todettiin, että perinteisellä tavalla, puhtaalla kostealla paperilla puhdistettaessa 65 % itiöistä saatiin poistetuksi. Automaattisella lypsytekniikalla vastaava osuus oli 98 %. Toisaalta automaattisen lypsyjärjestelmän puhdistustapahtuman huomattiin ajoittain epäonnistuvan, minkä takia yksittäisten lehmien raakamaidon itiöpitoisuus nousi samalle tasolle perinteisen lypsytekniikan kanssa. (Melin ym. 2002.) Automaattilypsytekniikan puhdistustulos oli yllättävän suuri perinteiseen puhdistukseen verrattuna, mutta tutkimus ei välttämättä simuloi kovin hyvin mekaanisesti poistettavaa pinttynyttä likaa, mikä on varsinkin automaattilypsytekniikan ongelma.

Kanadalaisessa tutkimuksessa ei puolestaan havaittu merkittävää eroa puhdistustuloksessa, kun vetimet puhdistettiin perinteisellä tekniikalla tai automaattisella lypsylaitteella (Ten Hag & Leslie 2002).

Lypsylaitteistoihin jäävät maitojäämät toimivat hyvinä kiinnittymispintoina sekä ravinnonlähteinä bakteereille. Raakamaidon lypsylämpötila on myös suotuisa bakteerikasvulle. (Koort & Sivelä 2007.) Jos raakamaitoa jää putkiin, bakteerit pääsevät kasvamaan putkien pinnoilla. Laitteiden pitkittyneen puutteellisen pesun takia putkien pinnoille voi muodostua biofilmiä. Biofilmi sisältää suuria määriä bakteereita ja se on erittäin resistentti kemiallisille puhdistusaineille. Tämän takia maitojäämät on poistettava putkien pinnoilta pesemällä putket perusteellisesti heti lypsyn jälkeen. (Frank 2007.)

3 Raakamaidon mikrobiologia

3.1 Maidon mikrobiologia

Raakamaito on bakteereille suotuisa kasvualusta, sillä maidossa on runsaasti ravinteita, maidon vesiaktiivisuus (a_w) on suuri ja maidon pH on lähellä neutraalia. Tärkeimmät ravintoaineet ovat rasva, laktoosi, mineraalit, proteiinit sekä ei-proteiiniperäiset typenlähteet. Raakamaidossa on kuitenkin myös mikrobikasvua rajoittavia tekijöitä. Osa ravinteista on huonosti käytettävässä muodossa. Esimerkiksi suurin osa raakamaidon sokereista on laktoosia, jota läheskään kaikki mikrobit eivät pysty hyödyntämään. Raakamaidossa rasvat ovat puolestaan suojassa mikrobeilta fosfolipidien sekä glyko- ja lipo-proteiinien peittämissä palloissa. Tuoreessa maidossa on myös mekanismeja, jotka inhiboivat mikrobikasvua. Laktoferriini sitoo rautaa ja rajoittaa näin paljon rautaa vaativien bakteerien, kuten psykrotrofisten aerobien ja koliformien kasvua. Laktoperoksidaasisysteemi puolestaan inhiboi erityisesti gram-negatiivisia bakteereita ja lysotsyymi pääasiassa gram-positiivisia bakteereita. (Koort & Sivelä, 2007.)

3.2 Hygieniaindikaattorit

3.2.1 Mesofiiliset aerobiset mikrobit

Mesofiilisilla aerobisilla mikrobeilla tarkoitetaan niiden bakteerien, hiivojen ja homeiden määrää, jotka muodostavat näkyviä pesäkkeitä menetelmän mukaisissa olosuhteissa. Mesofiiliset aerobiset mikrobit eivät osoita tiettyä mikrobikontaminaation lähdettä, vaan kuvaavat raakamaidon yleistä hygieniaa (Chambers 2002).

Mesofiilisista aerobisista mikrobeista käytetään myös nimitystä pesäkemäärä tai kokonaispesäkeluku (Standard plate count, SPC, Chambers 2002). Maljavalutekniikalla määritetyt mesofiiliset aerobiset mikrobit antavat tulokseksi elävien mikrobien pesäkkeitä muodostavia yksiköitä millilitraa kohden, pmy/ml. Maljoilla pesäkkeet saattavat muodostaa rykelmiä ja kasoja, jotka lasketaan yhdeksi pesäkkeitä muodostavaksi yksiköksi. Nimitys kokonaisbakteeripitoisuus (Total Plate Count, TPC) tarkoittaa puolestaan bak-

teerien kokonaismäärää, mikä saadaan analysoitua Bactoscan-laitteella. Bactoscan laskee näytteen kaikki yksittäiset bakteerisolut sekä myös kuolleet solut, jos niissä on riittävä määrä värjättyä DNA:ta. Tämän takia Bactoscan saattaa antaa huomattavastikin suurempia bakteerimääriä maljavalutekniikkaan verrattuna (Walstra ym. 2006).

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 853/2004 mukaan lehmän raakamaidosta on otettava vähintään kaksi näytettä kuukaudessa kokonaispesäkeluvun tutkimiseksi. Tämän lisäksi on otettava vähintään yksi näyte kuukaudessa somaattisten solujen tutkimiseksi. Pesäkeluvun geometrinen keskiarvo ei saa kahden kuukauden ajalta ylittää arvoa 100 000 pmy/ml. Solujen määrän geometrinen keskiarvo ei saa kolmen kuukauden ajalta ylittää arvoa 400 000/ml. Tämän lisäksi automaattilypsyä käyttävältä tilalta on tutkittava raakamaidon kokonaispesäkeluku, somaattisten solujen määrä sekä jäätymis piste vähintään kerran kuukaudessa kuuden kuukauden ajan tilan ensimmäisen automaattisen lypsylaitteiston käyttöönoton jälkeen. (Maitohygienialiitto 2007a.)

3.2.2 Enterobakteerit

Enterobakteerit ovat aerobisia tai fakultatiivisesti anaerobisia, gram-negatiivisia sauva-bakteereita, ja ne muodostavat happoa glukoosista. Enterobakteerit eivät muodosta itiöitä. (Pirhonen 1990.) Enterobakteerit kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon, jonka tavallisimpia sukuja ovat *Salmonella*, *Serratia*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Hafnia*, *Providencia* ja *Enterobacter*. Enterobakteereja esiintyy laajasti levinneenä luonnossa, vedessä ja maaperässä sekä ihmisten ja eläinten suolistoissa. (Janda & Abbott 2006.) Tämän takia ne ovat hyviä hygieniaindikaattoreita tarkasteltaessa maidon kontaminoitumista maa-aineksella tai lannalla.

3.3 Pilaajamikrobit

3.3.1 Klostridi-itiöt

Klostridit ovat anaerobisia, gram-positiivisia sauvabakteereita. Ne muodostavat itiöitä, jotka eivät tuhoudu pastöroinnissa. (Pirhonen 1990.) *Clostridium*-suvun bakteereita esiintyy mm. maaperässä sekä ihmisten ja eläinten suolistossa. Bakteerit pääsevät raakamaitoon maaperän, ulosteen sekä ravinnon, erityisesti säilörehun kautta. (Gilmour & Rowe 1990.) Säilörehussa olevat itiöt eivät tuhoudu lehmän ruuansulatuselimistössä, vaan kulkeutuvat ruuansulatuselimistön läpi lantaan (Mantere-Alhonen 1990). Varsinkin likaiset lehmät ja lypsylaitteiston huono hygienia vaikuttavat raakamaidon klostridi-itiöiden määrään (Suokannas ym. 2004).

Klostridi-itiöt eli voi happobakteeri-itiöt aiheuttavat ongelmia meijeriteollisuudessa, sillä ne pilaavat juustoja voi happokäymisellä ja kaasun muodostuksella. Tämän seurauksena juustot repeilevät ja niihin muodostuu epämiellyttävää hajua ja makua. (Bergère & Sivelä 1990.) Puolikovien juustojen kuten Goudan valmistuksessa on tärkeää, että jälkikäymistä aiheuttavien bakteeri-itiöiden määrä raakamaidossa on alle 1 itiötä 10 ml:ssa. Klostridi-itiöiden aiheuttamista pilaantuneista juustoista voi seurata suurtakin tuotehävikkiä. (Klijn ym. 1995.)

Säilörehun on todettu olevan klostridi-itiöiden tärkein kontaminaatiolähde. Säilörehun klostridi-itiöpitoisuuden ollessa alle 1 000 itiötä/g saadaan tilasäiliön raakamaidon itiöpitoisuudeksi alle 1 itiö/ml, kun lehmän utareet on puhdistettu normaalilla tavalla. Säilörehua, jossa on yli 100 000 itiötä/g, ei pitäisi syöttää lehmille lainkaan, koska tällöin ei ole mahdollista saavuttaa juustolamaidon vaatimaa maidon klostridi-itiötasoa hyvälläkään navettahygienialla. (Vissers ym. 2006.)

Klijn ym. (1995) totesivat tutkimuksessaan, että *C. tyrobutyricum* on juustojen voi happokäymisen pääasiallinen aiheuttaja. Tutkimuksessa todettiin *C. tyrobutyricum* -bakteeri kaikista kaasun muodostuksen vuoksi halkeilleista kaupallisista sekä keinotekoisesti

kontaminoiduista juustonäytteistä. Joistakin kaupallisista juustoista havaittiin myös *C. beijerinckii* -bakteeri.

C. tyrobutyricum -bakteerien optimikasvulämpötila on 37 °C ja optimi-pH 5,8–6,0. Käymistuotteina syntyy voi- ja etikkahappoa, vetyä ja hiilidioksidia. (Mantere-Alhonen 1990.) *C. sporogenes* -bakteerit muodostavat käymistuotteinaan voi- ja etikkahappoa sekä aiheuttavat juustoissa proteolyysiä. Optimilämpötila-alue kasvulle on 30–40 °C, mutta bakteerit pystyvät kasvamaan myös 25 °C lämpötilassa. (Gilmour & Rowe 1990.)

3.3.2 Aerobiset bakteeri-itiöt

Maitotuotteita pilaavat aerobiset bakteeri-itiöt ovat yleensä raakamaidosta peräisin olevia *Bacillus*-suvun bakteerien itiötä. Bacilluksista yleisimpiä ovat *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium* ja *B. subtilis*. Vegetatiiviset *Bacillus*-suvun bakteerit kuolevat maidon kuumennuskäsittelyssä, mutta bakteerien muodostamat itiöt voivat selvitä siitä. Itiöt voivat germinoitua vegetatiivisoluiksi, joiden tuottamat entsyymit voivat saada tuotteissa aikaan haju- ja makuvirheitä hajottamalla proteiineja ja rasvaa. Aerobiset bakteeri-itiöt pilaavat lähinnä tuotteita, joista vegetatiiviset solut ovat kuolleet, sillä itiöt eivät yleensä menesty kilpailussa nopeammin kasvavia bakteereita vastaan. (Koort & Sivelä 2007.) Raakamaidon *Bacillus*-itiöt vaikuttavat kuumennuskäsiteltyjen maitotuotteiden säilyvyysajan pituuteen (Giffel ym. 2002).

Säilörehua on pidetty raakamaidon merkittävänä itiölähteenä. Itiöt kulkeutuvat germinoitumatta lehmän ruuansulatuselimistön läpi lantaan, josta ne voivat kontaminoituneiden utareiden kautta siirtyä raakamaitoon. Raakamaidon itiömäärää voidaan pienentää estämällä aerobisten bakteeri-itiöiden kasvua säilörehussa. Tämän takia säilörehun fermentaatiota on kontrolloitava. (Giffel ym. 2002.) Aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuksien on todettu olevan suurempia talvella kuin kesällä. Syynä tähän pidetään talvella kontaminoituneita makuualustamateriaaleja (Sutherland & Murdoch 1994). Talvella itiöt ovat pääosin peräisin säilörehusta, ja kesällä itiöt ovat pääosin *Bacillus*-suvun bakteerien itiöitä, jotka siirtyvät lehmien utareiden pinnoille maasta lehmien laiduntaessa.

3.3.3 *Bacillus cereus* -itiöt

Bacillus cereus on gram-positiivinen, itiöllinen bakteeri, joka kasvaa sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. Se pystyy lisääntymään melko kuivassa ympäristössä ja laajalla pH-alueella, pH 4,3–9,3. *B. cereus* -bakteerin optimilämpötila on 28–35 °C, mutta bakteeri pystyy lisääntymään lämpötila-alueella 4–50 °C. (Pönkä 1999.) *B. cereus* -itiöistä 90 % tuhoutuu 100 °C:n lämpötilassa 2,2–5,4 minuutin aikana. *B. cereus* -itiöt selviävät siis hengissä maidon pastöroinnista. (Johansson & Markkula 2003.) *B. cereus* -bakteeri muodostaa ekstrasellulaarista proteaasia ja lesitinaasia, jotka voivat aiheuttaa saostumista sekä haju- ja makuvirheitä pastöroituun maitoon (Pirhonen 1990). *B. cereus* on *Bacillus*-suvun yleisin ruokamyrkytysten aiheuttaja. Ruokamyrkytystyypppejä on kaksi, ns. oksetus- ja ripulityyppi. Yleensä ruokamyrkytys syntyy vasta bakteeripitoisuuden noustessa yli arvon 100 000 pmy/g. (Johansson & Markkula 2003.) Maidon ja maitovalmisteiden on harvoin raportoitu aiheuttavan *B. cereus* -ruokamyrkytyksiä (Pirhonen 1990).

B. cereus esiintyy yleisesti maaperässä, kasveissa, vesistöissä, ilmassa sekä ihmisten ja eläinten suolistossa ja pieninä pitoisuuksina raaoissa elintarvikkeissa. Raakamaidon tärkeimmät kontaminaatiolähteet *B. cereus* -itiöillä ovat maaperä (Christiansson ym. 1999) ja makuualustana käytetyt materiaalit (Magnusson ym. 2007). Itiöt pääsevät raakamaitoon kontaminoituneiden vedinten välityksellä (Magnusson ym. 2007). Christiansson ym. (1999) havaitsivat ruotsalaisessa tutkimuksessaan, että rehun ja ilman *B. cereus* -itiöpitoisuudet ovat liian pieniä ollakseen raakamaidon pääasiallisia kontaminaation lähteitä. Magnusson ym. (2007) totesivat edellisen lisäksi, että myös lanta on epätodennäköinen raakamaidon *B. cereus* -itiöiden kontaminaatiolähde.

B. cereus -itiöpitoisuudet ovat 100 kertaa suuremmat maaperässä kuin rehussa, lannassa ja makuualustamateriaaleissa. Maaperän suurien *B. cereus* -itiöpitoisuuksien takia vetimien kontaminoituminen maaperällä on pyrittävä estämään. (Vissers ym. 2007a.) *B. cereus* -itiöiden aiheuttaman kontaminaatiomäärän on havaittu olevan merkittävästi suurempi lehmien laiduntaessa kuin niiden ollessa navetassa (Slaghuis ym. 1997). Laitu-

mella lehmien utareet kontaminoituvat maa-aineksella, jossa on paljon *Bacillus*-suvun bakteereita.

3.4 Patogeenit

3.4.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes on gram-positiivinen, katalaasiposiivinen sauvabakteeri. *L. monocytogenes* -bakteerin optimikasvulämpötila on 30–37 °C, mutta se pystyy lisääntymään lämpötila-alueella 2,5–42 °C, minkä takia se voi lisääntyä hitaasti myös jääkaappilämpötilassa. (Pirhonen 1990.)

Listeria-sukuun kuuluu seitsemän lajia, joista ainoastaan *L. monocytogenes* on patogeeninen ihmiselle. *L. monocytogenes* voi aiheuttaa sekä ihmisille että eläimille vakaviakin sairauksia, kuten verenmyrkytyksiä, aivokalvontulehduksia, influenssan tyyppisiä oireita tai keskenmenoja. Erityisesti vanhuksilla, odottavilla äideillä, pienillä lapsilla, sairaila sekä huonontuneen vastustuskyvyn omaavilla henkilöillä on vaara sairastua *L. monocytogenes* -bakteerin aiheuttamiin sairauksiin. (Pirhonen 1990.) Listerian aiheuttamia sairaustapauksia, listeriooseja, raportoidaan Suomessa 30–50 tapausta vuosittain. Riskiryhmien on todettu sairastuvan elintarvikkeista, joiden *L. monocytogenes* -pitoisuudet ovat vaihdelleet välillä < 10 – 10 000 pmy/g, ja terveiden henkilöiden on todettu sairastuvan pitoisuuksista 100 000 – 1 000 000 000 pmy/g. (Johansson & Markkula 2003.)

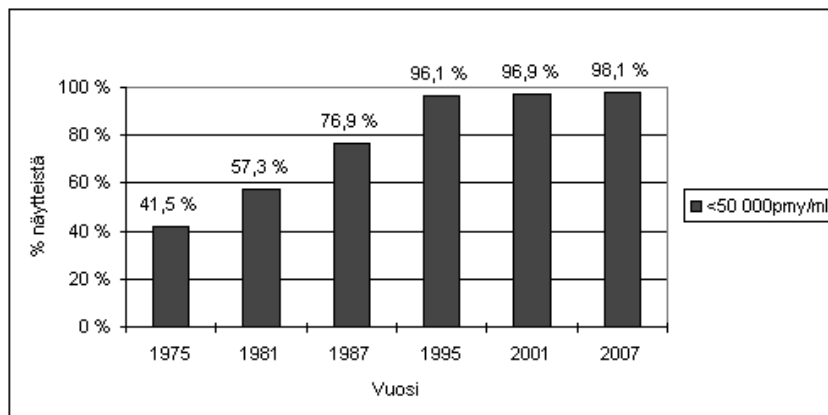
L. monocytogenes -bakteeria voi esiintyä elintarviketuotantolaitoksissa, joissa bakteeria todetaan viemärikaivoista, kosteilta pinnoilta ja elintarvikkeiden käsittelylaitteista. *Listeria* pystyy kiinnittymään erilaisiin pintamateriaaleihin, kuten ruostumattomaan teräkseen, ja voi muodostaa pinnoille biofilmiä, josta se on vaikea poistaa. (Pönkä 1999.) Sama *L. monocytogenes* -kanta voi tehokkaista pesuista huolimatta säilyä tuotantolaitoksissa monia vuosia saastuttaen tuotteita aika ajoin. *L. monocytogenes* -bakteereita voi esiintyä erityisesti kalassa ja kalatuotteissa, lihassa ja lihatuotteissa, vihanneksissa sekä pastöroimattomassa maidossa ja siitä valmistetuissa juustoissa. Riskituotteita ovat pastöroimattomasta maidosta valmistetut homejuustot ja tuorejuustot sekä muut pehmeät

juustot. *Listeria* tuhoutuu pastörintilämpötilassa (72 °C). (Johansson & Markkula 2003.)

L. monocytogenes on maabakteeri, joka esiintyy hyvin yleisesti luonnossa (Pirhonen 1990). Lypsytilan puutteellinen puhdistus, likaiset lehmät, säilörehun huono laatu sekä lypsyjen välillä huonosti puhdistetut lypsyliinat vaikuttavat merkittävästi maidon kontaminoitumiseen *L. monocytogenes* -bakteerilla (Sanaa ym. 1993).

3.5 Maidon laadun kehitys

Kuvassa 4 on esitetty raakamaitonäytteiden pesäkemäärän kehitys vuosina 1975–2007. Tilastojen mukaan raakamaidon laatu on parantunut huomattavasti viimeisten kolmenkymmenen vuoden aikana. Vuonna 1975 bakteerien pesäkemäärä oli 41,5 prosentissa yksittäisistä tuottajamaitonäytteistä $< 5,0 \times 10^4$ pmy/ml. Vastaavat osuudet vuosina 1981, 1987, 1995, 2001 ja 2007 olivat 57,3 %, 76,9 %, 96,1 %, 96,9 % ja 98,1 %.



Kuva 4. Tuottajamaitonäytteiden, pesäkemäärä $< 50\,000$ pmy/ml, osuus kaikista tuottajamaitonäytteistä. (Maitohygienialiitto 2007b)

Tuottajamaidot jaetaan bakteerimäärän perusteella laatuhinnoitteluluokkiin, joiden perusteella tuottajille maksetaan hyvitykset ja vähennykset tuotetusta maitomäärästä. Tällä pyritään varmistamaan laadukkaan maidon tuottaminen tiloilla. E-laatuluokan maidossa bakteerimäärä on alle 50 000 pmy/ml (kahden kuukauden geometrinen liukuva keskiarvo) ja somaattisten solujen määrä alle 250 000/ml (kolmen kuukauden geometrinen liukuva keskiarvo). (Maitohygienialiitto 2008b.) Taulukossa 1 on esitetty bakteerimäärän

ja somaattisten solujen määrän vaatimukset eri laatuhinnoitteluluokissa. Laatuhinnoitteluluokka määräytyy huonomman ominaisuuden luokan mukaan.

Taulukko 1. Maidon laatuhinnoittelussa meijerien käyttämä luokitus Suomessa. (Maitohygienialiitto 2008c)

Bakteerien määrä / ml (Geometrinen keskiarvo, 2 kk, liukuva)	Luokka	Somaattisten solujen määrä / ml (Geometrinen keskiarvo, 3 kk, liukuva)
< 50 000	E	< 250 000
50 000 – 100 000	I	250 000 – 400 000
> 100 000	II	> 400 000

3.6 Aikaisempia tutkimuksia

Valio Oy:ssä tehtiin raakamaidon mikrobiflooran kartoitus vuonna 1998. Työssä tutkittiin raakamaidon mikrobiflooran koostumusta tuottajamaidoissa sekä keräilyn ja meijereiden siilovarastoinnin aikana. Tuottajamaitonäytteiden mikrobiologinen laatu todettiin hyväksi. Tuottajamaitojen kokonaispesäkemäärän geometrinen keskiarvo oli $5,1 \times 10^3$ pmy/ml. Satunnaisissa tuottajamaitonäytteissä todettiin korkeita klostriditiöpitoisuuksia sekä *Staphylococcus aureus* -pitoisuuksia. Tutkimuksessa todettiin maidon laadun olevan parempi tuottajamaitonäytteissä kuin reittinäytteissä.

Automaattisen lypsyjärjestelmän vaikutusta raakamaidon mikrobiologiseen laatuun on tutkittu useissa maissa. Klungel ym. (2000) tutkivat Hollannissa 29:n automaattiseen lypsyjärjestelmään siirtyneen tilan raakamaitonäytteitä. Vertailuaineistona heillä oli perinteisen lypsytekniikan tiloja, joissa lypsettiin kaksi kertaa päivässä ($n = 49$) tai kolme kertaa päivässä ($n = 28$). Kokonaisbakteeripitoisuus, vapaiden rasvahappojen määrä sekä jäätymispiste kohosivat siirryttäessä perinteisestä lypsytekniikasta automaattilypsytekniikkaan. Myös Rasmussen ym. (2002) havaitsivat tanskalaisessa tutkimuksessa kokonaisbakteeripitoisuuden ja jäätymispisteen nousun automaattilypsyssä tavanomaiseen lypsyyn verrattuna. Näiden lisäksi he havaitsivat anaerobisten itiöiden ja somaattisten solujen määrän kasvavan siirryttäessä käyttämään automaattista lypsylaitteistoa.

Automaattilypsyä on tutkittu Euroopan laajuisessa tutkimuksessa vuosina 2000–2004. Eurooppa-projektin tarkoituksena oli tarkastella automaattisen lypsyjärjestelmän soveltuvuutta ja käyttömahdollisuuksia Euroopassa sekä selvittää uudehkon lypsytekniikan vaikutusta mm. lypsyhygieniaan, maidon laatuun, eläinten terveyteen ja hyvinvointiin sekä maatilán hoitoon ja hallintaan. Projektissa mukana olleet maat olivat Belgia, Tanska, Saksa, Iso-Britannia, Alankomaat ja Ruotsi. Projektista on julkaistu useita artikkeleita ja raportteja, joissa käsitellään automaattilypsyn etuja ja haittoja. (EU-project Automatic milking.)

Raakamaidon klostridi-itiöiden kontaminaatiolähteitä on tutkittu Alankomaissa (Vissers ym. 2006; Vissers ym. 2007b). Tutkimuksissa säilörehun todettiin olevan raakamaidon tärkein kontaminaatiolähde.

Raakamaidon *Listeria monocytogenes* -pitoisuuksia on tutkittu useissa maissa, kuten Suomessa, Espanjassa, Skotlannissa, Englannissa, Walesissa, Yhdysvalloissa ja Kanadassa. Positiivisten näytteiden osuus on yleensä ollut alle 5 %, mutta muutamia huomattavasti suurempiakin tuloksia on havaittu. Esimerkiksi yhdysvaltalaisissa tutkimuksissa *L. monocytogenes* todettiin 12 prosentissa raakamaitonäytteistä (n = 121) (Hayes ym. 1986) sekä 19,7 prosentissa raakamaitonäytteistä (n = 172) (Latorre ym. 2009).

Maitohygienialiitto ry on julkaissut Pohjoismaiden bakteerilukutietoja vuosilta 2002–2007 (taulukko 2). Tilastot osoittavat, että Suomessa bakteeriluvut ovat alhaisia. Vain Norjassa bakteeripitoisuus on hieman pienempi kuin Suomessa.

Taulukko 2. Pohjoismaiden bakteerilukujen keskiarvot vuosina 2002–2007. (Maitohygienialiitto 2007c)

Maa	Bakteerilukujen keskiarvo (pmy/ml)											
	Geometrinen						Aritmeettinen					
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Norja								6 800	6 300	8 000	7 400	7 100
Suomi	6 500	6 400	6 000	5 600	5 700	5 500	11 800	11 800	10 900	10 200	10 000	9 600
Tanska	7 580	6 800		7 171	7 600	7 800	16 580	15 300		14 978	19 000	20 400
Islanti	8 000		7 500	7 000	6 000	7 000					17 000	16 000
Ruotsi										13 700	16 300	

3.7 Tulevaisuus

Yleisesti ottaen vaikuttaa siltä, että ollaan siirtymässä suurempaan tilakokoon, jolla tyyppillisesti käytetään myös uutta tuotantoteknologiaa. Karjakoon kasvaessa ja tiloilla tuotetun maitomäärän suurentuessa maidon laatuongelmat yksittäisellä tilalla näkyvät helpommin virheenä tuotantoprosessissa ja tuotteissa. Uusi tuotantoteknologia, kuten automaattilypsyn käyttöönotto, voi aiheuttaa uusia maidon laatuongelmia. Tämän takia jokaisen tilan tuotantoprosessia on seurattava systemaattisesti. (Nousiainen ym. 2007.)

Tällä hetkellä Suomessa suurin osa navetoista on parsinavettoja, mutta pihattotilojen määrä on jatkuvassa kasvussa. Koko ajan yhä suurempi osa maidosta lypsetään lypsyaemalla tai automaattisella lypsylaitteistolla. Tämän takia on tärkeää tarkastella varsinkin pihatton lypsyttekniikoilla lypsetyn raakamaidon mikrobiologista laatua ja arvioida sen kehittymistä tulevaisuudessa.

Varsinkin automaattilypsytekniikan mikrobiologinen laatu saattaa tulevaisuudessa parantua vedinpesujärjestelmien kehittyessä, sillä tällä hetkellä vedinpesujärjestelmät eivät esimerkiksi pysty puhdistamaan tehokkaasti erittäin likaisia vetimiä. Tekniikan kehityessä lypsyjärjestelmät saattavat lisäksi pystyä määrittämään vedinten puhtauden ennen pesua ja pesun jälkeen.

Yksi tulevaisuuden päätavoitteista on pastöroidun maidon tuoreuden ja mikrobiologisen laadun parantaminen, jotta maidon säilyvyysaikaa saataisiin pidennettyä. Pilaajabakteerit ovat säilyvyysajan laajentamisen rajoittava tekijä. Tämän takia näiden mikrobien kontrolloimiseen ja niiden määrän vähentämiseen on kiinnitettävä erityistä huomiota. (Boor & Fromm 2006.)

KOKEELLINEN OSA

4 Tutkimuksen tavoitteet

Työn tavoitteena oli tutkia raakamaidon mikrobiologista laatua vuonna 2008 sekä verrata kolmella eri lypsyttekniikalla lypsetyn raakamaidon mikrobipitoisuuksia toisiinsa.

Tutkimuksessa oli mukana parsinavettoja, joilla on käytössä perinteinen lypsyttekniikka, pihattotiloja, joilla on lypsyasema, sekä pihattotiloja, joilla on automaattinen lypsyjärjestelmä. Tutkimukseen valittiin mukaan mikrobiryhmiä, jotka vaikuttavat maitotuotteiden prosessiin, turvallisuuteen sekä laatuun. Raakamaidon hygieniaindikaattoreina olivat mesofiiliset aerobiset mikrobit ja enterobakteerit. Pilaajamikrobiryhmään kuuluivat klostridi-itiöt, aerobiset bakteeri-itiöt sekä *Bacillus cereus* -itiöt. Lisäksi tutkittiin *Listeria monocytogenes*, joka on patogeeninen ihmisille.

Työssä selvitettiin lisäksi vuodenajan vaikutusta raakamaidon mikrobiologiseen laatuun, minkä takia näytteenotto jaettiin kahteen osaan. Tarkoituksena oli ottaa tutkimuksessa mukana olleilta tiloilta raakamaitonäytteet sekä kesällä että talvella. Ensimmäinen näytekerros (kesäotanta) aloitettiin elokuussa 2008 ja toinen näytekerros (talviotanta) aloitettiin marraskuussa 2008.

4.1 Näytteenotto

Raakamaitonäytteet (n. 25 ml) otettiin tuottajatilojen tilasäiliöistä steriileihin muovipurkkeihin. Näytteenotto tapahtui keräilyauton automaattisella näytteenottolaitteella raakamaidon pumppauksen yhteydessä. Raakamaito pumpattiin tilasäiliöstä putkea pitkin, pumpun kautta maitoauton säiliöön. Näytteenottolaitte ottoi maitovirrasta tiipittain raakamaitoa näytteenottopurkkiin. Raakamaitonäytteeseen saattoi siis päästä mikrobeja maitoauton imuputkesta ja -pumpusta.

Näytteet otettiin Alueosuuskunta Promilkin, Osuuskunta Tuottajain Maidon ja Osuuskunta Maitosuomen alueilta. Näytteet kerättiin Valio Oy:n Lapinlahden ja Seinäjoen aluelaboratorioihin ja lähetettiin analysoitavaksi Pitäjänmäelle Valio Oy:n tutkimus- ja

tuotekehityksen laboratorioon. Näytteet analysoitiin 2 – 4 päivän kuluessa näytteenotosta. Poikkeuksena oli osa *Listeria monocytogenes* –määrityksen raakamaitonäytteistä, jotka vastaanotettiin pakastettuna.

Tutkimusta varten kerättiin yhteensä 563 raakamaitonäytettä tuottajatiloilta. Koeotanta oli ositettu satunnaisotanta. Tilat jaettiin lypsytekniikan mukaan kolmeen ryhmään, joista jokaisesta otettiin satunnaisesti 50 tilaa mukaan tutkimukseen.

Kesäotanta

Ensimmäiseltä näytekierrokselta kerättiin 144 raakamaitonäytettä, joista analysoitiin aerobiset bakteeri-itiöt, *Bacillus cereus* -itiöt, klostridi-itiöt, enterobakteerit sekä mesofiiliset aerobiset mikrobit. Näytteet otettiin 04.08.2008 - 07.10.2008 välisenä aikana. Samoilta tiloilta kerättiin uudet raakamaitonäytteet (n = 143) *Listeria monocytogenes* –määrityksiä varten 07.09.2008 - 06.10.2008 välisenä aikana.

Talviotanta

Talviotannassa kerättiin aluksi 138 raakamaitonäytettä, joista analysoitiin aerobiset bakteeri-itiöt, *Bacillus cereus* -itiöt, klostridi-itiöt, enterobakteerit sekä mesofiiliset aerobiset mikrobit. Näytteet otettiin 09.11.2008 - 07.01.2009 välisenä aikana. Samoilta tiloilta kerättiin uudet raakamaitonäytteet (n = 138) *L. monocytogenes* –määrityksiä varten 13.01.2009 - 23.02.2009 välisenä aikana.

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Mesofiiliset aerobiset mikrobit

- MPCA-alusta (Plate Count Agar + maitojauhelisäys)

Mesofiiliset aerobiset mikrobit määritettiin Valio Oy:n mikrobiologiset menetelmät Pesäkemäärä-ohjeen mukaan, joka perustuu ISO 4833:2003 -standardimenetelmään. Määrittämisessä käytetty kasvualusta on esitetty liitteessä 1.

Raakamaitonäytteestä pipetoitiin petrimaljoille laimennokset 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ja 10^{-4} . Siirrostus tehtiin maljavaluna käyttäen ravintoalustana MPCA-agaria. Maljoja inkuboitiin 30 °C:ssa 3 vuorokautta. Inkuboinnin jälkeen pesäkkeet laskettiin maljoilta ja saatujen tulosten perusteella laskettiin näytteen bakteeripitoisuus käyttäen painotetun keskiarvon kaavaa.

5.2 Enterobakteerit

- VRBG-ravintoalusta
- TSA-agari
- Kaupallinen oksidaasitesti

Enterobakteerit määritettiin Valio Oy:n mikrobiologiset menetelmät Enterobakteerit-ohjeen mukaan, joka perustuu NMKL 144 (2005) -menetelmään. Määrittämisessä käytetyt kasvualustat on esitetty liitteessä 1.

Siirrostus tehtiin maljavaluna laimennoksista 10^0 , 10^{-1} ja 10^{-2} , käyttäen ravintoalustana VRBG-agaria. Valettujen maljojen annettiin jäähtyä hetken ajan, minkä jälkeen kaadettiin peittokerros agaria maljalle. Maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa vuorokauden ajan, jonka jälkeen pesäkkeet laskettiin. Tapauksissa, joissa pesäkkeet eivät olleet tavanomaisen näköisiä, siirrostettiin pesäkkeitä TSA-agarille ja maljoja inkuboitiin yhden vuorokau-

den ajan 37 °C:ssa. Pesäkkeet varmistettiin kaupallisella oksidaasitestillä. Näytteen bakteeripitoisuus laskettiin painotetun keskiarvon kaavalla.

5.3 Klostridi-itiöt

- Bryant ja Burkey –alusta (BB-laktaatti)

Klostridi-itiöt määritettiin Valio Oy:n mikrobiologiset menetelmät Klostridi-itiöt maidossa –ohjeen mukaan. Määrittäksessä käytetty kasvualusta on esitetty liitteessä 1.

Raakamaitonäytettä pipetoitiin BB-laktaatti-putkiin 3 x 1 ml ja 3 x 0,1 ml eli yhteensä kuuteen putkeen. Putkiin annosteltiin tämän jälkeen noin 2 ml steriloitua parafiiniöljyä. Putkia kuumennettiin 75 °C:n vesihautessa 10 minuutin ajan, jolloin vegetatiivisolut tuhoutuivat. Heti kuumennuksen jälkeen putket laitettiin jäähtymään kylmään veteen. Putkia inkuboitiin 7 vuorokautta 37 ± 1 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen laskettiin positiivisten putkien määrä. Kaasun muodostus Durham-putkessa oli osoitus positiivisesta tuloksesta. Klostridi-itiöiden pitoisuus luettiin MPN-taulukosta (liite 2).

5.3.1 *Clostridium sporogenes* ja *Clostridium tyrobutyricum* -lajien tunnistus polymeraasiketjureaktio-menetelmällä (polymerase chain reaction, PCR)

Reagenssit:

- InstaGene Matrix
- Alukkeet:

Clostridium tyrobutyricum:

P5 (5' GGA ATC TTC CAC AAT GGG CG 3') ja

PTy (5' CGC CTA TCT CTA GGT TAT TCA G 3')

Clostridium sporogenes:

Psp(a) (5' CAC CTA TCT CTA GGC TAT GCA A 3') ja

Psp(s) (5' AAG CCC TGT TTT CTG GG 3')

- PCR-liuokset: DYNAZYME-reagenssipakkaus F-550L, Finnzymes

- Ala-mix:

Steriili vesi	12,5 µl
10 x puskuri	2,5 µl
Aluke F	2,5 µl (20 pmol/µl)
Aluke R	2,5 µl (20 pmol/µl)
- Ylä-mix:

Steriili vesi	21,0 µl
10 x puskuri	2,5 µl
10 mM dNTPs	1,0 µl
Polymeraasi	0,5 µl
- Etidiumbromidi (10 mg/ml)
- 0,7 % agarosigeeli
- 1 x TBE-puskuri

Laitteet:

- Sentrifugi, Eppendorf Centrifuge 5415 D
- PCR-ajolaite, PTC-100TM Programmable Thermal Controller
- Elektroforeesiajolaite 3000Xi Computer Controller Electrophoresis Power Supply, BIO-RAD
- Geelinkuvauskamera, Alphamager HP, Alpha Innotech

Seitsemän vuorokautta inkuboiduista positiivisen tuloksen antaneista klostridi-itiöputkista tehtiin DNA:n eristys InstaGene Matrix -pikamenetelmällä. Inkuboidusta putkesta pipetoitiin 1 ml näytettä eppendorf-putkeen. Eppendorf-putkea sentrifugoitiin kaksi minuuttia kierrosnopeudella 12 000 rpm, minkä jälkeen supernatantti poistettiin. Eppendorf-putkeen pipetoitiin 1 ml steriloitua vettä ja vorteksoitiin hyvin, jotta pelletti hajosi. Eppendorf-putkea sentrifugoitiin uudestaan kaksi minuuttia kierrosnopeudella 12 000 rpm. Supernatantti poistettiin ja putkeen pipetoitiin 200 µl InstaGene Matriksia. Vorteksoitiin hyvin. Putkea inkuboitiin 56 °C:ssa 30 minuuttia, vorteksoitiin ja inkuboitiin 100 °C:ssa 8 minuuttia. Tämän jälkeen putkea pidettiin jäällä n. 10 minuuttia ennen pakastamista.

Polymeraasiketjureaktiota varten numeroitiin 0,5 ml:n PCR-putket ja laitettiin ne jälle. Valmistettiin ala- ja ylä-mixit 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, mutta polymeraasi lisättiin vasta juuri ennen ajoa. Kuhunkin PCR-putkeen pipetoitiin 20 µl ala-mixiä. Tämän jälkeen PCR-putkiin pipetoitiin 5 µl InstaGene-eristettyä DNA:ta ja kontrolliin pipetoitiin steriiliä vettä. Lisättiin 50 µl sulaa DynaWax-vahaa (+85 °C) kuhunkin putkeen. Ylä-mixiä, johon oli lisätty polymeraasi, pipetoitiin putkiin 25 µl. PCR-putket laitettiin PCR-ajolaitteeseen ja käynnistettiin ajo-ohjelma. Taulukossa 3 on esitetty *C. tyrobutyricum* –lämpötilaohjelma ja taulukossa 4 on esitetty *C. sporogenes* –lämpötilaohjelma.

Taulukko 3. *Clostridium tyrobutyricum* –ohjelma.

Askel	Lämpötila	Aika
1. Alkudenaturaatio	94 °C	2 min
2. DNA–juosteiden erotus	94 °C	1 min
3. Alukkeiden tarttuminen	65 °C	1,5 min
4. DNA:n kahdentuminen	72 °C	1 min
5. Takaisin askeleeseen 2, 30 kertaa		
6. DNA:n kahdentuminen	72 °C	10 min
7. Loppujäähdytys	4 °C	15 min

Taulukko 4. *Clostridium sporogenes* –ohjelma.

Askel	Lämpötila	Aika
1. Alkudenaturaatio	94 °C	2 min
2. DNA–juosteiden erotus	94 °C	1 min
3. Alukkeiden tarttuminen	63 °C	1,5 min
4. DNA:n kahdentuminen	72 °C	1 min
5. Takaisin askeleeseen 2, 30 kertaa		
6. DNA:n kahdentuminen	72 °C	10 min
7. Loppujäähdytys	4 °C	15 min

Valmistettiin 0,7 % agarosigeeli. Jäähdytettiin se 55 °C:seen ja lisättiin etidiumbromidia 50 µg/100 ml. Valettiin geeli ja annettiin sen jähmettyä. PCR-tuotteisiin sekoitettiin 10 µl 6 x latauspuskuria. Tätä pipetoitiin 12 µl agarosigeelin koloihin ja ajettiin 1x TBE-puskurissa 100 V, 1 h ajan. Ajon jälkeen geeli kuvattiin kameralla UV-valon avulla.

5.4 Aerobiset bakteeri-itiöt

- Pesäkelaskenta-alusta (Plate Count Agar + maitojauheliöisyys)

Aerobiset bakteeri-itiöt määritettiin Valio Oy:n mikrobiologiset menetelmät Aerobiset bakteeri-itiöt –ohjeen mukaan. Määrittelyssä käytetty kasvualusta on esitetty liitteessä 1.

Raakamaitonäytettä pipetoitiin 5 ml koeputkeen ja kuumennettiin se 80 °C:seen 10 minuutin ajaksi, minkä aikana vegetatiivisolut kuolivat. Näyte jäähdytettiin. Siirrostus tehtiin maljavaluna laimennoksista 10^0 ja 10^{-1} . Ravintoalustana käytettiin MPCA-agaria. Maljoja inkuboitiin 2 vuorokautta 30 °C:ssa. Inkuboinnin jälkeen maljat laskettiin. Näytteen bakteeri-itiöpitoisuus laskettiin painotetun keskiarvon kaavalla.

5.5 *Bacillus cereus* -itiöt

- MYP-ravintoalusta

Bacillus cereus -itiöt määritettiin Valio Oy:n mikrobiologiset menetelmät Alustava *Bacillus cereus* –ohjeen mukaan, joka perustuu standardimenetelmään ISO 7932:2004. Menetelmällä ei pystytä erottamaan *B. cereus* lähisukuisista harvemmin esiintyvistä *Bacillus*-lajeista (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* ja *B. mycoides*). Määrittelyssä käytetty kasvualusta on esitetty liitteessä 1.

Raakamaitonäytettä pipetoitiin 5 ml koeputkeen ja kuumennettiin se 80 °C:seen 10 minuutin ajaksi. Tällöin vegetatiivisolut kuolivat. Jäähdyneestä näytteestä siirrostettiin 1 ml MYP-agarille pintalevityksenä. Käytettiin kolmea pientä maljaa (halkaisija 9 cm), joille 1 ml jaettiin. Maljoja inkuboitiin 30 °C:n lämpötilassa noin 48 h, jonka jälkeen maljat tarkastettiin. Tapauksissa, joissa pesäkkeet eivät olleet tavanomaisen näköisiä tai olivat osittain muun kasvuston peittäminä, siirrostettiin puhtasviljelmät uudelle MYP-agarille. Näytteen *B. cereus* -itiöpitoisuus laskettiin painotetun keskiarvon kaavalla.

5.6 *Listeria monocytogenes* kvantitatiivinen ja kvalitatiivinen määrittäminen

- Palcam-agar
- ALOA-agar
- ½ Fraser -elvytysliemi (Fraser Broth Base LAB 164, Lab M Limited)
- ½ Fraser -supplementti (X164, Lab M Limited)
- Fraser-rikastusliemi (Fraser Broth Plus LAB 212, Lab M Limited)
- Fraser-supplementti (X211, Lab M Limited)
- Veri-agar
- Tryptoni-soija-agar (TSA)
- Sokerinkäyttöalusta
- API Listeria –testi (bioMérieux)

Listeria monocytogenes määritettiin Valio Oy:n mikrobiologiset menetelmät *Listeria monocytogenes* ja *Listeria monocytogenes* kvantitatiivinen menetelmä –ohjeiden mukaisesti. Ohjeet perustuvat standardimenetelmiin ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 ja ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Ensin tehtiin kvantitatiivinen määrittäminen ja siitä jatkettiin kvalitatiiviseen määrittämiseen. *L. monocytogenes* –määrittämissä käytetyt kasvualustat ja reagenssit on esitetty liitteessä 1.

Kvantitatiivinen listeriamäärittäminen aloitettiin mittaamalla raakamaitonäytettä 25 ml ja sekoittamalla se 225 ml:aan huoneenlämpöistä ½ Fraser -lientä ilman lisäaineita. Näytettä elvytettiin 20 ± 2 °C:ssa 1h ± 5 minuuttia.

Elvytyksen jälkeen näytteestä tehtiin 1 ml:n siirrostus pintalevityksenä joko Palcam- tai ALOA-rinnakkaismaljoille. Työssä käytettiin kolmea pientä maljaa (halkaisija 9 cm), joille 1 ml jaettiin. Maljoja inkuboititiin 1 vrk 37 ± 1 °C:ssa, jonka jälkeen maljat tarkastettiin. Inkubointia jatkettiin 1 vrk ja maljat tarkastettiin uudestaan.

Kvalitatiivinen listeriamääritys jatkettiin kvantitatiivisen määrityksen jälkeen. Elvytettyyn näytteeseen lisättiin supplementtia ja näytettä inkuboititiin 30 ± 1 °C:n lämpökaapissa 24 ± 2 h. Inkuboinnin jälkeen siirrostettiin 10 µl:n silmukallinen viljelmää poikkeuksellisesti joko ALOA- tai Palcam-maljalle. Valio Oy:n mikrobiologiset menetelmät *Listeria monocytogenes* –ohjeen mukaan siirrostus tehdään sekä ALOA- että Palcam-maljalle. Viljelämä hajotettiin, jotta saatiin erillisiä pesäkkeitä. Inkuboitua ½ Fraser-rikastuslientä siirrostettiin lisäksi 100 µl 10 ml:aan Fraser-lientä. Sekä ALOA-maljaa että Fraser-lientä inkuboititiin 2 vrk 37 ± 1 °C:ssa. Tämän jälkeen Fraser-liemestä siirrostettiin 10 µl viljelmää uudelle ALOA-maljalle ja viljelämä hajotettiin. Maljaa inkuboititiin 2 vrk 37 ± 1 °C:ssa.

Inkubointien jälkeen maljat tarkastettiin, ja tyypillisistä pesäkkeistä tehtiin varmistusviljelmät ei-selektiiviselle TSA-agarille ja veri-agarille. Maljoja inkuboititiin 1 vrk 37 ± 1 °C:ssa. Verimaljalta todettiin mahdollinen β-hemolyysin ilmentyminen. Tyypillisen näköiset kasvustot varmistettiin vielä sokerinkäyttöttestillä tai kaupallisella API Listeria –testillä. API Listeria –testi tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Sokerinkäyttöttestissä pipetoitiin 1 ml valmista sokeriliuosta 9 ml:aan sokerinkäyttöalustaa. Sokerinlisäykset olivat ramnoosi, ksyloosi, mannitoli, salisiini ja α-metyylimannosidi. Puhdasviljelmää siirrostettiin sokeriputkiin ja putkia inkuboititiin 37 °C:ssa 2-5 vuorokautta. Jos tutkittava puhdasviljelämä käytti sokeria, liuoksen väri muuttui keltaiseksi.

5.7 Tulosten tilastollinen käsittely

Klostridi-itiöpitoisuudet ilmoitettiin MPN-lukuina (Most Probable Number) maitolitraa kohden. Kvalitatiivinen *Listeria monocytogenes* -tulos ilmoitettiin ”todettu / ei todettu” tutkittua näytemäärää (25 ml) kohden. Mikrobipitoisuustulokset ilmoitettiin pesäkkeitä muodostavina yksikköinä millilitraa kohden, pmy/ml. Mikrobipitoisuudet laskettiin käyttämällä painotetun keskiarvon kaavaa [1]:

$$pmy/ml = \frac{\text{laskettujen_pesäkkeiden_summa}}{\text{viljelyyn_käytetty_näytemäärä}} = \frac{\sum C}{(1ml \cdot n_1 + 0,1ml \cdot n_2) \cdot d} \quad [1]$$

$\sum C$ = laskettujen pesäkkeiden summa

n_1 = ensimmäisen laimennoksen maljojen lukumäärä

n_2 = toisen laimennoksen maljojen lukumäärä

d = ensimmäisen laimennoksen laimennuskerroin

Tulokset < 1 pmy/ml muutettiin arvoksi 0,5 pmy/ml, sillä tulosten ollessa normaalisti jakautuneita on todennäköisin arvo nollan ja yhden välillä 0,5. Klostridi-itiöiden kohdalla tulokset < 300 MPN/l muutettiin arvoksi 150 MPN/l, sillä tulosten ollessa normaalisti jakautuneita todennäköisin arvo nollan ja 300:n välillä on 150. Ennen tulosten tilastollista analysointia tehtiin mikrobipitoisuuksille $\log_{10}$ -muunnos.

Tulosten tilastollinen käsittely tehtiin Statistica-tilasto-ohjelmalla (versio 7.1, StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Tulokset analysoitiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä, jossa faktoreina olivat otanta ja lypsytekniikka.

Parsinavetan ja pihatön (lypsyasema + automaattilypsy) välistä eroa tietyn mikrobiryhmän pitoisuuden suhteen kuvattiin kontrastilla 1. Pihatön lypsyaseman ja pihatön automaattilypsyn välistä eroa kuvattiin kontrastilla 2. Kontrasteille määritettiin p-arvot, joista tulkittiin oliko lypsytekniikoiden välillä tilastollisesti merkitsevää eroa mikrobipitoisuuksien suhteen. Kontrastien välisen eron tulkinnassa käytettiin 5 % riskitasoa.

P-arvon ollessa yli 0,05 vertailtavien kohteiden välillä ei ollut tilastollista eroa. Jos p-arvo oli alle 0,05, niin kohteiden välillä todettiin olevan tilastollisesti merkitsevä ero.

Jakaumat tehtiin Microsoft Excel –ohjelmalla. Jakaumissa kuvattiin näytteiden jakaumista luokkaväleihin bakteeripitoisuuksien perusteella. Kullekin bakteeriryhmälle tehtiin jakauma koko otannasta sekä lypsytekniikoihin jaetusta otannasta. Lisäksi tehtiin jakaumat bakteerien poikkeamien esiintyvyyksiheksistä.

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

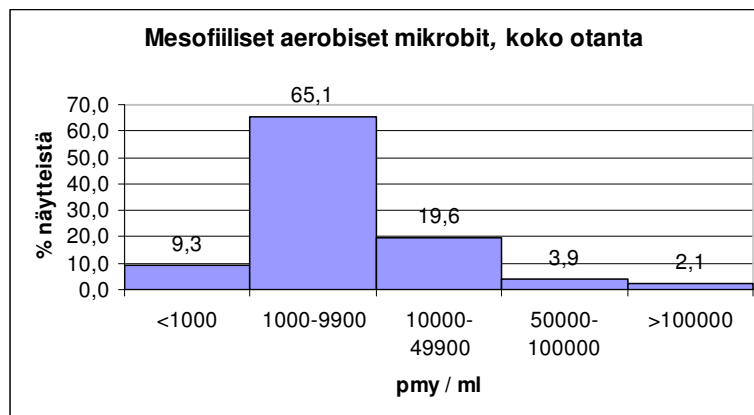
Liitteessä 3 on esitetty yksittäisten raakamaitonäytteiden tulokset mikrobiryhmittäin. Tulokset on jaettu taulukoihin lypsytekniikan ja otannan mukaan (taulukko 1-6). Lisäksi liitteessä 3 on esitetty koko otannan geometriset keskiarvot sekä minimi- ja maksimiarvot mikrobiryhmittäin (taulukko 7).

6.1 Hygieniaindikaattorit

6.1.1 Mesofiiliset aerobiset mikrobit

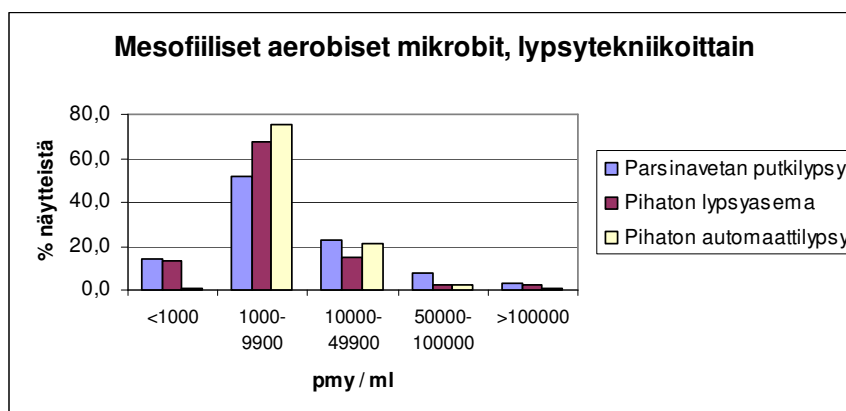
Mesofiilisten aerobisten mikrobien pesäkemäärä vaihteli välillä $1,8 \times 10^2 - 6,5 \times 10^5$ pmy/ml. Geometrinen keskiarvo oli $4,6 \times 10^3$ pmy/ml ($n = 281$). Tulos on hieman matalampi kuin vuonna 1998 tehdyn raakamaidon mikrobifloorakartoituksen tulos $5,1 \times 10^3$ pmy/ml (Tulkki 1999). Tulos jäi myös vähän Maitohygienialiiton vuoden 2007 tilastoja matalammaksi, $5,2 \times 10^3$ pmy/ml (Maitohygienialiitto 2007d). Maitohygienialiiton tilastotimet bakteeriluvut on määritetty Bactoscan-laitteella, joka laskee kaikki yksittäiset bakteerisolut ja saattaa tämän takia antaa suuremman tuloksen maljavalutekniikkaan verrattuna.

Kuvassa 5 on esitetty raakamaitonäytteiden jakaantuminen luokkiin mesofiilisten aerobisten mikrobin pitoisuuksien perusteella. Tuotantotalalta luovutettavalle raakamaidolle on asetettu lakisääteinen vaatimus, jonka mukaan pesäkemäärän kahden kuukauden geometrinen keskiarvo tulee olla $\leq 1,0 \times 10^5$ pmy/ml (EY N:o 853/2004). Tässä otannassa 97,9 % näytteistä oli pesäkemäärältään $\leq 1,0 \times 10^5$ pmy/ml ja 2,1 % ylitti rajan. Vuonna 1998 tehdyssä raakamaidon mikrobifloorakartoituksessa 94,5 % näytteistä oli pesäkemäärältään $\leq 1,0 \times 10^5$ pmy/ml (Tulkki 1999). Kuitenkin kummassakin raakamaitokartoituksessa tutkittiin vain yksittäinen näyte, ei kahden kuukauden geometrinen keskiarvoa. Maitohygienialiiton ilmoittaman vuoden 2008 tuloksen mukaan 0,7 prosentissa yksittäisistä raakamaitonäytteistä bakteeripitoisuus oli yli $1,0 \times 10^5$ pmy/ml (Maitohygienialiitto 2008a).



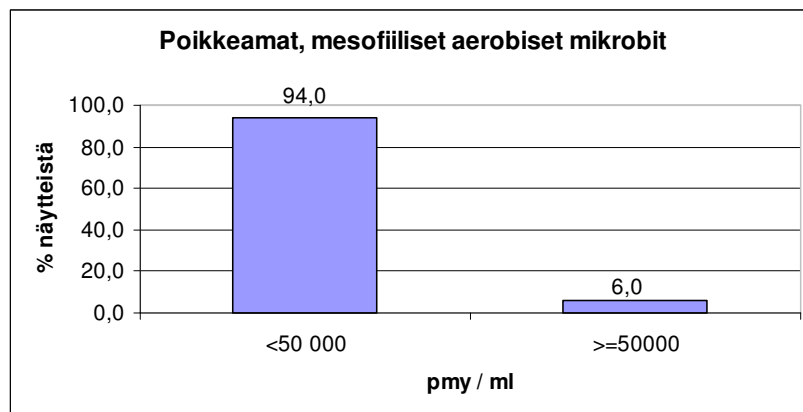
Kuva 5. Raakamaitonäytteiden jakaantuminen luokkiin mesofiilisten aerobisten mikrobin pitoisuuksien perusteella.

Kuvassa 6 on esitetty lypsytekniikoittain raakamaitonäytteiden jakautuminen luokkiin mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuuksien perusteella. Kuvasta voidaan huomata, että pihatön automaattilypsyllä lypsetyn raakamaidon mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuudet painottuvat keskimmäisiin luokkaväleihin. Automaattilypsyn näytteistä 75,2 % oli välillä 1 000-9 900 pmy/ml. Automaattilypsyn tuloksista 1,0 % oli alle 1 000 ja 1,0 % oli yli 100 000 pmy/ml. Tuloksista voidaan päätellä, että pihatön automaattilypsytekniikalla ei saada lypsettyä mikrobiologisesti erittäin puhdasta raakamaitoa, mutta toisaalta myös erittäin korkeita mikrobipitoisuuksia esiintyi harvoin. Parsinavetan putkilypsykoneella tuotettiin eniten mikrobipitoisuudeltaan erittäin puhdasta raakamaitoa (< 1000 pmy/ml), mutta myös eniten huonolaatuisinta raakamaitoa (> 100 000 pmy/ml). Ero pihatön lypsyaseman pitoisuuksiin ei kuitenkaan ollut suuri.



Kuva 6. Raakamaitonäytteiden jakautuminen luokkiin mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuuksien perusteella lypsytekniikoittain.

Kuvassa 7 on esitetty mesofiilisten aerobisten mikrobien poikkeamien esiintymistiheys koko otannassa. Poikkeamarajana käytettiin pitoisuutta 50 000 pmy/ml, joka on raakamaidon E-laatuluokan raja. Tutkituista raakamaitonäytteistä 94,0 % täytti E-luokan rajan < 50 000 pmy/ml. Maitohygienialiiton mukaan vuonna 2008 E-luokan osuus raakamaidoista oli 95,2 % (Maitohygienialiitto 2008b). Vuonna 1998 tehdyssä raakamaidon mikrobifloorakartoituksessa E-luokan osuuteen ylsi 83,4 % näytteistä (Tulkki 1999). Otanta oli tuolloin tosin melko pieni (n = 54). Maitohygienialiiton mukaan vuonna 1998 E-laatuluokkaan ylsi 90,9 % raakamaitonäytteistä (Maitohygienialiitto 2008b). Tulokista voidaan todeta, että raakamaidon laatu on parantunut mesofiilisten aerobisten mikrobien osalta viimeisen kymmenen vuoden aikana. Raakamaidon mikrobiologisen laadun paranemiseen on voinut vaikuttaa mm. maidon jäähdytysjärjestelmien ja kylmäketjun kehittyminen, lypsylaitteistojen pesujen ja pesuaineiden kehittyminen sekä hygieniatietoisuuden lisääntyminen.



Kuva 7. Mesofiilisten aerobisten mikrobien poikkeamien esiintyvyyksiä koko otannassa.

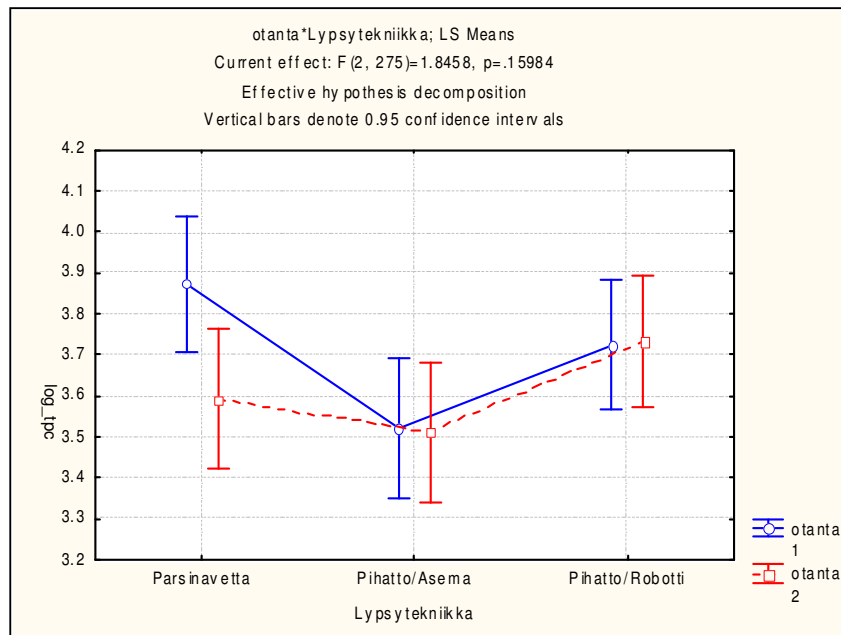
Taulukossa 5 on esitetty mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuuksien logaritmitset keskiarvot lypsytekniikoittain sekä kesällä (otanta 1) että talvella (otanta 2). Samat tulokset on esitetty kuvassa 8. Pihatön lypsyaseman ja automaattilypsyn logaritmisilla pitoisuuskeskiarvoilla ei ole eroa kesän ja talven välillä. Parsinavetalla puolestaan on kuvan mukaan jonkin verran eroa kesä- ja talvipitoisuuksien välillä. Hajonnat menevät kuitenkin osittain päällekkäin, joten erosta ei voida olla varmoja. Kuvassa on käytetty 95 %:n luottamusväliä.

Taulukko 5. *Mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuuksien logaritmitset keskiarvot lypsytekniikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).*

Ka. Log pmy						p-arvo	
OTANTA 1			OTANTA 2			Kontrasti 1	Kontrasti 2
parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti	parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti		
3,87	3,52	3,72	3,59	3,51	3,73	0,134	0,012

Kontrasti 1: parsinavetta vs. pihatto

Kontrasti 2: lypsyasema vs lypsyrobotti



Kuva 8. *Mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuuksien logaritmitset keskiarvot lypsytekniikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).*

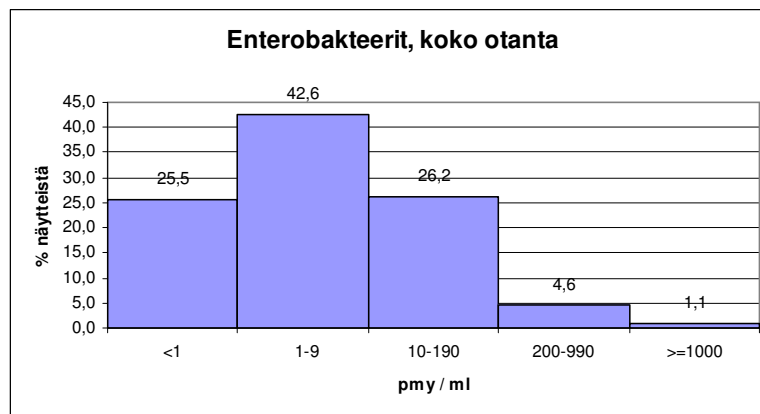
Taulukossa 5 kontrasti 1 kuvaa parsinavetan ja pihatön (lypsyasema + automaattilypsy) välistä eroa mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuuksien suhteen. P-arvoksi saatiin 0,134. Merkitsevyystason ollessa 0,05 ero ei ole tilastollisesti merkitsevä. Kontrasti 2

kuvaa pihatön sisällä lypsyaseman ja automaattilypsyn välistä eroa. P-arvoksi saatiin 0,012. Käytettäessä 5 % riskitasoa voidaan todeta, että lypsyaseman ja automaattilypsyn välillä on tilastollisesti merkitsevä ero mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuuksien suhteen ja pitoisuus on korkeampi automaattilypsyllä.

Monissa Euroopan maissa on todettu kokonaisbakteeripitoisuuden kasvaneen siirryttäessä perinteisestä lypsytekniikasta automaattiseen lypsyjärjestelmään (Klungel ym. 2000; Van der Vorst & Hogeveen 2000; Pomiès & Bony 2000, Rasmussen ym. 2002; Van der Vorst ym. 2002).

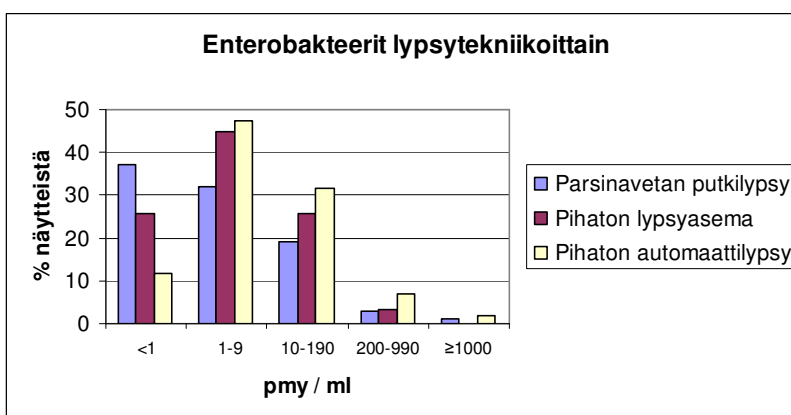
6.1.2 Enterobakteerit

Kuvassa 9 on esitetty raakamaitonäytteiden koko otannan enterobakteeripitoisuudet luokkiin jaettuna. Näytteistä 74,5 prosentissa todettiin enterobakteereja (n = 282). Enterobakteerien geometrinen keskiarvo oli 4,86 pmy/ml.



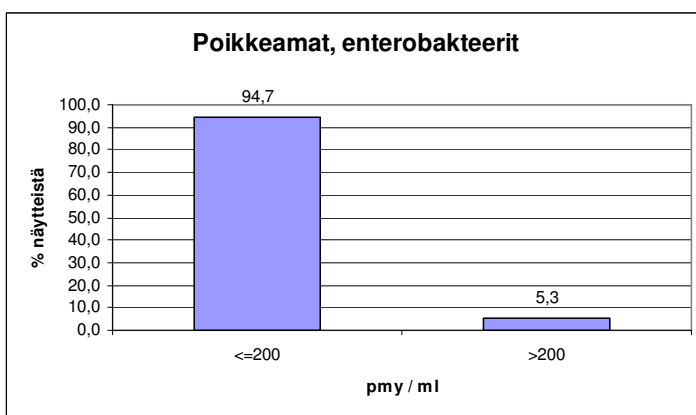
Kuva 9. Raakamaitonäytteiden jakaantuminen luokkiin enterobakteerien pitoisuuksien perusteella.

Kuvassa 10 on esitetty raakamaitonäytteistä määritetyt enterobakteeripitoisuudet lypsytekniikoittain. Parsinavetan putkilypsyllä lypsetyistä raakamaitonäytteistä enterobakteereja todettiin 59,9 prosentissa. Pihatön lypsyasemalla vastaava osuus oli 74,2 % ja automaattilypsyllä 88,1 %. Enterobakteerien perusteella laadultaan huonointa raakamaitoa saadaan siis automaattilypsyllä.



Kuva 10. Raakamaitonäytteiden jakaantuminen luokkiin enterobakteerien pitoisuuksien perusteella lypsytekniikoittain.

Enterobakteerien kohdalla poikkeamarajaksi valittiin 200 pmy/ml. Koko otannasta 5,3 % raakamaitonäytteistä ylitti poikkeamarajan (kuva 11).



Kuva 11. Enterobakteerien poikkeamien esiintyvyyksiä koko otannassa.

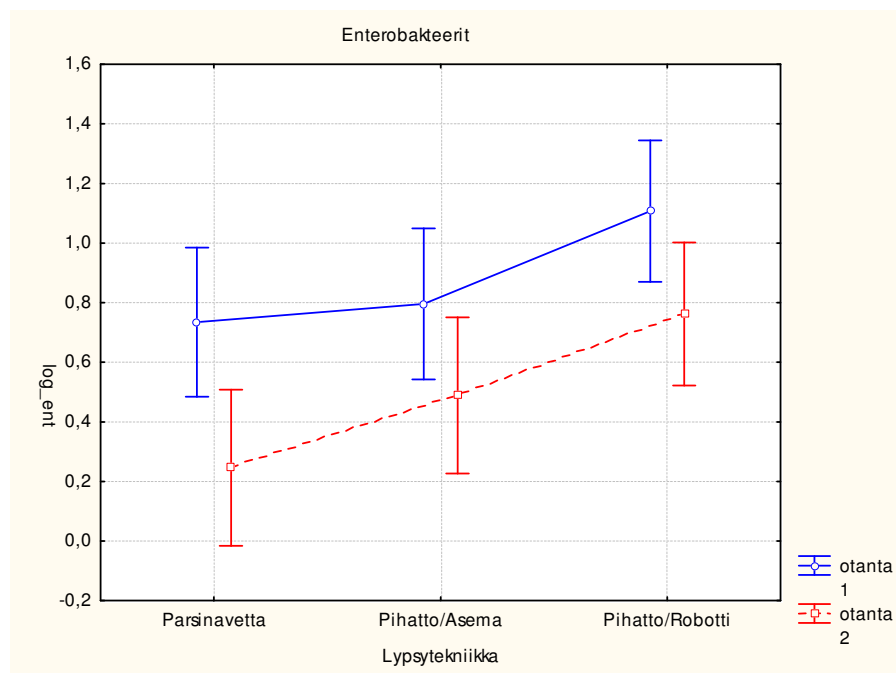
Taulukossa 6 on esitetty raakamaitonäytteiden enterobakteeripitoisuuksien logaritmitset keskiarvot lypsytekniikoittain sekä kesällä että talvella. Nämä tulokset on esitetty myös kuvassa 12. Otanta 1 vastaa kesäotantaa ja otanta 2 talviotantaa. Kesäotannan tulokset ovat jokaisella lypsytekniikalla talviotantaa suuremmat. Tulosten mukaan pihatton automaattilypsillä lypsetyissä raakamaidossa enterobakteeripitoisuudet ovat suurempia kuin lypsyasemalla tai parsinavetan putkilypsykoneella lypsetyissä raakamaidossa. Näyttäisi myös siltä, että pihatton lypsyasemalla esiintyy hiukan suurempia bakteeripitoisuuksia kuin parsinavetassa.

Taulukko 6. Enterobakteerien pitoisuuksien logaritmitset keskiarvot lypsytekniikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).

Ka. Log pmy						p-arvo	
OTANTA 1			OTANTA 2				
parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti	parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti	Kontrasti 1	Kontrasti 2
0,69	0,80	1,11	0,23	0,45	0,76	0,004	0,014

Kontrasti 1: parsinavetta vs. pihatto

Kontrasti 2: lypsyasema vs lypsyrobotti



Kuva 12. Enterobakteerien pitoisuuksien logaritmitset keskiarvot lypsytekniikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).

Parsinavetan ja pihatön enterobakteeripitoisuuksien välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero, sillä p-arvoksi saatiin 0,004 (taulukko 6). Pihattotiloilla todettiin suurempia enterobakteeripitoisuuksia kuin parsinavetoissa. Kontrastin 2 kohdalla p-arvoksi saatiin 0,014, joten lypsyaseman ja automaattilypsyyn välillä todettiin myös tilastollisesti merkitsevä ero enterobakteeripitoisuuksien suhteen. Enterobakteeripitoisuudet olivat automaattilypsytiloilla suurempia kuin lypsyasemilla.

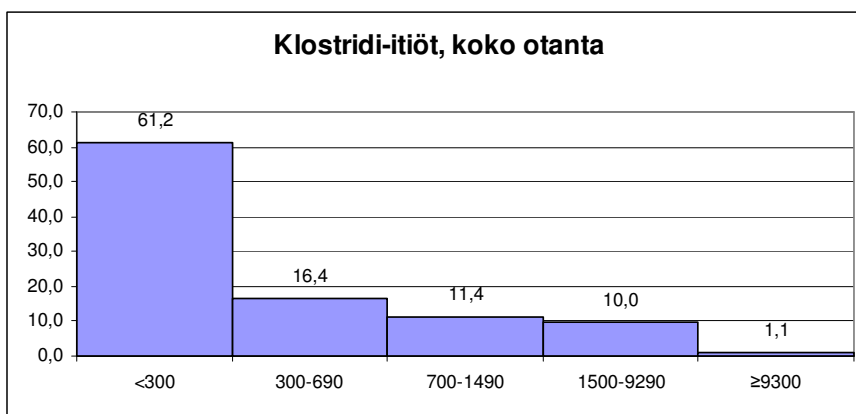
Enterobakteerien raakamaidon suurempi pitoisuus automaattilypsyssä on odotettu tulos, sillä automaattilypsyssä ihminen ei kontrolloi utareen ja vedinten puhtautta ennen lypsien kiinnitystä. Jos eläimet ja eläinten lähiympäristö on likainen, on suolistoperäisten bakteerien siirtyminen raakamaitoon lypsyyn yhteydessä todennäköisempää automaattilypsyssä kuin perinteisissä tekniikoissa. Tässä otannassa enterobakteeripitoisuudet ovat kuitenkin varsin kohtuullisia automaattilypsyssäkin.

6.2 Pilaajamikrobit

6.2.1 Klostridi-itiöt

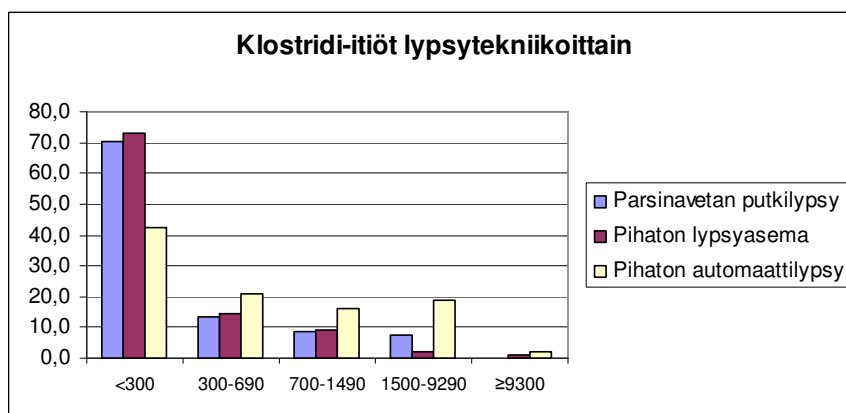
Kuvassa 13 on esitetty raakamaitonäytteiden jakaantuminen luokkiin klostridi-itiöiden pitoisuuksien perusteella. Klostridi-itiöitä todettiin 38,8 prosentissa raakamaitonäytteistä ($n = 281$). Klostridi-itiöiden esiintymistiheys on kasvanut 10 vuotta sitten tehtyyn kartoitukseen nähden huomattavasti, sillä raakamaidon mikrobiflooran kartoituksessa vuonna 1998 todettiin klostridi-itiöitä 11,6 prosentissa ($n = 69$) tuottajamaitoja (Tulkki 1999).

Klostridi-itiöiden koko otannan logaritmiseksi keskiarvoksi saatiin 2,48 MPN/l. Alan-komaissa todettiin hieman suurempi tulos, 2,7 MPN/l, tutkittaessa 142 raakamaitonäytettä (Vissers ym. 2007b).



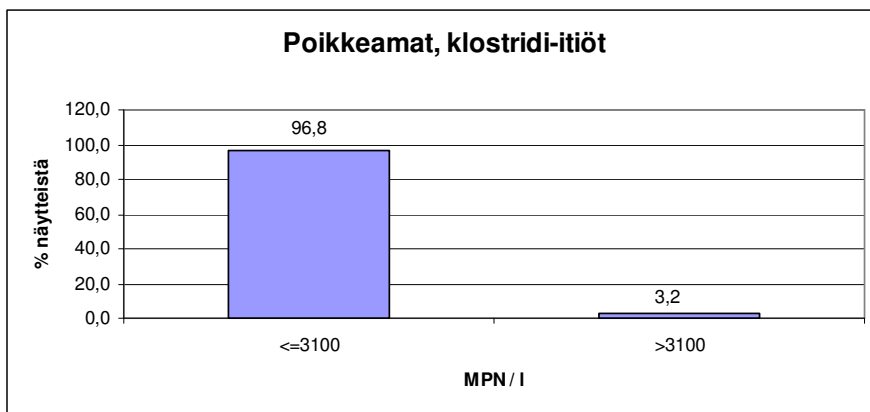
Kuva 13. Raakamaitojen jakaantuminen luokkiin klostridi-itiöiden pitoisuuksien perusteella.

Klostridi-itiöiden pitoisuustulokset on jaettu lypsyttekniikoittain luokkiin kuvassa 14. Klostridi-itiöitä todettiin parsinavetan putkilypsytyn näytteistä 29,7 prosentissa ja pihatön lypsyaseman näytteistä 27,0 prosentissa. Pihatön automaattilypsyllä vastaava tulos on huomattavasti suurempi, 57,4 %. Automaattilypsytyn klostridi-itiöiden esiintymistiheys on muita lypsyttekniikoita suurempi kaikissa muissa luokissa paitsi luokassa < 300 MPN/l. Tulosten perusteella voidaan todeta, että automaattisella lypsylaitteistolla lypsettäessä raakamaitoon joutuu enemmän klostridi-itiöitä kuin lypsettäessä muilla tekniikoilla. Kuitenkaan esiintymistiheyden kasvu edellisen raakamaidon mikrobiologisen kartoituksen 11,6 prosentista tämän kartoituksen 38,8 prosenttiin ei johdu ainoastaan automaattilypsyttekniikan korkeasta esiintymistiheydestä. Myös parsinavetan ja lypsyaseman esiintymistiheydet ovat kasvaneet huomattavasti kymmenessä vuodessa.



Kuva 14. Raakamaitonäytteiden jakaantuminen luokkiin lypsyttekniikoittain klostridi-itiöiden pitoisuuksien perusteella.

Klostridi-itiöiden poikkeamaraja on 3100 MPN/l. Koko otannassa poikkeamarajan ylitti 3,2 % näytteistä (kuva 15).



Kuva 15. *Klostridi-itiöiden poikkeamien esiintyvyyssiheys koko otannassa.*

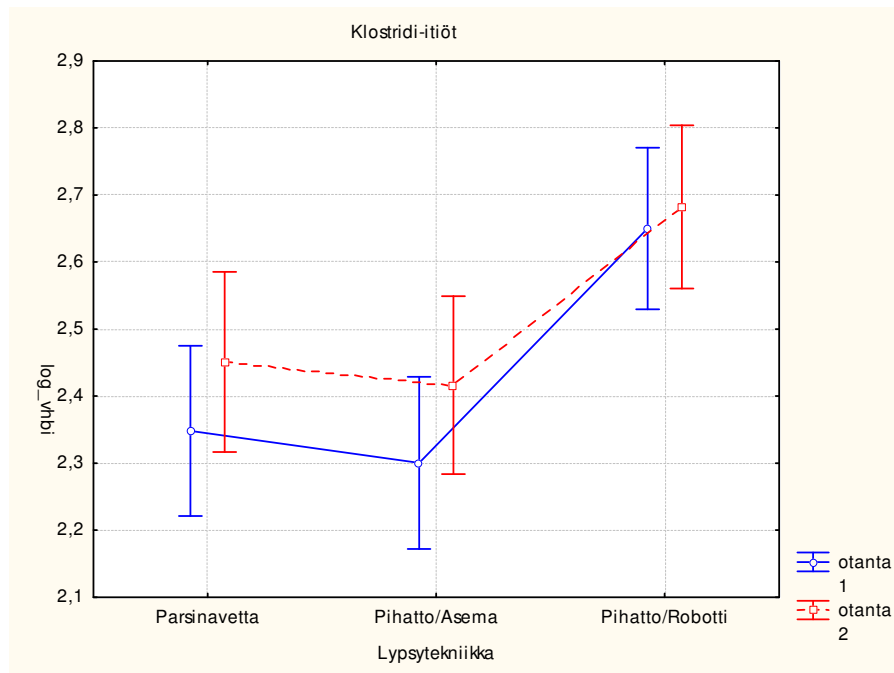
Klostridi-itiöiden pitoisuuksien logaritmiset keskiarvot lypsytekniikoittain sekä kesällä että talvella on esitetty taulukossa 7 ja kuvassa 16. Tuloksista voidaan huomata, että parsinavetan putkilypsykoneella sekä pihatön lypsyasemalla lypsettyjen raakamaitojen klostridi-itiöiden pitoisuudet ovat talviotannassa hieman suurempia kuin kesäotannassa. Automaattilypsillä kesä- ja talvipitoisuudet ovat lähes samansuuruisia. Pihatön automaattilipsyn pitoisuudet ovat selvästi parsinavettaa ja lypsyasemaa suurempia.

Taulukko 7. *Klostridi-itiöiden pitoisuuksien logaritmiset keskiarvot lypsytekniikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).*

Ka. Log pmy						p-arvo	
OTANTA 1			OTANTA 2				
parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti	parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti	Kontrasti 1	Kontrasti 2
2,34	2,30	2,65	2,47	2,42	2,68	0,052	0,000

Kontrasti 1, parsinavetta vs. pihatto

Kontrasti 2, lypsyasema vs lypsyrobotti



Kuva 16. *Klostridi-itiöiden pitoisuuksien logaritmitet keskiarvot lypsytekniiikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).*

Pihatton ja parsinavetan välillä ei havaittu merkitsevää eroa klostridi-itiöiden pitoisuuksien suhteen (taulukko 7). Lypsyaseman ja automaattilypsyn välillä puolestaan merkitävä ero havaittiin, ja tulos oli suurempi automaattilypsyssä.

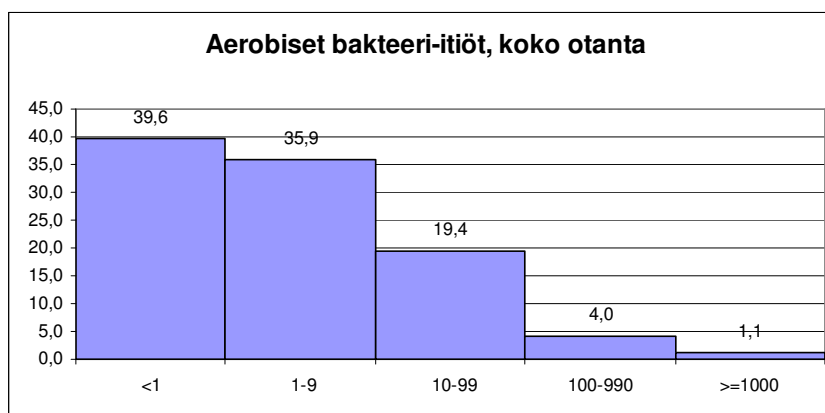
Rasmussen ym. (2002) havaitsivat vastaavan tuloksen tanskalaisessa tutkimuksessa. Anaerobisten itiöiden pitoisuudet kasvoivat merkittävästi siirryttäessä tavanomaisesta lypsystä automaattilypsyyn. Aikaisemmassa suomalaisessa tutkimuksessa ei havaittu eroa klostridi-itiöiden esiintymistiheyksissä ennen automaattilypsyyn siirtymistä ja sen jälkeen ($n = 144$), mutta tutkimuksessa oli mukana vain kolme lypsytilaa (Salovuori ym. 2005).

Klostridi-itiöitä esiintyy maaperässä ja säilörehussa, joista ne kulkeutuvat herkästi lannan kautta utareisiin. Automaattilypsytiloilla ihminen ei kontrolloi utareiden puhdistumista, jolloin utareet saattavat jäädä likaisemmaksi kuin muilla lypsytekniiikoilla. Tällöin itiöt pääsevät kulkeutumaan helposti utareista raakamaitoon. Tilanne on erityisen hankala, jos säilörehun laatu on huono.

Tässä raakamaitokartoituksessa todettiin klostridi-itiöitä 38,8 %:ssa näytteistä. Kaasua muodostaneista raakamaitonäytteistä määritettiin *Clostridium tyrobutyricum* ja *Clostridium sporogenes* -lajien esiintyvyydet lajispesifisillä PCR-menetelmillä. Kaasua muodostaneista näytteistä todettiin *C. tyrobutyricum* 27,3 prosentissa ja *C. sporogenes* 3,6 prosentissa. 2,7 prosentissa todettiin sekä *C. tyrobutyricum* että *C. sporogenes*. Muita klostridi-itiöitä ei tunnistettu lajitasolle asti. Tulos on yllättävä, sillä aikaisemmin on todettu, että *C. tyrobutyricum* ja *C. sporogenes* -lajien osuus maidosta eristetyistä klostrideista on 75 % (Mantere-Alhonen 1990).

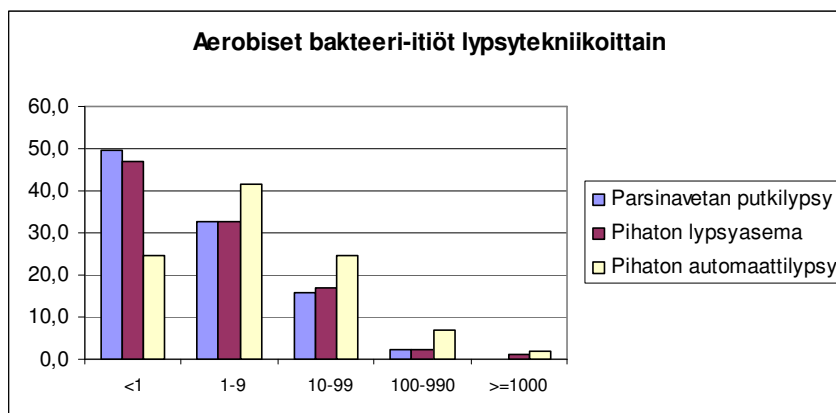
6.2.2 Aerobiset bakteeri-itiöt

Aerobisia bakteeri-itiöitä todettiin 60,4 prosentissa tutkituista näytteistä (kuva 17). Koko otannan geometriseksi keskiarvoksi saatiin 2,63 pmy/ml ($n = 273$). Näytteistä 1,1 prosentissa todettiin aerobisia bakteeri-itiöitä ≥ 1000 pmy/ml. Aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuus on kasvanut 10 vuotta sitten tehtyyn kartoitukseen nähden huomattavasti. Raakamaidon mikrobiflooran kartoituksessa tutkituista näytteistä todettiin tuolloin aerobisia bakteeri-itiöitä 49,2 prosentissa raakamaitoja ja aerobisten bakteeri-itiöiden maksimipitoisuus oli 30 pmy/ml (Tulkki 1999).



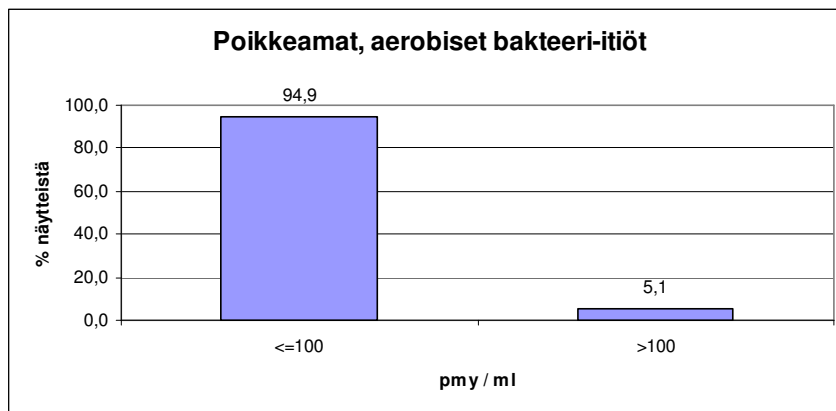
Kuva 17. Raakamaitojen jakaantuminen luokkiin aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuksien perusteella.

Kuvassa 18 aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuustulokset on jaettu luokkiin lypsyttekniikoittain. Parsinavetan putkilypsykoneella lypsetyssä raakamaidossa aerobisia bakteeri-itiöitä todettiin 50,6 prosentissa, pihatön lypsyasemalla 53,0 prosentissa ja pihatön automaattilypsyssä 75,2 prosentissa näytteistä. Pihatön automaattilypsy erottuu tulosten perusteella selvästi parsinavetan putkilypsykoneesta ja pihatön lypsyasemasta. Automaattilypsyssä raakamaidon joukkoon joutuu kuumennuskäsittelyn kestäviä bakteeri-itiöitä parsinavetan putkilypsykonetta ja pihatön lypsyasemaa enemmän. Pihatön lypsyaseman ja parsinavetan putkilypsykoneen aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuudet ovat joka luokassa lähes samansuuruisia. Eroa syntyy siinä, että lypsyasemalla lypsetyssä raakamaidossa havaittiin suuria poikkeamia (≥ 1000 pmy/ml) 1,2 prosentissa näytteistä, kun taas parsinavetassa lypsetyssä raakamaidossa suuria poikkeamapitoisuuksia ei havaittu.



Kuva 18. Raakamaitonäytteiden jakaantuminen luokkiin aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuksien perusteella lypsyttekniikoittain.

Aerobisten bakteeri-itiöiden poikkeamarajaksi valittiin 100 pmy/ml. 5,1 % näytteistä ylitti tämän pitoisuuden (kuva 19).



Kuva 19. Aerobisten bakteeri-itiöiden poikkeamien esiintyvyyksiä koko otannassa.

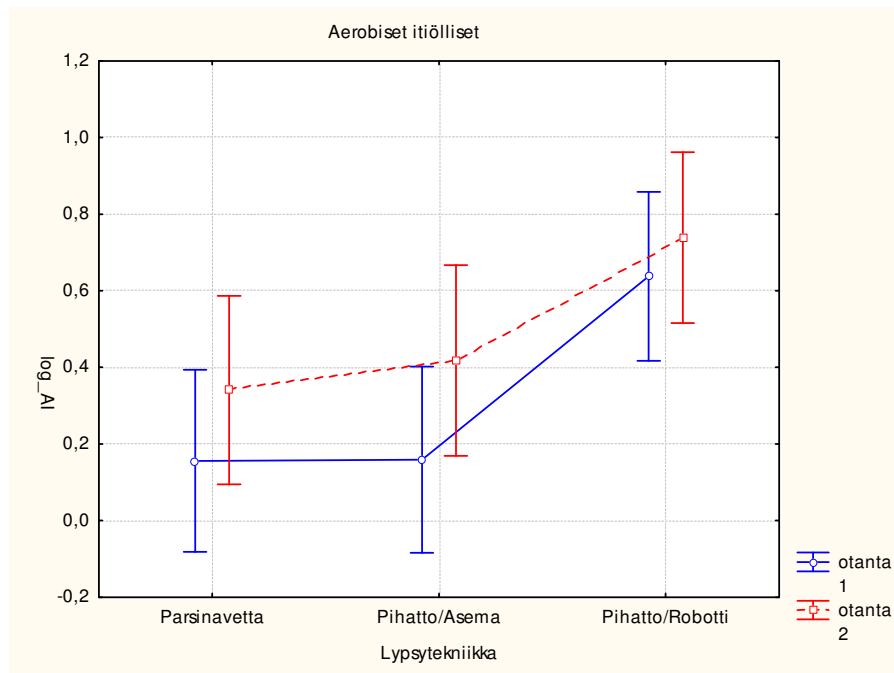
Taulukossa 8 on esitetty aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuksien logaritmiset keskiarvot lypsyteknikoittain sekä kesällä että talvella. Samat tulokset on esitetty kuvassa 20. Jokaisen lypsyteknikan aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuudet ovat talvella hieman korkeampia kuin kesällä. Vastaavia tuloksia on havaittu aikaisemminkin (Sutherland & Murdoch 1994; Waes 1976). Lehmien utareiden kontaminoitumista makuualustamateriaaleilla on pidetty osasyynä talviaikaan tapahtuvaan itiöpitoisuuden nousuun (Sutherland & Murdoch 1994).

Taulukko 8. Aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuksien logaritmiset keskiarvot lypsyteknikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).

Ka. Log pmy							
OTANTA 1			OTANTA 2			p-arvo	
parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti	parsinavetta	pihatto / asema	pihatto / robotti	Kontrasti 1	Kontrasti 2
0.14	0.16	0.64	0.37	0.40	0.74	0.025	0.001

Kontrasti 1: parsinavetta vs. pihatto

Kontrasti 2: lypsyasema vs. lypsyrobotti



Kuva 20. Aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuksien logaritmiset keskiarvot lypsytekniikoittain kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).

Parsinavetan ja pihaton välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuksien suhteen käytettäessä 5 %:n riskitasoa (taulukko 8). Aerobisia bakteeri-itiöitä havaittiin enemmän pihattotiloilla lypsetyssä raakamaidossa kuin parsinavetoissa lypsetyssä raakamaidossa. Myös lypsyaseman ja automaattilypsyn välillä todettiin tilastollisesti merkitsevä ero aerobisten bakteeri-itiöiden suhteen ja tulos oli suurempi automaattilypsytiloilla.

Edellisessä raakamaidon mikrobiologisessa kartoituksessa aerobisia bakteeri-itiöitä todettiin 49,2 prosentissa raakamaitonäytteistä (Tulkki 1999). Tulos vastaa tämän tutkimuksen tuloksia parsinavettaan ja lypsyasemaan verrattaessa, sillä näissä lypsytekniikoissa esiintymistiheydet olivat 50,6 % ja 53,0 %. Automaattilypsyllä lypsetyssä raakamaidossa aerobisten bakteeri-itiöiden esiintymistiheys oli huomattavasti suurempi, 75,2 %. Syynä tähän voidaan pitää sitä, että automaattilypsytekniikassa ihminen ei kontrolloi utareen ja vedinten puhtautta ennen lypsä. Aerobisia bakteeri-itiöitä esiintyy maaperässä, kuivikkeissa ja lannassa, mistä ne kulkeutuvat helposti likaisten utareiden kautta raakamaitoon.

6.2.3 *Bacillus cereus* -itiöt

B. cereus -itiöitä todettiin koko otannassa 1,4 prosentissa näytteistä. Kesäotannassa positiivisten näytteiden osuus oli 2,1 % (3/144) ja talviotannassa 0,7 % (1/138). *B. cereus* -pitoisuudet olivat hyvin pieniä, 1-3 pmy/ml.

Alankomaissa vuosina 1993–1994 tutkituista raakamaitonäytteistä todettiin *B. cereus* -itiöitä 5 prosentissa näytteistä (n = 288) (Slaghuis ym. 1997).

6.3 Patogeenit

6.3.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes määritettiin sekä kvantitatiivisella että kvalitatiivisella menetelmällä. Raakamaitonäytteistä osan kohdalla näytemäärä jäi hieman vajaaksi. Nämä näytteet ja näytemäärät on esitetty liitteessä 4. Kvantitatiivinen tulos todettiin vain kahdessa näytteessä eli 0,7 prosentissa koko otannan näytteistä. Näidenkin näytteiden pitoisuudet jäivät alhaisiksi, 10 pmy/ml ja 40 pmy/ml. Muut raakamaitonäytteet saivat kvantitatiivisesta listeriamäärityksestä tuloksen < 10 pmy/ml. Tulos vastasi Lovettin ym. (1987) tutkimusta, jossa todettiin tilatankeista löytyneiden *L. monocytogenes* positiivisten näytteiden pitoisuuksien olleen suuruudeltaan 1 solu/ml tai vähemmän.

Kvalitatiivisessa määrittämisessä rikastettiin 25 ml raakamaitonäytettä, jotta alhaisetkin listeria-pitoisuudet löydettäisiin. Taulukossa 9 on esitetty positiivisten listerianäytteiden %-osuudet lypsytekniikoittain sekä kesä- että talviotannassa. Koko otannasta positiivisia listerianäytteitä oli 4,3 %. Näistä 2,8 prosentissa todettiin *L. monocytogenes* ja 1,4 prosentissa *Listeria innocua*. Tässä otannassa listeriaa ei todettu parsinavetan putkilypsykoneella lypsetystä raakamaidosta.

Taulukko 9. Positiivisten *Listeria*-näytteiden %-osuudet otannan ja lypsytekniikan mukaan kesällä (otanta 1) ja talvella (otanta 2).

	OTANTA 1			OTANTA 2			YHT
	Parsina- vettä	Pihatto/ Asema	Pihatto/ Robotti	Parsina- vettä	Pihatto/ Asema	Pihatto/ Robotti	
<i>Listeria positiivisia</i> (% näytteistä)	0,0	2,1	2,8	0,0	1,4	2,2	4,3
<i>Listeria monocytogenes</i> (% näytteistä)	0,0	1,4	1,4	0,0	1,4	1,4	2,8
<i>Listeria innocua</i> (%näytteistä)	0,0	0,7	1,4	0,0	0,0	0,7	1,4

Tulos oli vastaavaa tasoa kuin edellisessä raakamaidon mikrobiflooran kartoituksessa, jolloin todettiin *L. monocytogenes* 1,6 prosentissa ja *L. innocua* 4,8 prosentissa näytteistä (n = 63) (Tulkki 1999).

Muissa maissa tehdyissä tutkimuksissa on myös saatu vastaavia tuloksia. Espanjalaisessa tutkimuksessa todettiin raakamaitonäytteistä (n = 774) 3,62 prosentissa *L. monocytogenes* ja 2,71 prosentissa *L. innocua* (Gaya ym. 1998). Englannissa ja Walesissa 5,08 prosenttia näytteistä (n = 2009) oli *L. monocytogenes* positiivinen (O'Donnel 1995). Samaan suuruusluokkaan päädyttiin myös Yhdysvalloissa, missä *L. monocytogenes* todettiin 4,2 prosentissa näytteistä (Lovett ym. 1987). Hieman matalampi tulos todettiin Kanadassa, Ontariossa, jolloin *L. monocytogenes* todettiin 1,3 prosentissa näytteistä (n = 455) (Farber ym. 1988). Huomattavasti muita korkeampia tuloksia havaittiin kahdessa yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa, jolloin *L. monocytogenes* todettiin 12 prosentissa raakamaitonäytteistä (n = 121) (Hayes ym. 1986) ja 19,7 prosentissa raakamaitonäytteistä (n = 172) (Latorre ym. 2009).

Tässä tutkimuksessa ei todettu eroa listerian esiintyvyydessä kesä- ja talviotannan välillä (taulukko 9). Skotlannissa tehdyssä tutkimuksessa (n = 180) havaittiin kesäotannassa 3,8 prosentissa näytteistä *L. monocytogenes* ja syysotannassa 1,0 prosentissa (Fenlon & Wilson 1989). Toisaalta Yhdysvalloissa tehdyssä tutkimuksessa havaittiin esiintymistiheyden olleen matalin lämpimimpään vuodenaikaan ja korkein kylmimpien kuukausien aikana (Lovett ym. 1987).

7 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli tutkia kolmella eri lypsytekniikalla lypsetyn raakamaidon mikrobiologisen laadun eroja sekä selvittää raakamaidon mikrobiologista laatua vuonna 2008. Saatuja tuloksia verrattiin Valio Oy:ssä vuonna 1998 tehdyn raakamaidon mikrobiologisen kartoituksen tuloksiin. Lisäksi työssä selvitettiin vuodenajan vaikutusta raakamaidon mikrobipitoisuuksiin.

Suomessa ei ole aikaisemmin tehty laajempaa tutkimusta automaattilypsytekniikan vaikutuksesta raakamaidon mikrobiologiseen laatuun. Tämä tutkimus antaa uutta tärkeää tietoa maidon tuottajille ja raakamaitoa jalostaville meijereille. Työn tuloksia voidaan hyödyntää tarkasteltaessa raakamaidosta jalostettavien tuotteiden laatua, säilyvyyttä sekä tuoteturvallisuutta. Tutkimuksen tuloksia voidaan lisäksi hyödyntää automaattilypsytekniikan kehittämisessä, jotta tulevaisuudessa automaattilypsytekniikalla saadaan lypettyä mikrobiologisesti entistä laadukkaampaa raakamaitoa.

Tässä tutkimuksessa raakamaidon mikrobiologinen laatu todettiin erittäin hyväksi. Yksittäisissä näytteissä todettiin muutamia suuria poikkeamia, mutta yleisesti ottaen raakamaitonäytteet olivat mikrobiologisesti laadukkaita.

Tutkimuksessa todettiin, että automaattilypsytekniikalla ei saada lypettyä mikrobiologisesti yhtä laadukasta maitoa kuin parsinavetan lypsykoneella tai pihatön lypsyasemalla. Enterobakteerien, aerobisten bakteeri-itiöiden ja klostridi-itiöiden esiintymistiheydet sekä pitoisuudet olivat automaattilypsytekniikalla lypsetyssä raakamaidossa huomattavasti suuremmat kuin kahdella muulla lypsytekniikalla lypsetäessä. Syynä tähän voidaan pitää sitä, että automaattilypsytekniikassa ihminen ei tarkasta utareen ja vedinten puhtautta ennen lypsimen kiinnitystä. Jos lehmät ja niiden lähiympäristö on likainen, on mikrobien siirtyminen raakamaitoon lypsyn yhteydessä todennäköisempää automaattilypsyssä kuin perinteisissä lypsytekniikoissa. Erot automaattilypsytekniikan ja perinteisten lypsytekniikoiden välillä eivät kuitenkaan olleet kohtuuttoman suuria, joten automaattilypsytekniikallakin saadaan lypettyä laadukasta raakamaitoa.

Parsinavetassa ja pihatön lypsyasemalla lypsettyjen raakamaitojen mikrobipitoisuudet ja esiintymistiheydet vastasivat suurelta osin toisiaan, eikä niiden välillä todettu huomattavaa eroa minkään mikrobin suhteen.

Tutkimuksessa ei havaittu mesofiilisten aerobisten mikrobien ja klostridi-itiöiden mikrobipitoisuuksissa huomattavaa eroa talven ja kesän välillä. *L. monocytogenes* ja *B. cereus* –esiintymistiheydet olivat niin matalia, ettei niistä voitu todeta kesän ja talven välistä eroa. Sen sijaan enterobakteeripitoisuudet olivat kesällä korkeampia kuin talvella. Aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuudet olivat puolestaan talvella hieman korkeampia kuin kesällä, kuten aikaisemmissa tutkimuksissakin on todettu.

Tutkimuksen tulosten perusteella suurimpana raakamaidon mikrobiologiseen laatuun vaikuttavana ongelmana voidaan pitää aerobisten bakteeri-itiöiden pitoisuuden ja esiintymistiheyden kasvua kymmenen vuoden aikana. Korkeita itiöpitoisuuksia todettiin kaikissa lypsytekniikoissa. Huomattavan suuri esiintymistiheys havaittiin pihatön automaattilypsillä lypsetyssä raakamaidossa (75,2 %), joten automaattilypsytekniikkaa voidaan pitää aerobisten bakteeri-itiöiden esiintyvyyksiheyden kasvun pääasiallisena syynä.

Tutkimuksessa todettiin myös klostridi-itiöiden esiintymistiheyden kasvaneen kymmenen vuoden aikana merkittävästi, 11,6 prosentista 38,8 prosenttiin. Esiintymistiheyden kasvun pääasiallisena syynä voidaan pitää automaattilypsytekniikan korkeata klostridi-itiöiden esiintymistiheyttä, 57,4 %. Kuitenkin myös parsinavetan (29,7 %) ja lypsyaseman (27,0 %) klostridi-itiöiden esiintymistiheydet ovat kasvaneet huomattavasti kymmenen vuoden aikana, joten kasvuun vaikuttaa tekniikan muutoksen lisäksi myös muita tekijöitä.

Raakamaidon mesofiilisten aerobisten mikrobien pitoisuudet vaihtelivat välillä $1,8 \times 10^2$ – $6,5 \times 10^5$ pmy/ml. Geometrinen keskiarvo oli matala, $4,6 \times 10^3$ pmy/ml. Yksittäisistä raakamaitonäytteistä 97,9 % täytti tuotantotilalta luovutettavalle raakamaidolle asetetun lakisääteisen vaatimuksen, jonka mukaan pesäkemäärän on oltava $\leq 1,0 \times 10^5$ pmy/ml (kahden kuukauden geometrinen keskiarvo, EY N:o 853/2004). Vuonna 1998 tehdyssä raakamaidon mikrobifloorakartoituksessa vastaava prosenttiosuus oli 94,5 %, joten raa-

kamaidon mikrobiologisen laadun voidaan todeta parantuneen kymmenen vuoden aikana mesofiilisten aerobisten mikrobien osalta.

Listeria monocytogenes –bakteerin esiintyvyyksiheys, 2,8 % vastasi vuoden 1998 raakamaidon mikrobiologisen kartoituksen tutkimustulosta. Kvantitatiivinen *L. monocytogenes* -tulos todettiin tässä työssä vain 0,7 prosentissa näytteistä ja niidenkin kohdalla pitoisuudet olivat erittäin matalia. Mikrobipitoisuudet olivat matalia myös *B. cereus* –itiöiden kohdalla, joita todettiin 1,4 prosentissa raakamaitonäytteistä.

Mikrobipitoisuudet vaihtelivat paljon kaikilla kolmella lypsytekniikalla. Voidaankin todeta, että jokaisella lypsytekniikalla on mahdollista lypsää mikrobiologisesti sekä hyvälaatuisia että huonolaatuisia raakamaitoa. Tuotettaessa mikrobiologisesti laadukasta raakamaitoa, on tilalla otettava huomioon mm. navetan, lehmien ja lypsylaitteistojen puhtaus ja hygieenisuus, jäähdytysjärjestelmien toimivuus sekä rehun laatu. Varsinkin säilörehun laadulla on tärkeä merkitys raakamaidon itiöpitoisuuksin. Jotta klostridiitiöiden ja aerobisten bakteeri-itiöiden määrä raakamaidossa saataisiin pidettyä alhaisena, on säilörehun laatua tarkkailtava ja pyrittävä pitämään se mahdollisimman hyvänä.

Vaikka automaattilypsytekniikan mikrobipitoisuudet olivat tässä kartoituksessa perinteisiä lypsytekniikoita suurempia, saattaa tulevaisuudessa automaattilypsytekniikalla lypsetyn raakamaidon mikrobiologinen laatu parantua. Tekniikan kehittyessä automaattilypsyjärjestelmät puhdistavat vetimet ja utareet entistä huolellisemmin ja tehokkaammin sekä saattavat osata tarkastaa vedinten puhtauden ennen pesua sekä puhdistustuloksen pesun jälkeen.

Lypsyasemien ja automaattisten lypsylaitteistojen määrät tulevat kasvamaan Suomessa, ja yhä suurempi osa maidosta lypsetään pihatoissa. Tämän takia on tärkeää ottaa huomioon varsinkin pihatton lypsytekniikoilla lypsetyn raakamaidon mikrobiologinen laatu ja arvioida sen kehittymistä tulevaisuudessa. Tämän tutkimuksen tuloksista voidaan havaita, että raakamaidon korkea laatu ei synny itsestään uutta tekniikkaa käyttöönotettaessa. Raakamaidon laadun eteen on siis tehtävä työtä jatkossakin.

Lähteet

Bergère J.-L., Sivelä S. 1990. Detection and enumeration of clostridial spores related to cheese quality – classical and new methods. s. 15-23. Teoksessa: Methods of detection and prevention of anaerobic spore formers in relating to the quality of cheese. Bulletin of the International Dairy Federation nro 251.

Boor K., Fromm H. 2006. Managing microbial spoilage in the dairy industry. Teoksessa: Blackburn C. (toim.) Food spoilage microorganisms. England: Woodhead publishing limited. s. 186.

Chambers J. V. 2002. The microbiology of raw milk. Teoksessa: Robinson R. K. (toim.) Dairy microbiology handbook. The microbiology of milk and milk products. Third edition. Wiley-Interscience, Inc. s. 40-41.

Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B. 1999. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. Journal of Dairy Science. Vol 82, No. 2, 305-314.

EU-project Automatic milking. (WWW-dokumentti)
<<http://www.automaticmilking.nl/>> Updated 20.02.2008. Luettu 13.04.2009.

EY N:o 853/2004. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 853/2004 eläinperäisiä elintarvikkeita koskevista erityisistä hygieniasäännöistä.

Farber J. M., Sanders G. W., Malcolm S. A. 1988. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. Canadian Journal of Microbiology. 34: 95-100.

Fenlon D.R., Wilson J. 1989. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. Journal of Applied Bacteriology. 66, 191-196.

Frank J. F. 2007. Milk and dairy products. Teoksessa: Doyle M. P., Beuchat L. R. (toim.) Food microbiology. Fundamentals and frontiers. Washington, USA: American Society for Microbiology. s. 147.

Gaya P., Sanchez J., Medina M., Nuñez M. 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. Food Microbiology. 15, 551-555.

Giffel M. C., Wagendorp A., Herrewegh A., Driehuis F. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 625-630.

Gilmour A., Rowe M. T. 1990. Micro-organisms associated with milk. Teoksessa: Robinson R. K. (toim.) *Dairy microbiology*. Volume 1, *The microbiology of milk*. Second edition. Elsevier science publishers ltd, Englanti. s. 37-75.

Hayes P. S., Feeley J. C., Graves L. M., Ajello G. W., Fleming D. W. 1986. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 51, No. 2, 438-440.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2005. *Microorganisms in foods 6*. Second edition. *Microbial ecology of food commodities*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. s. 645-650.

ISO-standardi 20966:2007. Automatic milking installations. Requirements and testing.

Janda J. M., Abbott S. L. 2006. *The enterobacteria*. 2nd ed. USA: American Society for Microbiology.

Johansson T., Markkula A. 2003. Opas elintarvikkeiden ja talousveden mikrobiologisista vaaroista. Helsinki: Elintarvikevirasto. s. 20-25, 57-66.

Klijn N., Nieuwenhof F. F. J., Hoolwerf J. D., Van der Waals C. B., Weerkamp A. H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2919-2924

Klungel G. H., Slaghuis B. A., Hogeveen H. 2000. The effect of the introduction of automatic milking systems on milk quality. *Journal of Dairy Science*. 83: 1998-2003.

Knappstein K., Reichmuth J., Suhren G. 2002. Influences on bacteriological quality of milk in herds using automatic milking systems and experiences from selected German farms. *The First North American Conference On Robotic Milking*, March 20 – 22, 2002. Toronto, Kanada. V13.

Koort J., & Sivelä S. 2007. Maidon ja maitovalmisteiden mikrobiologia. Teoksessa Korkeala H. (Toim.) *Elintarvikehygienia, ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksikologia*. Helsinki: WSOY oppimateriaalit Oy. s. 205-210.

Latorre A. A., Van Kessel J. A. S., Karns J. S., Zurakowski M. J., Pradhan A. K., Zaidaks R. N., Boor K. J., Schukken Y. H. 2009. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75, No. 5, 1315-1323.

Lovett J., Francis D. W., Hunt J. M. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*. Vol. 50, No 3, 188-192.

Maa- ja metsätalousministeriön asetus 8/EEO/2002. Maidontuotantotilojen hygieniavaatimukset.

Maa- ja metsätalousministeriön asetus 134/2006 alkutuotannolle elintarviketurvallisuuden varmistamiseksi asetettavista vaatimuksista.

Magnusson M., Christiansson A., Svensson B. 2007. *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: Factors affecting contamination of raw milk. *Journal of Dairy Science*. Vol. 90, No. 6, 2745-2754.

Maitohygienialiitto 2007a. Hyvät toimintatavat automaattilypsyssä. Hygieniאוהjeet. Suomen meijeriyhdistys. (WWW-dokumentti) <<http://www.maitohygienialiitto.fi/HTP-ohje2007.pdf>> Luettu 30.12.2008.

Maitohygienialiitto 2007b. Maidon bakteriologisen laadun kehitys vuosina 1975 – 2007 Suomessa. (WWW-dokumentti) <http://www.maitohygienialiitto.fi/bakt_laadun_kehitys_03.html> Luettu 1.4.2009.

Maitohygienialiitto 2007c. Bakterimäärä maidossa Pohjoismaissa vuosina 2002-2007. (WWW-dokumentti) <http://www.maitohygienialiitto.fi/Pohjoism_baktmaara_03.html> Luettu 1.4.2009.

Maitohygienialiitto 2007d. Bakterilukujen geometriset keskiarvot kuukausittain ja koko vuonna 1995–2008. (WWW-dokumentti) <http://www.maitohygienialiitto.fi/bakt_geom_keskiarvot_03.html> Luettu 5.3.2009.

Maitohygienialiitto 2008a. Maitonäytteiden jakaantuminen luokkiin bakterilukujen mukaan 2008. (WWW-dokumentti) <http://www.maitohygienialiitto.fi/bakt_naytt_jakaant_03.html> Luettu 5.3.2009.

Maitohygienialiitto 2008b. E-luokan osuus maidosta 1988–2008. (WWW-dokumentti) <http://www.maitohygienialiitto.fi/laatu_E-luokan_os_03.html> Luettu 7.3.2009.

Maitohygienialiitto 2008c. Maidon jakaantuminen laatuhinnoitteluluokkiin. (WWW-dokumentti) <http://www.maitohygienialiitto.fi/laatu_jak_luokkiin_03.html> Luettu 15.3.2009.

Manninen E., Koskimäki O., Laitinen K., Pitkäranta J., Kivinen T., Lehtinen J., Tertsunen S. 2002. MTT:n selvityksiä 17, Pihatön lypsyjärjestelmät. 53 s.

Manninen E., Nyman K. 2003. MTT:n selvityksiä 15, Maidonkäsittelyn teknologiaa. 32 s.

Manninen E., Nyman K., Laitinen K., Murto I. 2005. Lypsillä parressa ja pihatossa. MTT. 59 s.

Manninen E. 2009a. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. Sähköpostiviesti. 30.3.2009.

Manninen E. 2009b. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. Sähköpostiviesti. 23.4.2009. Tieto saatu Kees deKonigin kautta Hollannista. Animal sciences group Wageningen University and Research Centre.

Manninen E. 2009c. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus. Sähköpostiviesti. 31.12.2008. Tieto saatu: NMSM. Mats Gyllenswärd, Svensk Mjöl. AMS i Norden.

Mantere-Alhonen S. 1990. Maidon ja maitovalmisteiden mikrobit. Helsinki: Valtion painatuskeskus. s. 21-23.

Melin M., Wiktorsson H., Christiansson A. 2002. Teat cleaning efficiency before milking in DeLaval VMSTM versus conventional manual cleaning, using *Clostridium tyrobutyricum* spores as marker. NJF Seminar 337 – Technology for milking and housing of dairy cows. Norway. s. 50-51.

Nousiainen J., Laitinen H., Mäkelä A., Brofeldt E. 2007. Current and future prospects of milk quality from the Finnish dairy industry point of view. Journal of Animal and Feed Sciences, 16, Suppl. 1, 255-265.

O'Donnel E. T. 1995. The incidence of Salmonella and Listeria in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. Journal of the Society of Dairy Technology. Vol 48, No 1.

Pirhonen T. 1990. Maitovalmisteiden mikrobiologiseen laatuun vaikuttavat mikrobi-ryhmät ja niiden määrittämenetelmät. Teoksessa: Mantere-Alhonen S. (toim.) Maidon ja maitovalmisteiden mikrobit. Helsinki: Valtion painatuskeskus. s.165-180.

Pomiès D., Bony J. 2000. Comparison of hygienic quality of milk collected with a milking robot vs. with a conventional milking parlour. Teoksessa: Hogeveen H. & Meijering A. (toim.) Robotic milking, proceedings of the international symposium held in Lelystad, The Netherlands, 17–19 August 2000. s. 122-123.

Pönkä Antti. 1999. Ruokamyrkytykset ja elintarvikehygienia. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy. s. 26-28, 63-73.

Rasmussen M. D., Bjerring M., Justesen P., Jepsen L. 2002. Milk quality on Danish farms with automatic milking systems. Journal of Dairy Science. 85: 2869–2878.

Salovuho H., Ronkainen P., Heino A. 2005. Introduction of automatic milking system in Finland: effect on milk quality. Agricultural and food science. Vol. 14: 346-353.

Sanaa M., Poutrel B., Menard J. L., Serieys F. 1993. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy farms. Journal of Dairy Science. 76: 2891-2898.

Schuiling H. J., Verstappen-Boerekamp J.A.M, Knappstein K., Benfalk C. 2001. Optimal cleaning of equipment for automatic milking. Investigation of systems, procedures and demands. 19 s. (WWW-dokumentti)
<<http://www.automaticmilking.nl/projectresults/reports/DeliverableD16.pdf>> Luettu 24.3.2009.

Slaghuis B. A., Te Giffel M. C., Beumer R. R., André G. 1997. Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. International Dairy Journal. 7, 201–205.

Suokannas A, Salovuho H., Ronkainen P., Heino A., Hovinen M., Kasanen I., Raussi S., Kaihilahti J., Aisla A., Saastamoinen S., Alasuutari S., Manninen E. 2004. Maa- ja elintarviketalous 62. Maidon laatu, eläinten utareterveys, käyttäytyminen ja hyvinvointi automaattilypsissä. 97 s. (WWW-dokumentti) <<http://www.mtt.fi/met/pdf/met62.pdf>> Luettu 27.12.2008.

Sutherland A. D., Murdoch R. 1994. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. International Journal of Food Microbiology. 21, 279-292.

Ten Hag J., Leslie K. E. 2002. Preliminary investigation of teat cleaning procedures in a robotic milking system. Teoksessa: The first North American conference on robotic milking, March 20 – 22, 2002. Toronto, Canada. V 55–58.

Tulkki Marjo. 1999. Raakamaidon mikrobiflooran kartoitus. Insinöörityö. Espoon-Vantaan teknillinen ammattikorkeakoulu. 75 s.

Valio Oy. 2008. Tutkimus ja tuotekehitys. Mikrobiologiset menetelmät ja yleiset työohjeet.

Van der Vorst Y., Hogeveen H. 2000. Automatic milking systems and milk quality in the Netherlands. Teoksessa: Hogeveen H. & Meijering A. (toim.) Robotic milking, proceedings of the international symposium held in Lelystad, The Netherlands, 17–19 August 2000. s. 73-82.

Van der Vorst Y., Knappstein K., Rasmussen M. D. 2002. Milk quality on farms with an automatic milking system. Effects of automatic milking on the quality of produced milk. (WWW-dokumentti) <<http://www.automaticmilking.nl/>> Updated 20.2.2008. Luettu 13.4.2009.

Vissers M. M. M., Driehuis F., Te Giffel M. C., De Jong P., Lankveld J. M. G. 2006. Improving farm management by modeling the contamination of farm tank milk with butyric acid bacteria. Journal of Dairy Science. Vol 89 No. 3, 850-858.

Vissers M. M. M., Te Giffel M. C., Driehuis F., De Jong P., Lankveld J. M. G. 2007a. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. Journal of Dairy Science. Vol. 90 No. 7, 3286-3293.

Vissers M. M. M., Driehuis F., Te Giffel M. C., De Jong P., Lankveld J. M. G. 2007b. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. Journal of Dairy Science. Vol. 90 No. 7, 3278-3285.

Waes G. 1976. Aerobic mesophilic spores in raw milk. Milchvissenschaft. 31 (9) 521-525.

Walstra P., Wouters J. T. M., Geurts T. J. 2006. Microbiology of milk. Enumeration of microorganisms. Teoksessa Dairy Science and Technology. Second edition. CRC Press, Taylor & Francis Group. s. 181-182.

Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit

Pesäkelaskenta-alusta (MPCA-alusta, Plate Count Agar + maitojauhelisäys)

Hiivauute	2,5 g
Tryptoni	5,0 g
Glukoosi	1,0 g
Rasvaton maitojauhe	1,0 g
Agari	12-15 g
Tislattu vesi	1000 ml

Sterilointi 15 min 121 ± 1 °C. Alustan pH steriloinnin jälkeen $7,0 \pm 0,2$

VRBG-ravintoalusta

Peptoni	7,0 g
Hiivauute	3,0 g
Sappisuolat	1,5 g
Glukoosi	10,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Neutraalipuna	0,03 g
Kristallivioletti	0,002 g
Agari	10-18 g
Tislattu vesi	1000 ml

Aineet liuotettiin veteen ja kuumennettiin alusta kiehuvaaksi. Kasvualusta jäähdytettiin 45 °C:een. Alustan pH keittämisen jälkeen $7,4 \pm 0,2$.

Tryptoni-soija-agari (TSA)

Tryptoni-soijaliemi	30,0 g
Hiivauute	6,0 g
Agari	12-18 g
Tislattu vesi	1000 ml

Sterilointi 15 min 121 ± 1 °C. Alustan pH steriloinnin jälkeen $7,3 \pm 0,2$.

Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit

Bryant ja Burkey –alusta (BB-laktaatti)

Kaseiinipeptoni	15,0 g
Lihauute	7,5 g
Hiivauute	5,0 g
Natriumasetaatti ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	5,0 g
Kysteiinihydrokloridi	0,5 g
Natriumlaktaatti	5,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Seosta annosteltiin 10 ml koeputkiin, joissa oli Durham-putket. Steriloitiin 15 min 121 ± 1 °C. Alustan pH steriloinnin jälkeen $5,9 \pm 0,2$. Bryant ja Burkey –alustaputkia keitettiin ennen siirrostusta noin 15 minuuttia hapen poistamiseksi. Keittämisen jälkeen putket jäähdytettiin nopeasti kylmävesihauteessa.

MYP-ravintoalusta

Lihauute	1,0 g
Peptoni	10,0 g
D-Mannitoli	10,0 g
Natriumkloridi	10,0 g
Fenolipuna	0,025 g
Agari	12-18 g
Tislattu vesi	900 ml

Sterilointi 15 min 121 ± 1 °C. Alustan pH steriloinnin jälkeen $7,2 \pm 0,2$. Ennen maljojen valamista 90 ml:aan MYP-agaria (45 °C) lisättiin 1 ml polymyksiini B-sulfaatti -liuosta ja 10 ml munankeltuaisemulsiota.

Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit

Palcam-agari

Perusalusta:

Peptoni	23,0 g
Tärkkelys	1,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Mannitoli	10,0 g
Ammoniumrauta(III)sitraatti	0,5 g
Eskuliini	0,8 g
Dekstroosi	0,5 g
Litiumkloridi	15,0 g
Fenolipuna	0,08 g
Agari	12-18 g
Tislattu vesi	1000 ml
Sterilointi 15 min 121±1 °C. Alustan pH steriloinnin jälkeen 7,2±0,2	

Lisäaine:

Polymyksiini B-sulfaatti	10 mg
Keftatsidiimi	20 mg
Agriflaviini	5 mg
Tislattu vesi	5 ml

Aineet liuotetaan tislattuun veteen.

Steriloituun ja jäädytettyyn (45 °C) perusalustaan lisätään steriilisuodatettu lisäaine ja valetaan maljoiksi.

Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit

ALOA-agari

Perusalusta:

Lihapeptoni	18,0 g
Kaseiiniptoni	6,0 g
Hiivauute	10,0 g
Natriumpyruvaatti	2,0 g
Glukoosi	2,0 g
Magnesiumglyserofosfaatti	1,0 g
Magnesiumsulfaatti (vedetön)	0,5 g
Natriumkloridi	5,0 g
Litiumkloridi	10,0 g
Dinatriumvetyfosfaatti (vedetön)	2,5 g
5-Bromi-4-kloori-3-indolyl- β -D-glukopyranosidi	0,05 g
Agari	12-18 g
Tislattu vesi	930 ml
Sterilointi 15 min 121 $\pm$ 1 °C. Alustan pH on steriloinnin jälkeen 7,2 $\pm$ 0,2	

Lisäaine: Nalidiksiinihappo

Nalidiksiinihapon natriumsuola	0,02 g
Natriumhydroksidi (0,05 M)	5 ml

Lisäaine: Keftatsidimiliuos

Keftatsidimi	0,02 g
Tislattu vesi	5 ml

Lisäaine: Polymyksiini-B liuos

Polymyksiini-B-sulfaatti	76 700 IU
Tislattu vesi	5 ml

Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit

Lisäaine: Sykloheksimidi liuos

Sykloheksimidi	0,05 g
Etanoli	2,5 ml
Tislattu vesi	2,5 ml

Lisäaine: L- α -fosfatidyyli-inositoli liuos

L- α -fosfatidyyli-inositoli	2 g
Tislattu vesi	50 ml

Valmis ALOA-alusta

Perusalusta	930 ml
Nalidiksiinihappo	5 ml
Keftatsidimiliuos	5 ml
Polymyksiini-B-liuos	5 ml
Sykloheksimidiliuos	5 ml
L- α -fosfatidyyli-inositoli-liuos	50 ml

Perusalusta steriloidaan 15 min 121 ± 1 °C. Jäähdytetään 50 °C:een ja lisätään lisäaineet huolellisesti sekoittaen. Valmiin alustan pH $7,2 \pm 0,2$.

½ Fraser -elvytysliemi (Fraser Broth Base LAB 164, Lab M Limited)

Peptoniseos	15,0 g
Hiivauute	5,0 g
Eskuliini	1,0 g
Dinatriumvetyfosfaattidihydraatti	9,6 g
Kaliumdivetyfosfaatti	1,35 g
Natriumkloridi	20,0 g
Litiumkloridi	3,0 g
Tislattu vesi	1000 ml

Sterilointi 15 min 121 ± 1 °C. Alustan pH on steriloinnin jälkeen $7,2 \pm 0,2$

Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit

Supplementti:

½ Fraser supplement X164, Lab M Limited

Fraser-rikastusliemi (Fraser Broth Plus LAB 212, Lab M Limited)

Peptoniseos	15,0 g
Hiivauute	5,0 g
Eskuliini	1,0 g
Dinatriumvetyfosfaatti	9,6 g
Kaliumdivetyfosfaatti	1,35 g
Natriumkloridi	20,0 g
Litiumkloridi	3,0 g
Akriflaviini	0,025 g
Nalidiksiinihappo	0,02 g
Tislattu vesi	1000 ml
Sterilointi 15 min 121±1 °C. Alustan pH on steriloinnin jälkeen 7,2±0,2	

Supplementti:

Rauta-ammoniumsitraatti X211, Lab M Limited

Veriagari

Lihapeptoni	15,0 g
Maksauute	2,5 g
Hiivauute	5,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Agari	12-18 g
Tislattu vesi	1000 ml

Sterilointi 15 min 121±1 °C. Alustan pH on steriloinnin jälkeen 7,2±0,2. Steriloinnin jälkeen jäähdytettyyn alustaan (45 °C) lisätään 70 ml defibrinoitua lampaan verta.

Liite 1: Kasvualustat ja reagenssit

Sokerinkäyttöalusta:

Proteoosipeptoni	10,0 g
Lihauute	1,0 g
Natriumkloridi	5,0 g
Bromkresolipurppura	0,02 g
Tislattu vesi	1000 ml

Annostellaan putkiin niin, että steriloinnin (15 min 121 ± 1 °C) jälkeen putkissa on 9 ml liuosta.

Sokerilisäykset (mannitoli, ramnoosi, salisiini, ksyloosi, α -metyylimannosidi)

100 ml:aan tislattua vettä liuotetaan 5 g sokeria. Sterilointi 15 min 121 ± 1 °C.

Ennen määrittelyn aloittamista 1 ml sokeriliuosta lisätään 9 ml:aan sokerinkäyttöalustaa.

Lähde: Valio Oy, 2008.

Liite 2: Klostridi-itiöiden MPN-taulukko

Positiivisten putkien lukumäärä		Tulos
1 ml	0,1 ml	MPN/l
0	0	<300
0	1	300
1	0	400
1	1	700
2	0	900
2	1	1500
2	2	2100
3	0	3100
3	1	4300
3	2	9300
3	3	>9300

Lähde: Valio Oy. 2008.

Liite 3: Tulokset

Liite 3 (taulukko 1)

Parsinavetan lypsykone: kesäotanta (n = 48)							Listeria kval. (todettu/ei todettu)	
näyte nro	Mesof. aerob. bakt. (pmy/ml)	Enterobakteerit (pmy/ml)	Aerob. bakt. itiot (pmy/ml)	Klostridi:itiot (MPN/l)	B. cereus -itiot (pmy/ml)	Listeria kvant. (pmy/ml)		
4	510	3	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
13	2400	70	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
15	1300	6	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
16	1800	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
17	1700	<1	1	<300	<1	<10	Ei todettu	
21	9900	140	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
26	100000	290	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
27	1000	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
30	950	1	1	<300	<1	<10	Ei todettu	
32	360	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
34	1400	2	3	900	<1	<10	Ei todettu	
38	1400	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
41	90000	340	<1	900	<1	<10	Ei todettu	
50	2900	<1	<1	<300	3	<10	Ei todettu	
51	30000	<1	8	<300	<1	<10	Ei todettu	
54	1000	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
56	26000	4	3	<300	<1	<10	Ei todettu	
57	25000	2	1	<300	<1	<10	Ei todettu	
58	5000	16	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
63	5000	5	25	<300	<1	<10	Ei todettu	
64	170000	2400	19	3100	<1	<10	Ei todettu	
67	650000	300	30	<300	<1	<10	Ei todettu	
69	12000	45	1	<300	<1	<10	Ei todettu	
71	8700	20	70	900	<1	<10	Ei todettu	
73	1300	3	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
75	28000	6	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
80	5300	13	3	<300	<1	<10	Ei todettu	
81	3100	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
88	78000	190	20	900	<1	<10	Ei todettu	
91	2200	100	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
92	20000	3	5	400	<1	<10	Ei todettu	
93	56000	2	4	<300	<1	<10	Ei todettu	
95	1700	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
96	27000	55	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
97	12000	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
99	2600	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
104	54000	1		400	<1	<10	Ei todettu	
105	7200	70	10	<300	<1	<10	Ei todettu	
107	5700	14	5	3100	<1	<10	Ei todettu	
111		<1	7	<300	<1	<10	Ei todettu	
116	8200	<1	4	<300	2	<10	Ei todettu	
121	7500	3	1	<300	<1	<10	Ei todettu	
125	1100	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
126	35000	9	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
130	31000	90	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
143	61000	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
36	15000	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
46	940	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
min	360	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu	
maks	650000	2400	70	3100	3	<10	Ei todettu	
ka.geom.	7500	5	1	<300	<1	<10	Ei todettu	

Liite 3: Tulokset

Liite 3 (taulukko 2)

Parsinavetan lypsykone: talviotanta (n = 44)

näyte nro	Mesof. aerob. bakt. (pmy/ml)	Enterobakteerit (pmy/ml)	Aerob. bakt. itiöt (pmy/ml)	Klostridi-itiöt (MPN/l)	B. cereus itiöt (pmy/ml)	Listeria kvant. (pmy/ml)	Listeria kval. (todettu/ei todettu)
145	230	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
154	1200	<1	5	400	<1	<10	Ei todettu
159	1300	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
160	7200	4	7	<300	<1	<10	Ei todettu
162	760	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
163	630	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
165	7500	3	10	<300	<1	<10	Ei todettu
170	71000	150	1	<300	<1	<10	Ei todettu
178	840	<1	1	<300	<1	<10	Ei todettu
182	660	<1	3	<300	<1	<10	Ei todettu
190	200000	75	1	900	<1	<10	Ei todettu
192	19000	<1	1	900	<1	<10	Ei todettu
193	1600	<1	4	<300	<1	<10	Ei todettu
195	2500	5	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
196	1800	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
200	510	1	2	900	<1	<10	Ei todettu
202	14000	2	18	4300	<1	<10	Ei todettu
205	11000	1	8	4300	<1	<10	Ei todettu
206	24000	1	<1	400	<1	<10	Ei todettu
207	1900	25	<1	300	<1	<10	Ei todettu
208	2900	<1	18	1500	<1	<10	Ei todettu
210	4700	1	2	400	<1	<10	Ei todettu
215	3100	5	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
218	2700	14	1	<300	<1	<10	Ei todettu
219	15000	60	40	400	<1	<10	Ei todettu
224	11000	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
226	760	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
228	40000	5	5	<300	<1	<10	Ei todettu
229	6100	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
231	7900	<1	240	<300	<1	<10	Ei todettu
234	630	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
240	1300	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
245	3700	1	<1	400	<1	<10	Ei todettu
247	30000	<1	7	<300	<1	<10	Ei todettu
249	6000	90	11	400	<1	<10	Ei todettu
250	350	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
252	9000	2	840	<300	<1	<10	Ei todettu
254	4600	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
255	7900	<1	<1	400	<1	<10	Ei todettu
261	7100	3	10	400	<1	<10	Ei todettu
270	14000	120	18	3100	<1	<10	Ei todettu
281	1100	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
238	1200	<1	10	900	<1	<10	Ei todettu
280	13000	1	7	400	<1	<10	Ei todettu
min	230	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
maks	200000	150	840	4300	<1	<10	Ei todettu
ka.geom.	3903	2	2	<300	<1	<10	Ei todettu

Liite 3: Tulokset

Pihaton lypsäasema: kesäotanta (n = 45)

Liite 3 (taulukko 3)

näyte nro	Mesof. aerob. bakt. (pmy/ml)	Enterobakteerit (pmy/ml)	Aerob. bakt. itiöt (pmy/ml)	Klostridi-itiöt (MPN/l)	B. cereus -itiöt (pmy/ml)	Listeria kvant. (pmy/ml)	Listeria kval. (todettu/ei todettu)
1	1700	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
3	2700	45	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
5	7800	2	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
7	3200	<1	5	<300	<1	<10	Ei todettu
9	1700	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
12	150000	190	5	400	<1	<10	Todettu L. monocytogenes
14	2000	2	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
20	400	<1	2	<300	<1	<10	Ei todettu
22	770	4	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
23	5200	130	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
29	17000	3	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
31	1600	3	6	900	<1	40	Todettu L. monocytogenes
35	7500	50	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
37	1800	65	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
42	7000	290	50	900	<1	<10	Todettu L. innocua
44	2300	3	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
53	2800	310	1	900	<1	<10	Ei todettu
59	53000	80	1	900	<1	<10	Ei todettu
60	5500	12	4	<300	<1	<10	Ei todettu
65	2100	<1	1	<300	<1	<10	Ei todettu
72	5200	11	10	400	<1	<10	Ei todettu
74	5500	8	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
76	2600	11	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
77	12000	25	11	<300	<1	<10	Ei todettu
78	10000	3	4	900	<1	<10	Ei todettu
79	4800	25	<1	400	<1	<10	Ei todettu
84	380	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
85	880	4	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
89	4000	12	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
90	2100	18	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
98	11000	<1		<300	<1	<10	Ei todettu
100	9700	860		<300	<1	<10	Ei todettu
102	1900	8	1	<300	<1	<10	Ei todettu
103	260	1		<300	<1	<10	Ei todettu
109	2900	120	3	<300	<1	<10	Ei todettu
113	3900	9	11	400	<1	<10	Ei todettu
115	930	<1	10	<300	<1	<10	Ei todettu
118	980	<1	5	<300	<1	<10	Ei todettu
119	1700	3	1	<300	<1	<10	Ei todettu
127	11000	8	13	<300	<1	<10	Ei todettu
131	18000	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
132	3000	9	9	<300	<1	<10	Ei todettu
136	1800	4	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
140	1200	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
141	2000	<1	2	<300	<1	<10	Ei todettu
min	260	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
maks	150000	860	50	<300	<1	40	2 L. monocytogenes
ka.geom.	3317	6	1	<300	<1	<10	1 L. innocua

Liite 3: Tulokset

Pihaton lypsäsema: talviotanta (n = 44)

Liite 3 (taulukko 4)

näyte nro	Mesof. aerob. bakt. (pmy/ml)	Enterobakteerit (pmy/ml)	Aerob. bakt. itiöt (pmy/ml)	Klostridi-itiöt (MPN/l)	B. cereus -itiöt (pmy/ml)	Listeria kvant. (pmy/ml)	Listeria kval. (todettu/ei todettu)
146	760	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
148	30000	<1	1700	<300	<1	<10	Ei todettu
149	34000	150	25	<300	<1	<10	Ei todettu
150	2300	5	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
155	2200	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
156	200000	190	4	<300	<1	<10	Todettu L. monocytogenes
158	3000	1	35	3800	<1	<10	Ei todettu
161	2700	8	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
166	1400	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
167	2300	<1	<1	400	<1	<10	Ei todettu
172	1700	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
174	750	8	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
177	9100	5	1	<300	<1	<10	Ei todettu
179	2100	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
181	5100	<1	830	9300	<1	<10	Ei todettu
183	4400	12	15	400	<1	<10	Ei todettu
188	980	5	1	<300	<1	<10	Ei todettu
189	17000	5	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
191	28000	170	1	<300	<1	<10	Ei todettu
199	1600	1	<1	400	1	<10	Ei todettu
201	11000	8	<1	400	<1	<10	Ei todettu
209	50000	2	50	900	<1	<10	Ei todettu
211	9000	4	2	400	<1	<10	Ei todettu
212	1300	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
213	1900	2	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
214	2400	4	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
216	12000	12	25	<300	<1	<10	Ei todettu
220	1400	<1	12	<300	<1	<10	Ei todettu
223	11000	15	15	<300	<1	<10	Ei todettu
225	1100	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
237	4500	2	2	<300	<1	<10	Ei todettu
243	4800	25	1	400	<1	<10	Ei todettu
246	2800	<1	10	1500	<1	<10	Ei todettu
248	180	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
251	1400	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
253	2100	25	2	<300	<1	<10	Ei todettu
259	2400	2	2	400	<1	<10	Todettu L. monocytogenes
262	1800	2	1	900	<1	<10	Ei todettu
263	1600	2	490	<300	<1	<10	Ei todettu
269	1000	20	6	400	<1	<10	Ei todettu
273	1600	4	15	700	<1	<10	Ei todettu
278	2000	2	1	<300	<1	<10	Ei todettu
169	1400	<1	<1	400	<1	<10	Ei todettu
282	990	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
min	180	<1	<1	<300	<1	<10	2 L. monocytogenes
maks	200000	190	1700	9300	1	<10	
ka.geom.	3250	3	3	<300	<1	<10	

Liite 3: Tulokset

Pihaton automaattilypsy: kesäotanta (n = 51)

näyte nro	Mesof. aerob. bakt. (pmy/ml)	Enterobakteerit (pmy/ml)	Aerob. bakt. itiöt (pmy/ml)	Klostridi-itiöt (MPN/l)	B. cereus -itiöt (pmy/ml)	Listeria kvant. (pmy/ml)	Listeria kval. (todettui/todettu)
2	20000	85	12	400	<1	<10	Ei todettu
6	1800	<1	110	900	<1	<10	Ei todettu
8	1600	4	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
10	4000	12	220	<300	<1	<10	Ei todettu
11	2300	5	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
18	1900	15	13	<300	<1	<10	Ei todettu
19	1400	8	2	3100	<1	<10	Ei todettu
24	15000	480	7	9300	<1	<10	Ei todettu
25	73000	200	3	400	<1	<10	Todettu L. innocua
28	14000	2	1	<300	<1	<10	Ei todettu
33	1500	4	2	<300	<1	<10	Ei todettu
39	11000	160	<1	3100	<1	<10	Ei todettu
40	1100	6	3	400	<1	<10	Ei todettu
43	6400	340	25	3100	<1	<10	Ei todettu
45	6000	40	5	3100	<1	<10	Ei todettu
47	1900	5	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
48	6600	85	1	400	<1	<10	Ei todettu
49	22000	5	35	<300	<1	<10	Ei todettu
52	14000	170	2	700	<1	<10	Ei todettu
55	9900	7	40	<300	<1	<10	Ei todettu
61	29000	6	15	3100	<1	<10	Todettu L. monocytogenes
62	3200	8	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
66	1200	<1	1	900	<1	<10	Ei todettu
68	15000	1100	25	3100	<1	<10	Ei todettu
70	3700	5	35	400	<1	<10	Ei todettu
82	44000	7	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
83	4900	30	130	900	<1	<10	Ei todettu
86	4000	12	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
87	6300	85	16	400	<1	10	Todettu L. monocytogenes
94	6900	6	4	900	<1	<10	Ei todettu
101	1800	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
106	1900	40	2	<300	<1	<10	Ei todettu
108	2700	1	2	400	<1	<10	Ei todettu
110	2700	6	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
112	6100	3	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
114	2100	14	3	<300	<1	<10	Ei todettu
117	1600	11	45	1500	1	<10	Ei todettu
120	49000	1800	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
122	6500	190	6	400	<1	<10	Ei todettu
123	2700	14	5	900	<1	<10	Ei todettu
124	11000	210	70	4300	<1	<10	Ei todettu
128	4300	4	15	400	<1	<10	Ei todettu
129	5300	5	10	3100	<1	<10	Ei todettu
133	25000	5	7/5	400	<1	<10	Ei todettu
134	11000	3	1	<300	<1	<10	Ei todettu
135	2300	<1	1	<300	<1	<10	Ei todettu
137	4100	13	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
138	3100	30	17	<300	<1	<10	Ei todettu
139	1700	5	22	2000	<1	<10	Todettu L. innocua
142	2400	1	16	900	<1	<10	Ei todettu
144	1700	2	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
min	1100	<1	<1	<300	<1	<10	2 L. monocytogenes
maks	73000	1800	220	9300	1	10	2 L. innocua
ka.geom.	5060	13	4	450	<1	<10	

Liite 3: Tulokset

Pihaton automaattilypsy: talvioletanta (n = 50)							Liite 3 (taulukko 6)
näyte nro	Mesof. aerob. bakt. (pmy/ml)	Enterobakteerit (pmy/ml)	Aerob. bakt. titiöt (pmy/ml)	Klostridi:titiöt (MPN/3l)	B. cereus -itiot (pmy/ml)	Listeria kvant. (pmy/ml)	Listeria kval. (todettu/ei todettu)
147	1400	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
151	7300	3	2000	<300	<1	<10	Ei todettu
152	3500	5	240	400	<1	<10	Ei todettu
153	4800	4	2	900	<1	<10	Ei todettu
157	2200	11	15	900	<1	<10	Ei todettu
164	5400	6	2800	<300	<1	<10	Ei todettu
168	6600	2	4	2300	<1	<10	Ei todettu
171	8000	380	5	900	<1	<10	Ei todettu
173	8800	13	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
175	230000	35	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
176	2700	5	55	900	<1	<10	Todettu L. monocytogenes
180	960	25	5	900	<1	<10	Ei todettu
184	2700	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
185	1100	<1	8	<300	<1	<10	Ei todettu
186	7300	190	1	400	<1	<10	Ei todettu
187	3500	10	5	400	<1	<10	Ei todettu
194	5900	35	<1	<300	<1	<10	Todettu L. innocua
197	1700	<1	1	900	<1	<10	Ei todettu
198	2300	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
203	4100	2	25	400	<1	<10	Ei todettu
204	14000	35	<1	400	<1	<10	Ei todettu
217	6900	820	55	<300	<1	<10	Ei todettu
221	24000	4	3	<300	<1	<10	Ei todettu
222	7100	5	150	3100	<1	<10	Ei todettu
227	11000	2	190	9300	<1	<10	Ei todettu
230	2500	6	70	2100	<1	<10	Ei todettu
232	8400	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
233	52000	3	2	<300	<1	<10	Ei todettu
235	2100	19	19	<300	<1	<10	Ei todettu
236	1900	1	18	<300	<1	<10	Ei todettu
239	1300	<1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
241	7600	9	9	3100	<1	<10	Ei todettu
242	7900	220	8	4300	<1	<10	Ei todettu
244	17000	40	5	400	<1	<10	Ei todettu
256	45000	65	1	<300	<1	<10	Ei todettu
257	3000	2	8	400	<1	<10	Todettu L. monocytogenes
258	9900	50	8	3100	<1	<10	Ei todettu
260	15000	4	2	<300	<1	<10	Ei todettu
264	4700	<1	1	4300	<1	<10	Ei todettu
265	7800	25	4	3100	<1	<10	Ei todettu
266	5500	1	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
267	2700	6	<1	400	<1	<10	Ei todettu
268	18000	140	6	400	<1	<10	Ei todettu
271	4400	<1	120	900	<1	<10	Ei todettu
272	1200	<1	5	900	<1	<10	Ei todettu
274	1700	<1	6	900	<1	<10	Ei todettu
275	3100	4	30	400	<1	<10	Ei todettu
276	7000	3	<1	<300	<1	<10	Ei todettu
277	7500	14	6	3100	<1	<10	Ei todettu
279	3100	1	1	400	<1	<10	Ei todettu
min	960	<1	<1	<300	<1	<10	2 L. monocytogenes
maks	230000	820	2800	9300	<1	<10	1 L. innocua
ka.geom.	5389	6	6	480	<1	<10	

Liite 3: Tulokset

Koko otanta (n = 282)

Liite 3 (taulukko 7)

	Mesof. aerob. bakt. (pmy/ml)	Enterobakteerit (pmy/ml)	Aerob. bakt. itiöt (pmy/ml)	Klostridi-itiöt (MPN/l)	B. cereus -itiöt (pmy/ml)	Listeria kvant. (pmy/ml)	Listeria kval. (todettu/ei todettu)
min	180	<1	<1	<300	<1	<10	8 <i>L. monocytogenes</i>
maks	650000	2400	2800	9300	3	40	4 <i>L. innocua</i>
ka.geom.	4600	5	3	300	<1	<10	

Liite 4: Listeriamäärityksissä vajaaksi jääneet näytteet

Näyte nro.	Näytemäärä (ml)
17	24
25	23
37	23
38	24
49	24
68	22
71	24
95	23
96	24
109	23
127	23
130	23
148	24
151	22
153	23
156	23
160	22
164	24
169	24
189	23
201	24
202	23
206	24
212	24
232	23
234	21
239	24
248	24
258	24
259	22
264	24
265	23
266	22
268	23
269	23