

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Agropodnikání

Katedra: Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Mikrobiologická jakost syrového kravského mléka**

(Microbial quality of cow's raw milk)

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Eva SAMKOVÁ, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: doc. RNDr. Marcela Vyleťelová - Klimešová,  
Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Iveta Havránková

**České Budějovice, 2014**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta HAVRÁNKOVÁ**  
Osobní číslo: **Z12619**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Agropodnikání**  
Název tématu: **Mikrobiologická jakost syrového kravského mléka**  
Zadávající katedra: **Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Mikrobiologická jakost syrového kravského mléka je z pohledu zdravotní nezávadnosti mléčných výrobků nesporně jednou z nejdůležitějších vlastností. Množství mikroorganismů v syrovém mléce je přitom mimo jiné ovlivněno teplotou skladování či dobou uplynutou po nadojení.

Cílem diplomové práce bude sledování dynamiky celkového počtu mikroorganismů syrového kravského mléka v závislosti na vybraných faktorech.

Diplomová práce bude zpracována na základě zásad zpracování závěrečných prací uvedených na [http://www.zf.jcu.cz/copy\\_of\\_students/informace-pro-studujici/dokumenty-studijniho-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak\\_vypracovat\\_DP.pdf](http://www.zf.jcu.cz/copy_of_students/informace-pro-studujici/dokumenty-studijniho-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak_vypracovat_DP.pdf) podle následující rámcové osnovy:

1. **Úvod** - charakteristika a význam řešené problematiky včetně uvedení cílů práce
2. **Literární přehled** - současný stav poznání dané problematiky získaný studiem soudobé vědecké a odborné literatury
3. **Materiál a metodika** - popis použitých analytických metod včetně metod statistických
4. **Výsledky a diskuse** - tabulkové a grafické zpracování získaných dat navazující na cíl práce, jejich statistické vyhodnocení a porovnání s dostupnými literárními údaji
5. **Závěr** - stručné shrnutí výsledků vlastní práce, návrhy a doporučení vyplývající z řešené problematiky
6. **Summary** - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)
7. **Seznam literatury**- jednotný, podle platných citačních zásad.

Rozsah grafických prací: tabulky a grafy dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 35-50 stran textu

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:


- BARBANO D.M. et al.: Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. J. Dairy Sci., 2006, 89, Suppl. 1:E15-9.
- CEMPÍRKOVÁ R.: Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. Czech J. Anim. Sci., 2007, 52 (11): 387-393.
- ELMOSLEMANY, A.M. et al.: Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. J. Dairy Sci., 2009, 92 (6): 2634-2643; (Part 2: Bacteria count-specific risk factors. 2644-2652.)
- Databáze CASLIN, Česká zemědělská bibliografie, CAB Abstracts, PROQUEST, dostupné na: <http://www.lib.jcu.cz/cs/databaze>
- Vědecké a odborné publikace v časopisech Mlékařské listy, Náš chov, Výzkum v chovu skotu aj.
- Zákony, vyhlášky a nařízení legislativy ČR a EU týkající se zásad a požadavků na jakost a zdravotní nezávadnost živočišných produktů

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.  
Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Konzultant diplomové práce: RNDr. Marcela Vyletělová, Ph.D.  
VUCHS, s.r.o., Vikýřovice, odd. mikrob.

Datum zadání diplomové práce: 26. března 2013

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2014

  
prof. Ing. Miroslav Šoch, CSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 26. března 2013

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, která bude v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 15. dubna 2014

.....

Iveta Havránková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Poděkování za odbornou pomoc, cenné připomínky a rady při zpracování a řešení mé diplomové práce patří obzvláště doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D., doc. RNDr. Marcele Vyleťelové - Klimešové, Ph.D. a MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D. Děkuji i mé rodině a přátelům, kteří mě po dobu pětiletého studia podporovali.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>12</b>
2.1. JAKOST MLÉKA .....	12
2.2. MIKROBIOLOGICKÁ A HYGIENICKÁ KVALITA MLÉKA .....	14
2.2.1. HLAVNÍ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE .....	15
2.2.2. DOPLŇKOVÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE .....	18
2.3. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KVALITU MLÉKA .....	21
2.3.1. ZDRAVOTNÍ STAV DOJNIC .....	21
2.3.1.1. MASTITIDY .....	22
2.3.2. ZÍSKÁVÁNÍ MLÉKA .....	24
2.3.3. OŠETŘOVÁNÍ MLÉKA .....	25
2.3.3.1. FILTRACE .....	25
2.3.3.2. CHLAZENÍ .....	26
2.4. MLÉČNÉ AUTOMATY .....	27
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>31</b>
3.1. CÍL PRÁCE .....	31
3.2. METODIKA ODBĚRU VZORKŮ .....	31
3.3. ANALÝZA VZORKŮ .....	32
3.4. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ .....	34
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>35</b>
4.1. ZÁKLADNÍ STATISTICKÉ CHARAKTERISTIKY JAKOSTI MLÉKA VE SLEDOVANÝCH OBDOBÍCH .....	35
4.2. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE .....	39
4.2.1. VLIV MĚSÍCE NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE .	39
4.2.2. VLIV ROČNÍHO OBDOBÍ NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE .....	42
4.2.3. VLIV MÍSTA ODBĚRU NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE .....	44

4.2.4. VLIV DÉLKY SKLADOVÁNÍ NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE.....	46
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>48</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>49</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>50</b>
<b>8. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ, OBRÁZKŮ .....</b>	<b>55</b>
<b>9. SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>57</b>

## ***Abstrakt***

Mikrobiologická jakost syrového mléka je z pohledu zdravotní nezávadnosti mléčných výrobků jednou z nejdůležitějších vlastností. Množství mikroorganismů je mimo jiné ovlivněno teplotou skladování či dobou uplynutou od nadojení.

V diplomové práci byla sledována dynamika celkového počtu mikroorganismů (CPM) syrového mléka v závislosti na vybraných faktorech (měsíc, roční období, místo odběru, délka skladování).

Ke množení mikroorganismů přispělo teplé počasí, neboť největší nárůst CPM byl zjištěn v měsících duben a květen (až 108 tis./ml). V tomto ohledu je tedy nutné klást velký důraz na rychlé zchlazení mléka (do 150 min.) na požadovanou teplotu (8 °C). Zvýšení CPM mohlo být zapříčiněno také dlouhou dobou přepravy od odebrání vzorku syrového mléka z automatu až do vyhodnocení jakostních a mikrobiologických ukazatelů.

V druhé části diplomové práce jsou porovnány jakostní a mikrobiologické ukazatele syrového mléka z vybraných mléčných automatů.

Při vyhodnocování vzorků odebraných z farmy byly průměrné hodnoty CPM vyšší (43 tis./ml) oproti vzorkům odebraných z automatů (6 tis./ml). Vyšší hodnoty z farmy mohly být způsobeny nízkou úrovní hygieny získávání mléka a jeho následnou kontaminací. Naopak průměrné výsledky ze vzorků odebraných z automatů byly víc než výborné, což dokazuje důslednou kontrolu chlazení mléka při převozu z farmy do automatu, nebo po jeho následném zchlazení v automatu a udržení stálé teploty v nižších stupních (od 0,5 do 1 °C), které brání množení mikroorganismů.

***Klíčová slova:*** jakost mléka, celkový počet mikroorganismů, mléčné automaty



## ***Abstract***

The microbiological quality of raw milk from the perspective of the health of dairy products is one of the most important features. The amount of microorganisms is influenced by storage temperature and time of milk.

In the thesis was observed dynamics of total bacteria count (TBC) in raw milk depending on the selected factors (months, seasons, point of collection, the length of storage). To life of microorganisms contributes warm weather. The largest increase in TBC was observed in the months of April and May to 108 thousand /1 ML. It is necessary to place great emphasis on rapid cooling of milk (max 150 min.) to the desired temperature (8 °C). Increase TBC could be caused by long transportation time of sampling raw milk from a milk vending machine to evaluate the quality and microbiological indicators.

In the second part of the thesis are compares the quality and microbiological characteristics of raw milk from selected milk vending machines. When evaluating the samples taken from the farm, average values of TBC were higher (43 thousand/ml) compared to samples collected from the milk vending machines (6 thousand/ml). Reason of higher values from farms could be caused by poor hygiene of the milk and his secondary contaminations. In contrast, the average results from samples taken from the milk vending machines were more than excellent. That's shows tight control of cooling milk during transportation from the farm to the milk vending machine. Next reason better results is right cooling and to maintain a constant temperature in the grades (from 0.5 to 1 °C). That's temperature, which prevents the growth of microorganisms.

***Keywords:*** milk quality, total bacteria count, milk vending machines

## **PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK:**

<b>ATB</b> .....	antibiotika
<b>CPM</b> .....	celkový počet mikroorganismů
<b>KTJ</b> .....	kolonie tvořící jednotky
<b>SB</b> .....	somatické buňky
<b>PSB</b> .....	počet somatických buněk
<b>RIL</b> .....	rezidua inhibičních látek
<b>CPP</b> .....	psychrotrofní mikroorganismy
<b>KB</b> .....	koliformní bakterie
<b>TRM</b> .....	termorezistentní mikroorganismy
<b>SPAN</b> .....	sporotvorné anaerobní bakterie
<b>MA</b> .....	mléčný automat

## 1. ÚVOD

Mléko je díky své vysoké nutriční hodnotě důležitou součástí stravy většiny populace. Zároveň představuje vhodné prostředí pro rozvoj mikroorganismů, které svojí metabolickou činností mohou ovlivnit příznivě nebo nepříznivě jeho kvalitu. Kvalita syrového mléka je důsledkem všech činností vykonávaných v celém výrobním procesu, z farmy až po zpracování mléka v mlékárnách, přičemž zanedbání či vynechání některého ze standardizovaných postupů má za následek snížení kvality nebo i znehodnocení vyprodukovaného mléka.

Mikrobiologická jakost syrového mléka je z pohledu zdravotní nezávadnosti mléčných výrobků jednou z nejdůležitějších vlastností. Množství mikroorganismů je mimo jiné ovlivněno teplotou skladování či dobou uplynutou od nadojení. Pro zajištění vysoké kvality mléka by se měly přesně dodržovat hygienické postupy, a to jak při získávání, tak i při ošetřování a skladování mléka.

Cílem diplomové práce je sledování dynamiky celkového počtu mikroorganismů v syrovém kravském mléce v závislosti na vybraných faktorech. Kromě toho se práce zabývá porovnáním jakostních a mikrobiologických ukazatelů syrového mléka z vybraných mléčných automatů.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. JAKOST MLÉKA

Mléko je zemědělský produkt zvláštního významu jak pro výrobce, tak pro spotřebitele. Je to plnohodnotná potravinu pro lidskou výživu, což současně klade vysoké požadavky na hygienu při výrobě (Doležal et al., 2000). Kvalita mléka může být ovlivněna nejen při nedodržení hygienického režimu v prvovýrobě, ale i zdravotním stavem dojnice (Dragounová, 2010).

Pod pojmem jakost (kvalita) mléka se rozumí nejen obsah základních složek mléka (viz. tabulka 1), ale také komplex dalších důležitých charakteristik, především mikrobiologické a hygienické parametry, smyslové (senzorické), fyzikální a technologické vlastnosti (Samková a Cempírková, 2012).

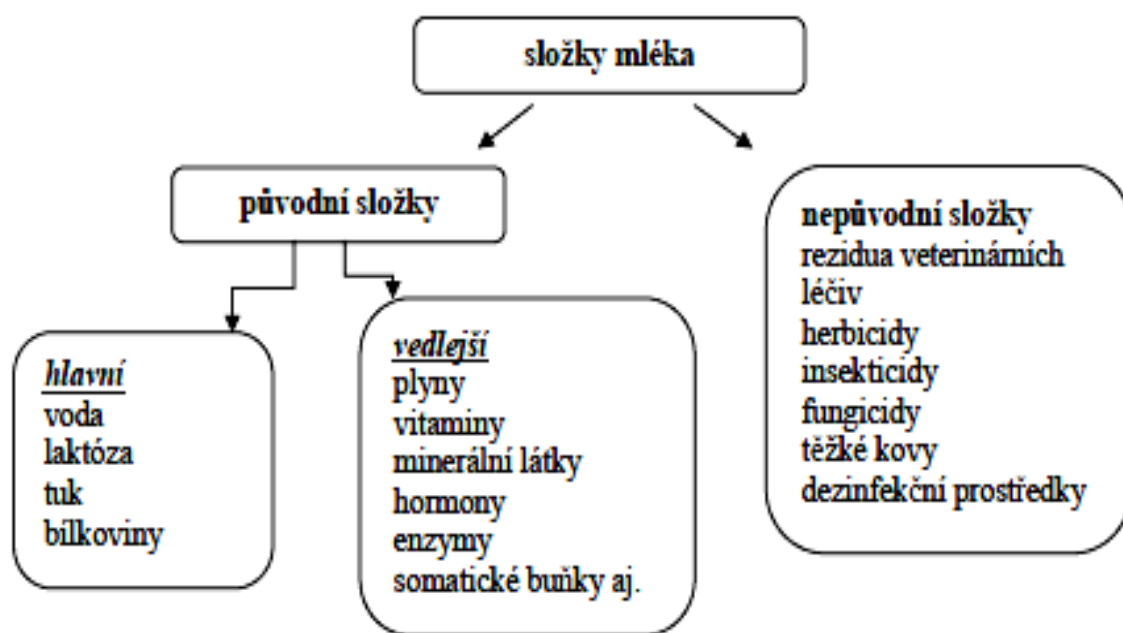
Tabulka 1: Obsah základních složek mléka

Složky mléka	[%]
Voda	87,3
Sušina	12,7
Tuk	3,7
Bílkoviny	3,4
Laktóza	4,8
Minerální látky	0,7

(Zdroj: Navrátilová et al., 2012)

Složky mléka se mohou podle Navrátilové et al. (2012) obecně rozlišovat na složky *původní*, které vznikají během látkové přeměny v mléčné žláze a jsou přirozenou součástí mléka a složky *nepůvodní (cizorodé)*, které se mohou dostat do mléka z vnějšího prostředí během získávání, uchovávání a přepravy syrového mléka. Skupinu původních složek tvoří *hlavní (základní)* a *vedlejší* složky mléka, jak dále vysvětluje obrázek 1.

Obrázek 1: Obecné rozdělení složek mléka



(Zdroj: Navrátilová et al., 2012)

Podle evropské legislativy (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004) se „syrovým mlékem“ rozumí mléko, produkované sekrecí mléčné žlázy hospodářských zvířat, které nebylo podrobeno ohřevu nad 40°C a nebylo ošetřeno ani žádným jiným způsobem s rovnocenným účinkem. Syrové mléko musí pocházet od zvířat: bez příznaků onemocnění přenosného mlékem na člověka, v dobrém zdravotním stavu bez infekcí pohlavního ústrojí s výtokem, horečnaté enteritidy s průjmem nebo viditelného zánětu vemene, bez poranění vemene, jež by mohlo změnit vlastnosti mléka. Zvířatům by neměly být podávány nepovolené látky či přípravky.

EU dále v nařízení (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004) vymezuje podmínky prodeje syrového mléka k přímé lidské spotřebě určitými limitními hodnotami následujících ukazatelů:

- **celkový počet mikroorganismů (CPM)  $\leq 100\ 000$  KTJ/ml**
- **počet somatických buněk (PSB)  $\leq 400\ 000$ /ml**
- **rezidua inhibičních látek (RIL) – bez nálezu**

KTJ = kolonie tvořící jednotky

Průměrné ukazatele jakosti syrového kravského mléka v ČR v období 2010 – 2012 ukazuje tabulka 2 (Kvapilík et al., 2013; ČMSCH, 2013).

Tabulka 2: Průměrné ukazatele jakosti syrového kravského mléka v ČR v období 2010 - 2012

UKAZATELE	2010	2011	2012
<b>Chemické složení (%)</b>			
<b>TUK</b>	4,04	4,02	4,00
<b>TUKUPROSTÁ SUŠINA</b>	8,84	8,80	8,84
<b>BÍLKOVINY</b>	3,40	3,40	3,41
<b>Hygienické a mikrobiologické ukazatele (tis./ml)</b>			
<b>POČET SOMATICKÝCH BUNĚK</b>	255,0	252,0	254,0
<b>CELKOVÝ POČET MIKROORGANISMŮ</b>	40,8	36,0	44,5
<b>TERMOREZISTENTNÍ MIKROORGANISMY</b>	0,25	0,27	0,25
<b>PSYCHROTROFNÍ MIKROORGANISMY</b>	7,02	12,0	15,96
<b>KOLIFORMNÍ BAKTERIE</b>	236,0	240,0	279,0

(Zdroj: Kvapilík et al., 2013; ČMSCH, 2013)

## 2.2. MIKROBIOLOGICKÁ A HYGIENICKÁ KVALITA MLÉKA

Kvalita syrového mléka, tepelně ošetřeného mléka a mléčných výrobků je důsledkem všech činností vykonávaných v celém výrobním procesu, z farmy až po zpracování mléka v mlékárnách, přičemž zanedbání či vynechání některého ze standardizovaných postupů má za následek snížení kvality nebo i znehodnocení celého vyprodukovaného množství mléka (Vilar et al., 2012).

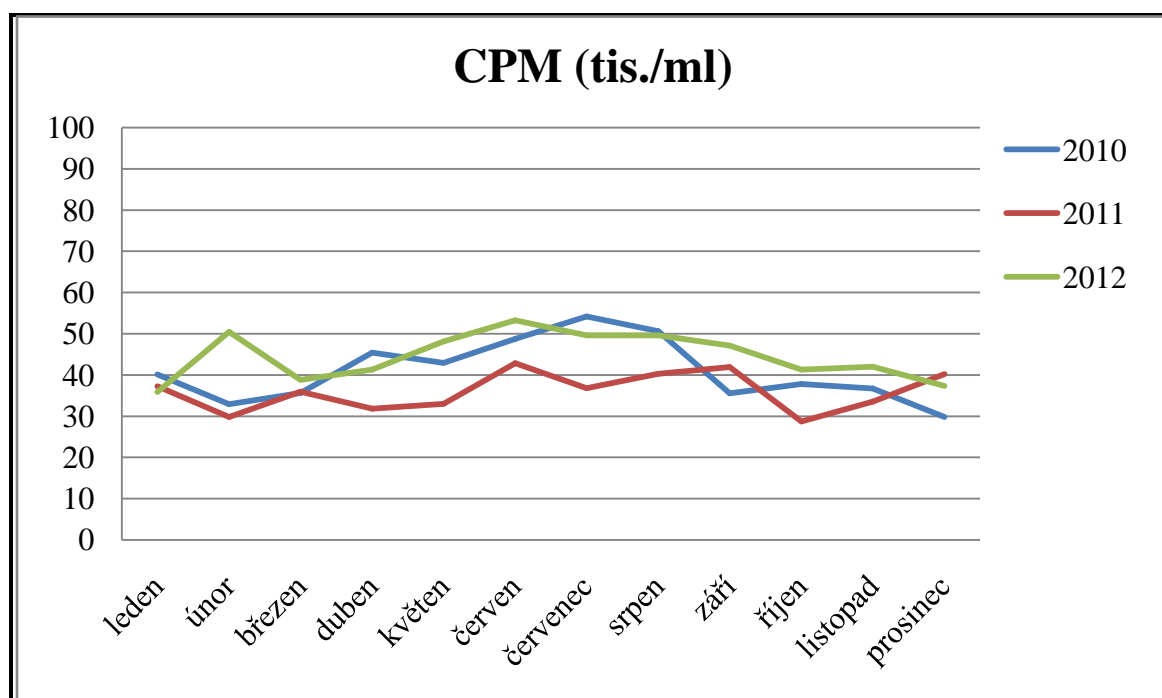
## 2.2.1. HLAVNÍ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE

Nejdůležitějšími hodnotícími ukazateli kvality syrového mléka dle evropské legislativy jsou *celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk a rezidua inhibičních látek* (Kvapilík, 2011). Tyto ukazatele deklarují i hygienickou kvalitu syrového mléka (viz kapitola 2.1.) (Kovařík, 2010).

*Celkovým počtem mikroorganismů (CPM)* jsou míněny všechny mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy (bakterie, kvasinky, plísně) přítomné v mléce (Samková et al., 2009). Jejich množství v mléce vypovídá o úrovni hygieny v prvovýrobě, přičemž dodržováním správných hygienických zásad lze do značné míry výskytu i pomnožení mikroorganismů v mléce zabránit (Králičková a Kuchtík, 2011).

Vývoj CPM v syrovém mléce u bazénových vzorků v České republice v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012 ukazuje graf 1 (Kopunecz, 2013), ze kterého je patrné, že hodnoty CPM se pohybují od 29 do 54 tis./ml.

Graf 1: Vývoj celkového počtu mikroorganismů (CPM) v syrovém mléce z bazénových vzorků v ČR v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012



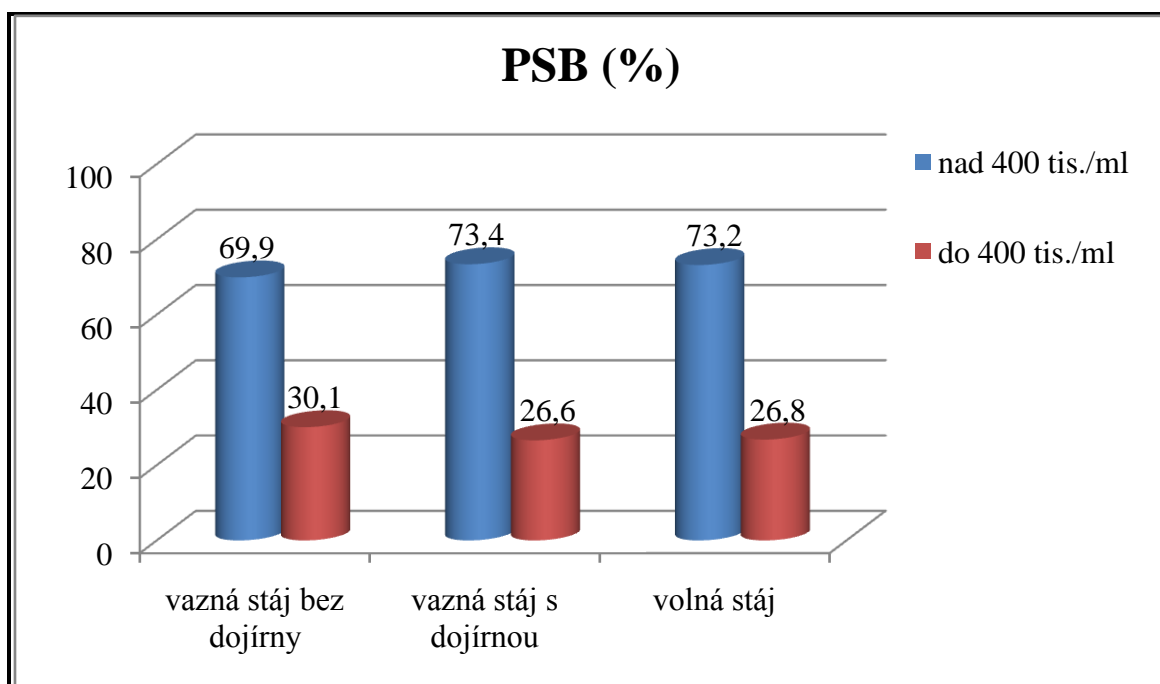
(Zdroj: Kopunecz, 2013)

**Somatické buňky (SB)** jsou buňky a útvary pocházející z krve a z mléčné žlázy (leukocyty, buňky epitelu), které se uvolňují do dutiny mléčných alveol v průběhu tvorby mléka (Seydlová, 2012). Největší podíl SB, více než 95 %, tvoří bílé krvinky – leukocyty (Bradleya Green, 2005).

Zvýšený **počet somatických buněk (PSB)** může ukazovat na zánět mléčné žlázy nebo metabolickou poruchu (Simonová, 2011). Kromě zánětu mléčné žlázy ovlivňující variabilitu PSB jsou známé i další faktory jako jsou plemeno, roční období, pořadí laktace, stadium laktace, výživa, stres a ustájení (Doležal et al., 2000).

PSB má výrazný vliv na kvalitu mléka. Obecně platí, že čím je v mléce PSB nižší, tím jsou příznivější hygienické, smyslové a technologické vlastnosti mléka (Navrátilová et al., 2012). Vliv technologie ustájení na PSB v procentuálním zastoupení znázorňuje graf 2 (Dianová a Ryba, 2006).

Graf 2: Vliv technologie ustájení na počet somatických buněk PSB (%)

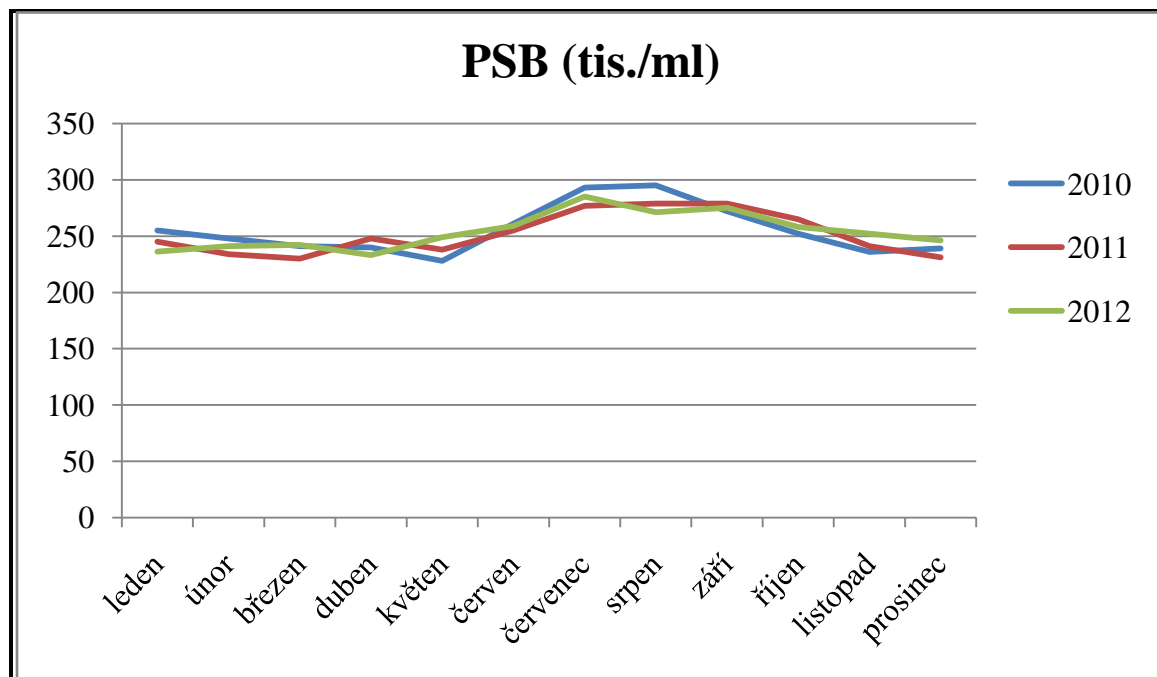


(Zdroj: Dianová a Ryba, 2006)

Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 musí syrové kravské mléko splňovat kritérium pro PSB v 1 ml  $\leq$  400 000. Vývoj PSB v syrovém mléce v České republice v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012 ukazuje graf 3 (Kopunecz, 2013). Z grafu je patrné, že PSB se pohybuje od 228 do 295 tis./ml.



Graf 3: Vývoj počtu somatických buněk (PSB) v syrovém mléce v ČR v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012

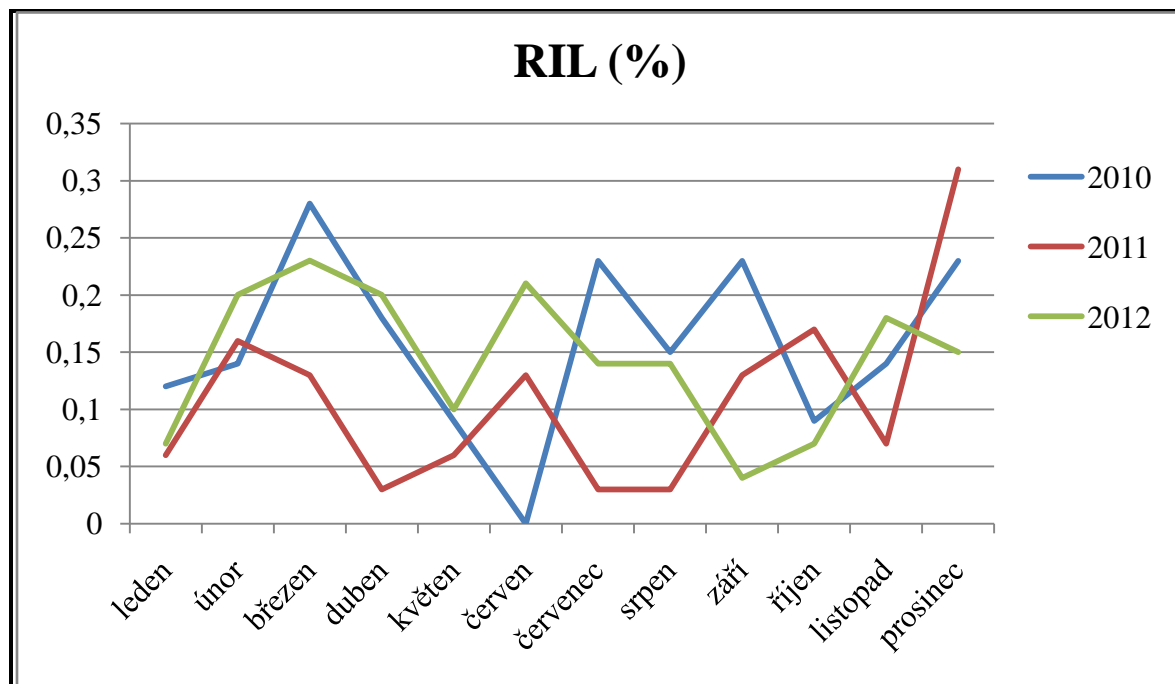


(Zdroj: Kopunecz, 2013)

**Rezidua inhibičních látek (RIL)** v mléce je široký pojem. Jedná se zpravidla o řadu cizorodých substancí, které mohou pronikat do mléka a ohrožovat nejen průběh zpracovatelských technologií, ale rovněž i zvyšovat riziko pro zdraví konzumentů mléka a mléčných potravin. Z těchto důvodů je jejich přítomnost v mléce všeobecně nežádoucí (Doležal et al., 2000). Jejich nálezy v mléce souvisí nejčastěji s používáním veterinárních léčiv, s nedodržením ochranných lhůt po léčbě a se změnou metabolismu nemocného zvířete (Navrátilová, 2002).

Evropský standard pro syrové kravské mléko vyjadřuje rezidua antibiotik (ATB) mezinárodními jednotkami **penicilinu (I.U.)** max. 0,007 I.U./ml. (Pavlů, 2006). Procento pozitivních vzorků na přítomnost RIL v syrovém mléce je v České republice poměrně nízké (0 až 0,3 %), což je patrné z grafu 4 (Kopunecz, 2013).

Graf 4: Procenta pozitivních vzorků v syrovém mléce v ČR na přítomnost reziduí inhibičních látek (RIL) v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012



(Zdroj: Kopunecz, 2013)

## 2.2.2. DOPLŇKOVÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE

Mezi doplňkové mikrobiologické ukazatele kvality syrového kravského mléka patří mikroorganismy: *psychrotrofní*, *koliformní*, *termorezistentní* a *sporotvorné anaerobní* (Cempírková et al., 2012). Jejich hygienické limity jsou uvedeny v tabulce 3 (Hanuš a Vyletělová, 2006).

Tabulka 3: Hlavní a doplňkové mikrobiologické ukazatele kvality syrového mléka

Mikrobiologické ukazatele	Hlavní	Doplňkové
Celkový počet mezofilních mikroorganismů	100tis. KTJ/ml	
Celkový počet psychrotrofních mikroorganismů		50tis. KTJ/ml
Koliformní bakterie		1tis. KTJ/ml
Termorezistentní mikroorganismy		2tis. KTJ/ml
Sporotvorné anaerobní bakterie		neg. v 0,1 ml

(Zdroj: Hanuš a Vyletělová, 2006)

**Psychrotrofní mikroorganismy (CPP)** jsou charakteristické tím, že jsou schopny se rozmnožovat při nízkých teplotách a dokážou tvořit proteolytické a lipolytické enzymy, které mohou vyvolávat nežádoucí změny mléka (Vilar et al., 2012). K zástupcům CPP se řadí také bakterie rodu *Flavobacter*, *Alcaligenes*, *Aeromonas* aj. (Lukášová, 1996).

**Koliformní bakterie (KB)** jsou schopné růstu za aerobních a fakultativně anaerobních podmínek, zkvašují laktózu za vzniku plynu, kyselin a aldehydů, při teplotě 35-39 °C (Cempírková et al., 2012). Jejich přirozeným zdrojem je střevní trakt teplokrevných zvířat. Tyto bakterie hrají také významnou roli jako indikátory úrovně hygieny získávání mléka a jeho případné kontaminace (Navrátilová et al., 2012). K nejvýznamnějším zástupcům KB patří *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.* a *Citrobacter sp.* (Cempírková et al. 2012).

**Termorezistentní mikroorganismy (TRM)** jsou vysoce odolné vůči vysokým teplotám (nad 60 °C) (Cempírková et al., 2012). Tyto mikroorganismy tvoří v technologiích převážnou část (až 90 %) mikroflóry pasterovaného mléka. Proto jsou nejproblematictější složkou CPM, neboť přežívají i podmínky sušárenské technologie. Představovány jsou zejména zástupci rodů *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.* aj. Technologická nebezpečnost spočívá v jejich vegetativních formách, které vylučují termostabilní lipázy a protézy, proto jsou TRM vedeny jako doplňkové ukazatele kvality mléka pro mlékárny s komplikovanějšími technologiemi (jogurty, sýry, atd.).

Do podskupiny TRM patří **sporotvorné anaerobní bakterie (SPAN)**. Ty mají schopnost vyvolávat senzorické vady mléčných výrobků (např. duření sýrů), ale jsou i dietetickým rizikem pro konzumenty (tvorba toxinů) (Doležal et al., 2000). Tyto bakterie (např. *Clostridium butyricum*) mohou také vyvolávat máselné kvašení (Cempírková et al., 2012).

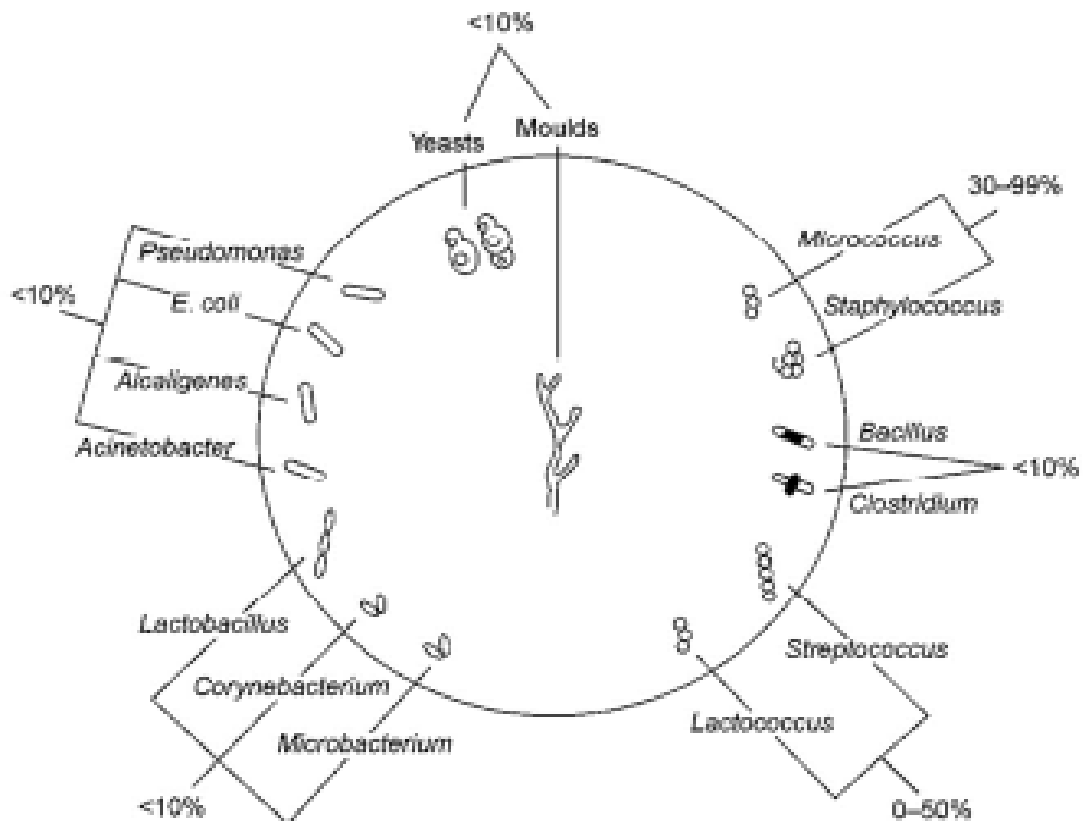
Skupiny mikroorganismů a jejich zástupců vyskytujících se v syrovém mléce jsou uvedeny v tabulce 4 (Cempírková et al., 2012). Na obrázku 2 jsou přehledně znázorněny mikroorganismy vyskytující se v syrovém mléce a jejich procentuální zastoupení (Roginski et al., 2003).

Tabulka 4: Skupiny mikroorganismů a jejich zástupců vyskytujících se v syrovém mléce

Skupina mikroorganismů	Zástupci
Psychrotrofní	<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Aeromonas</i>
Koliformní	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Klebsiella</i> a <i>Citrobacter</i>
Termorezistentní	<i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Enterococcus</i>
Sporotvorné anaerobní	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. sporogenes</i>

(Zdroj: Cempírková et al., 2012)

Obrázek 2: Mikroorganismy vyskytující se v syrovém mléce



(Zdroj: Roginski et al., 2003)

## **2.3. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KVALITU MLÉKA**

Nejvýznamnějším požadavkem na kvalitu syrového mléka je mikrobiální čistota, která má vliv i na technologické vlastnosti mléka. Mléko přítomné v parenchymu mléčné žlázy je u zdravých dojnic prakticky sterilní. Čerstvé nadojené mléko však sterilní není, ale vždy obsahuje určité množství mikroorganismů. První stříky obsahují nejvíce mikroorganismů, proto se oddělují do zvláštní nádoby, aby nezneškodnocovaly ostatní mléko. Ve druhém stříku počet mikroorganismu klesá a v dalších střících je jen 10 až 15% z jejich původního počtu (Kadlec, 2007).

Mikrobiologická kvalita mléka je ovlivňována především přípravou vemene (toaletou mléčné žlázy), přípravou dojících zařízení, způsobem dojení a metodou používanou pro čištění a dezinfekci dojících zařízení. Dalšími důležitými faktory jsou rychlost zchlazení mléka na požadovanou teplotu po nadojení a způsob skladování mléka (Wiking et al., 2002).

### **2.3.1. ZDRAVOTNÍ STAV DOJNIC**

Základem pro produkci kvalitního mléka je především dobrý zdravotní stav dojnic (Loučka, 2008). Mezi činitele, které ovlivňují zdravotní stav dojnic, patří výživa, způsob ustájení, kvalita stájového ovzduší a kvalita ošetřování (Walterová et al., 2010). Vyrovnaná výživa dojnic v laktaci je považována za jeden z nejdůležitějších faktorů. Směsná krmná dávka musí tedy být pro dojnice dostatečně pestrá, živinově vyrovnaná a také stabilní, a to nejen z hlediska nutričního, ale také dietetického a hygienického (Výmola, 2009). Dostatek energie získané z krmné dávky má zásadní význam pro produkci mléčné bílkoviny. Při poklesu tvorby mléčné bílkoviny dochází i ke snížení obsahu mléčného tuku a ke zvýšenému PSB v mléce (Pařilová, 2006).

Zdravotní stav dojnic je také nejčastější příčinou jejich vyřazování. V porovnání s rokem 1996 se v ČR výrazně zvýšil podíl krav vyřazených ze zdravotních důvodů, a to ze 74 % až na 84 %. Příčinami jsou především poruchy plodnosti, těžké porody, mastitidy a ostatní zdravotní důvody - tabulka 5 (Buček, 2012); (ČMSCH, 2012).

Tabulka 5: Příčiny vyřazování krav v kontrole užitkovosti dojnic

Ukazatele	1996 [%]	2008 [%]	2009 [%]	2010 [%]	2011 [%]
Nízká užitkovost	21	12	12	12	11
Vysoký věk	1	1	1	1	2
Zootechnické důvody celkem	26	17	18	17	17
Poruchy plodnosti	23	23	23	23	24
Těžké porody	7	11	11	11	10
Onemocnění vemene	13	9	9	9	9
Ostatní zdravotní důvody	31	40	40	40	41
Zdravotní důvody celkem	74	84	83	83	84

(Zdroj: Buček, 2012; ČMSCH, 2012)

### 2.3.1.1. MASTITIDY

Nejrozšířenějším a nejnákladnějším onemocněním dojnic jsou záněty mléčné žlázy (mastitidy) (Elias et al., 2012). Mastitidy jsou známé od doby domestikace skotu (Bečvář, 2008). Výskyt mastitid kolísá ve stádě mezi 12 – 40 % (dle plemene), v některých stádech dosahuje 50 – 80 %. Na vzniku zánětu mléčné žlázy se podílejí rozličné druhy mikroorganismů, různá narušení fyziologických procesů organismu a mléčné žlázy a rozmanitá fyzikální a chemická traumata (Škarda a Škardová, 2000). K zabránění vzniku onemocnění je třeba vytvářet takové podmínky, aby obranné mechanismy byly plně funkční – čili neoslabovat obranyschopnost organismu, ať už chybami ve výživě, ustájením či špatnou dojíací technikou, která by vytvářela podmínky pro traumatizaci mléčné žlázy, a tím by narušila přirozené ochranné bariéry (Seydlová, 2001).

Zánětlivý proces mléčné žlázy negativně ovlivňuje produkci mléka, neboť energie je přednostně využita na překonání zánětu, a nikoli na produkci. Současně dochází k poklesu sušiny mléka a zvýšení PSB (Ryšánek, 2007). Výskyt zánětu vemene dále zvyšuje až osminásobně riziko vyvolání dalších nemocí (Kvapilík, 2011).

Rozpoznání jednotlivých typů mastitid je důležité z důvodu volby léčby a prevence (Bečvář, 2008). Mastitidy lze podle míry projevu onemocnění rozlišit na **subklinické** a **klinické** (Seydlová, 2001).

**Klinická mastitida** se projevuje zjevnými klinickými příznaky zánětu, tj. otokem, zarudnutím, bolestivostí a zvýšením teploty vemene. Dochází k narušení konzistence mléka (vločky, případně až mléku nepodrobný sekret) (Bouška, 2006). Diagnostiku klinických mastitid u laktujících dojnic musejí provádět dojiči před každým dojením posouzením prvních stříků mléka, zjištěním bolestivosti, zduření a teploty mléčné žlázy, popřípadě tělesné teploty a chování dojnice. Odstříky se provádějí do speciální nádoby s tmavým dnem, aby se posoudila jejich barva, konzistence aj. Každodenní diagnostika klinických mastitid je základním předpokladem pro zavedení rychlé léčby a pro vyřazování smyslově změněného mléka z dodávky do mlékárny (Škarda a Škardová, 2000).

**Subklinická mastitida** je charakterizována zvýšeným PSB v mléce, snížením nádoje, poklesem obsahu laktózy, ale bez zjevných příznaků zánětu vemene. V subklinickou mastitidu přecházejí klinické mastitidy v případě, že nedošlo k bakteriálnímu vyléčení a zárodky dále přežívají v tkáni mléčné žlázy (Bouška, 2006). Zjišťování subklinických mastitid se provádí na základě pravidelných laboratorních rozborů mléka (Zámostný, 2013).

Dle nástupu a trvání zánětu se mastitidy rozdělují na **akutní** a **chronické** (Bečvář, 2008). Původce mastitid lze na základě jejich rezervoáru pro infekci a způsobu, jakým pronikají do mléčné žlázy rozlišit na **environmentální** a **kontagiózní**.

**Environmentální mikroorganismy** přežívají na vnějším povrchu, podestýlce, k infekci dochází mezi dojením (Seydlová, 2001). Význam environmentálních mastitidních patogenů vzrostl zejména během posledních let. K nejčastěji diagnostikovaným patogenům patří *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* a *Enterobacter species* a čím dál častěji i zástupci plísní a kvasinek (Seydlová, 2006).

Nejúčinnější zbraní proti výskytu nových environmentálních mastitid je prevence, kdy jednou z nejdůležitějších rolí hraje režim pre- a postdippingu (dezinfekční ošetření před a po dojení) mléčné žlázy, aplikace ATB v době zaprahování, odpovídající výživa a udržování prostředí stáje v dosažitelné čistotě (Seydlová, 2006). Zvýšení čistoty prostředí, podestýlky, dobrá ventilace, nízká teplota a vlhkosti vedou k minimalizaci pomnožení těchto patogenů, a tím i pravděpodobnosti průniku do strukového kanálku po nasazení dojící jednotky (Seydlová, 2001). Dezinfekcí struků po dojení se snižuje průnik bakterií do strukového

kanálku až o 90 %. Aby byla dezinfekce struků účinná, musí se používat jen dezinfekční prostředky k tomu určené a v předepsané koncentraci (Škarda a Škardová, 2000).

**Kontagiózní mikroorganismy** přežívají v mléčné žláze, na těle a na kůži dojnic. Infekce se šíří mlékem v době dojení. Hlavními původci jsou *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*. Do této skupiny je zařazována i *Mycoplasma bovis*, donedávna u nás prakticky nediodagnostikovaná. Zaprahování pomocí ATB, dezinfekce struků po podojení a přísné brakování nevyléčitelně nemocných dojnic, jsou cestou jak redukovat kontagiózní mastitidy (Seydlová, 2001).

### 2.3.2. ZÍSKÁVÁNÍ MLÉKA

Mléko není možné vydojit bez humorálních procesů, které řídí spouštění mléka – ejekci. Mechanickým drážděním mléčné žlázy při dojení nebo sáním mláděte se u samic spouští ejekční reflex, který prostřednictvím hypotalamu vede k uvolnění hormonu oxytocinu z neurohypofýzy (Bouška, 2006). Doba jednoho dojení by neměla přesáhnout 6 – 8 min, tedy dobu, po kterou působí hormon oxytocin (Šefrová a Zink, 2011).

Jednou ze základních podmínek pro udržení vysoké kvality mléka je zachování mechanické a mikrobiologické čistoty nadojeného mléka (Doležal et al., 2000). S tím souvisí i zajištění hygienické čistoty dojicího prostředí, dojicího zařízení, dojírny, sběrných tanků, čistoty zvířat a jejich vemen (Zweifel et al., 2004). Mezi dojeními jednotlivých dojnic či alespoň mezi dojenými skupinami je dezinfekce dojicího stroje podmínkou pro udržení vysoké hygieny dojení (Doležal, 2009).

Dojení má významný vliv nejen na zdravotní stav mléčné žlázy, ale také na kvalitu získávaného mléka. Dodržování pravidelného intervalu mezi dojeními sehrává významnou úlohu při výskytu mastitid (Doležal, 2009). Důležité je též zachování navykého postupu jednotlivých úkonů před dojením. Dojnice tento stereotyp dobře vnímá a spojuje s přípravou na uvolňování mléka. Správné dojení je pro dojnici spojeno s pocitem libosti (Doležal et al., 2000).

Při dojení může docházet k přenosu patogenních mikroorganismů mezi jednotlivými čtvrtěmi vemene jedné dojnice i mezi dojnicemi, a to dojicími stroji, rukama dojičů či utěrkami. Pro snížení tohoto rizika je nutno dodržovat technologické zásady, nejdůležitější z nich je dezinfekce struků po dojení (Doležal et al., 2000). Dezinfekce struků po dojení



tzv. postdipping se provádí čerstvým dezinfekčním prostředkem, nejlépe namočením větší části všech struků do jednotlivého dezinfektoru (Olejník, 2008).

Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 je třeba zajistit, aby mlezivo bylo dojeno odděleně a nebylo smícháno se syrovým mlékem.

Po skončení procesu dojení vzniká na vnitřním povrchu dojícího zařízení tenká vrstva usazenin laktózy, tuku, bílkovin a minerálních látek, kterou je nutné odstranit, protože tyto usazeniny jsou porézní a vytvářejí ideální prostředí pro množení mikroorganismů (Doležal et al., 2000).

***Správný postup dojení zahrnuje zejména tyto pracovní úkony:***

- omytí vemene čistou, 45 °C teplou vodou
- oddojení a posouzení prvních stříků mléka do speciální nádoby s tmavým dnem
- nasazení strukových násadců, popřípadě masáž vemene rukou
- podojení dojnice za 2 - 8 minut
- velmi šetrné dodojování strojem, které zabrání rozvoji zánětů
- šetrné sejmutí strukových násadců z vemene zabrání možné traumatizaci struků
- dezinfekce struků po dojení (Škarda a Škardová, 2000).

### **2.3.3. OŠETŘOVÁNÍ MLÉKA**

Kvalita mléka je ovlivněna nejen vlastním procesem dojení, ale také kvalitou ošetřování mléka po jeho vydojení (Doležal et al., 2000). Mléko se musí čistit bezprostředně po nadojení a čištění nesmí být žádným způsobem urychlováno (Navrátilová et al., 2012). Mezi základní způsoby ošetřování mléka po vydojení patří filtrace a chlazení (Doležal et al., 2000).

#### **2.3.3.1. FILTRACE**

Není-li zajištěna požadovaná úroveň hygieny při dojení, je nutné mléko před jeho uskladněním v chladicím zařízení filtrovat k odstranění mechanických příměsí (Doležal et al., 2000). Čím dříve se tyto příměsí odstraní, tím méně mikroorganismů se do mléka vyplaví (Navrátilová et al., 2012).

V současné době se k filtraci nejčastěji používají mléčné filtry různých tvarů a materiálů, které se mohou vkládat do dojícího potrubí nebo před vtokem do chladicí nádrže (Samková a Cempírková, 2012). Filtrační vložky musí být vyměněny vždy, když jsou znečištěny, nebo

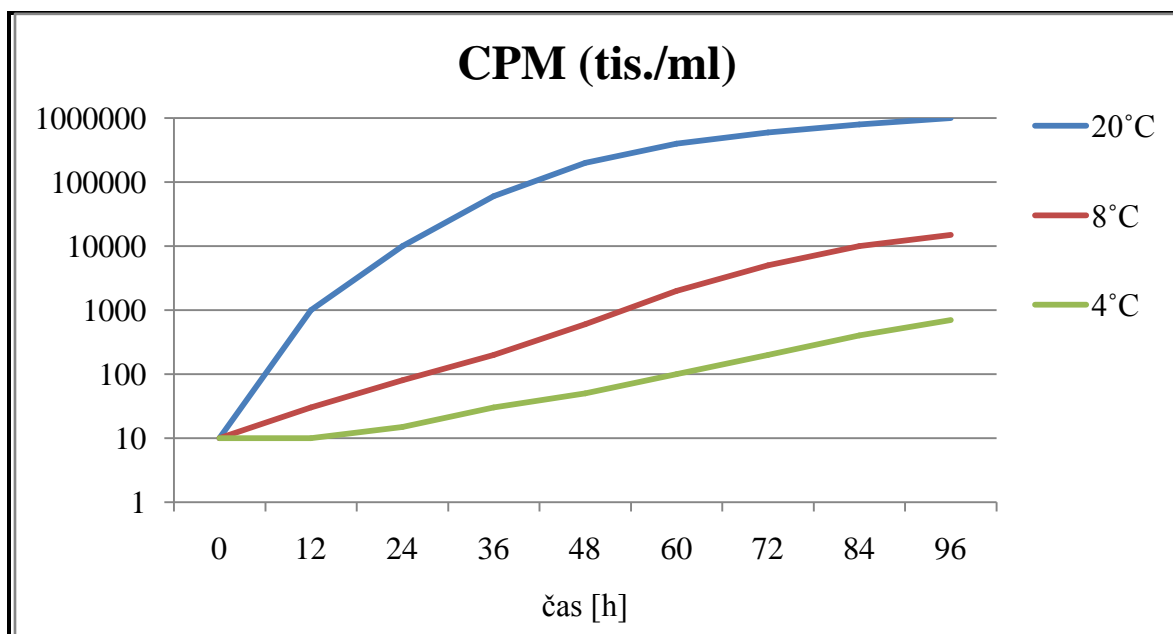
nejlépe po nadojení 350 – 500 litrů mléka (Doležal et al., 2000). K filtraci nesmí být použity tkané textilie (Samková a Cempírková, 2012).

### 2.3.3.2. CHLAZENÍ

Mléko má po nadojení teplotu přibližně 33 °C, která vyhovuje růstu vysokému počtu mikroorganismů (Samková a Cempírková, 2012). Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 musí být mléko po nadojení vychlazeno nejpozději do 150 min., na teplotu 8 °C nebo nižší, pokud je svoz prováděn každý den. V případě, že se jedná o obdenní svoz, tak musí být mléko zchlazeno na teplotu 6 °C nebo nižší.

Obecně platí, že čím rychleji je mléko zchlazeno, tím pomaleji se množí mikroorganismy, jak je zdokumentováno v grafu 5, který znázorňuje závislost rozvoje CPM obsažených v mléce na teplotě skladování.

Graf 5: Rozvoj celkového počtu mikroorganismů (CPM) v mléce při různé teplotě skladování



(Zdroj: Machálek, 2008)

Většinou při rychlém vychlazení mléka na teplotu 4 – 5 °C je CPM při svozu téměř stejný jako v čerstvém mléce po nadojení. Při teplotě 4 °C může být mléko uchovááno v úchovných chladicích nádržích či tancích i několik dní, aniž by došlo k výraznému pomnožení mikroorganismů (Machálek, 2008). Hluboké zchlazení pod 4 °C je nežádoucí, namrzání mléka na stěny úchovné nádrže či tanku je nepřípustné. Dochází při tom totiž k fyzikálním změnám disperze micel kaseinu a toto mléko má zhoršenou kysací aktivitu (Samková a Cempírková, 2012).

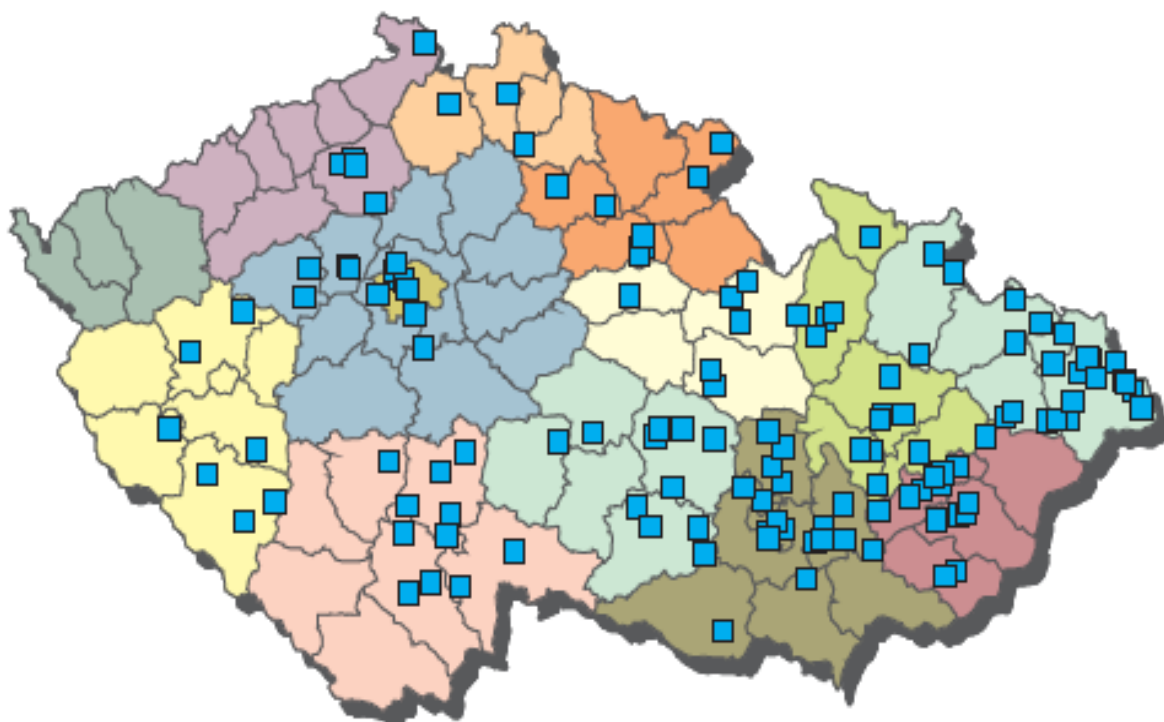
## 2.4. MLÉČNÉ AUTOMATY

Jednou z možností, jak zkrátit cestu mléka od nadojení ke spotřebiteli, je prodej mléka pomocí tzv. *mléčných automatů (MA)*.

V Evropě se začaly objevovat první automaty na prodej syrového mléka kolem roku 2000. Jako jedny z prvních je provozovali farmáři ve Švýcarsku. Dále se pak MA postupně začaly rozšiřovat i do dalších evropských států. Největší rozvoj MA v České republice byl po roce 2009. V srpnu 2010 byl pak počet MA nejvyšší, a to 189 (Hlaváček, 2011). Mapu rozmístění MA v České republice (stav ke dni 03.04.2013) ukazuje obrázek 3.

V současnosti se v *České republice* nachází **145 MA** (stav ke dni 02.04.2014) jak je uvedeno v tabulce 6, která porovnává počet registrovaných subjektů v jednotlivých krajích České republiky pro prodej mléka: mléčné automaty vs. přímý prodej mléka ze dvora. Největší zastoupení automatů má Moravskoslezský kraj (23), na druhém místě je Jihomoravský (19) a poté kraj Zlínský (18). Přímý prodej ze dvora je nejvíce zastoupen v kraji Vysočina, pak v Královéhradeckém kraji a v kraji Středočeském (SVS ČR, 2014).

Obrázek 3: Mapa rozmístění mléčných automatů v České republice, stav ke dni 03.04.2013



(Zdroj: SVS ČR, 2014)

Tabulka 6: Počet registrovaných subjektů v jednotlivých krajích České republiky pro prodej mléka: mléčné automaty vs. přímý prodej mléka ze dvora

Kraje	Mléčné automaty	Přímý prodej ze dvora	Celkem
Praha	2	0	2
Středočeský	7	36	43
Jihočeský	15	29	44
Plzeňský	9	23	32
Karlovarský	0	13	13
Ústecký	5	19	24
Liberecký	3	18	21
Královéhradecký	8	40	48
Pardubický	8	9	17
Vysočina	11	43	54
Jihomoravský	19	25	44
Olomoucký	17	22	39
Zlínský	18	12	30
Moravskoslezský	23	28	51
<b>Celkem</b>	<b>145</b>	<b>317</b>	<b>462</b>

(Zdroj: SVS ČR, 2014)

Automaty pro prodej mléka se rozdělují do jednotlivých modelů (typů): model „Li“, model „L“, model „XL“. Model „Li“ a model „L“ jsou jednotankové modely, s tankem o objemu 200 litrů a s automatem na prodej 100 lahví. Liší se od sebe jen způsobem použití. Model „Li“ je určen jen pro vnitřní použití (viz příloha) a model „L“ pro vnější i vnitřní použití. Model „XL“ je dvoutankový model, každý tank o objemu 200 litrů. Model se nachází v dřevěném či kovovém domečku, kde je zabudován i automat na prodej 140 lahví (viz příloha) (Daniel, 2011).

Mléko pro automat se přečerpá do speciálního nerezového tanku (viz obrázek 4) o objemu několika set litrů, naloží se do auta a doveze k automatu. Tank je vyroben z vysoce kvalitní nerezové, elektrolyticky leštěné oceli a splňuje veškeré hygienické normy (Vaněk et al., 2010). Tank je vlastně srdcem MA, jelikož obsahuje míchadlo s motorem, dávkovací čerpadlo, teplotní a hloubkovou sondu, výdejní hadičku s nerezovou koncovkou a potřebnými ventily. Veškeré mléko je tak neustále součástí tanku a s automatem nepřichází vůbec do styku.

Mléčný automat kontroluje a eviduje teplotu mléka v tanku, množství mléka, teplotu v chlazeném prostoru a otevření automatu. Teplota mléka se většinou pohybuje od 0,5 °C do 4 °C a nesmí překročit 8 °C (Vaněk et al., 2010). V případě, že by teplota přesáhla 8 °C nebo nastala nějaká porucha, automat se okamžitě zablokuje a obsluha automatu je o této

skutečnosti formou SMS zprávy ihned informována. Způsob této komunikace je zajišťován pomocí zařízení GSM modul. Automat také vyše zprávu, v případě poklesu mléka pod určitý objem, většinou se jedná o méně než 10 l mléka (Rychtařík, 2012).

Obrázek 4: Tank na mléko



(Zdroj: Toko Agri, 2013)

V MA je tank s mlékem uložen do chladicího boxu, kde je udržována teplota okolo 4 °C. Mléko může být z MA prodáváno po dobu **maximálně 24 hodin**, potom se musí zásobní tank s mlékem vyměnit za nový. Pokud není mléko prodáno do 24 hodin, MA se automaticky zablokuje a do provozu je uveden až po důkladném vyčištění a naplnění čerstvým produktem (Junk, 2008). Sanitace tanků se provádí po každém použití podle schváleného postupu, buď ručně nebo automaticky po napojení na systémy pro sanitaci dojícího zařízení v dojárně, jak ukazuje obrázek 5 (Vaněk et al., 2010).

Obrázek 5: Sanitace tanků



(Zdroj: Vaněk et al., 2010)

Tank v MA je přímo hadičkou spojen s výdajovým okénkem a po zaplacení požadované ceny je mléko automaticky načerpáno do skleněné či plastové láhve. Důležitá je čistota láhve a rychlé uložení láhve s mlékem do chlazeného prostoru, aby se udržela teplota okolo 4 °C.

Po každém výdeji mléka je okénko automaticky očištěno horkou párou a trubička, která vydává mléko, se schová do chlazeného prostoru. Automat kontroluje teplotu a její nadlimitní změnu hlásí na telefon obsluhy nebo samočinně zablokuje výdej mléka (Vaněk et al., 2010).

Nejenom dodržení teplotního řetězce, ale i důsledná a předpisová sanitace tanků a celého MA je podmínkou pro jeho provozování (Toko Agri, 2013).

Průměrný prodej mléka z jednoho automatu za den se pohybuje v České republice na úrovni 110 litrů, na Slovensku 130 až 140 litrů mléka a v Polsku ještě zhruba o 30 – 50 litrů více oproti Slovensku. Lapisz (2013) dále uvádí, že automaty v ČR na venkově jsou v prodeji úspěšnější než automaty umístěné ve městech.

Při prodeji syrového mléka je požadováno, aby prodejní místo bylo zřetelně označeno poznámkou, že má být mléko před spotřebou převařeno dle Vyhlášky Mze č. 289/2008 Sb. Při konzumaci syrového mléka bez další tepelné úpravy vzniká pro člověka nebezpečí onemocnění chorobami, jejichž zárodky se mohou v mléce vyskytovat (Hlaváček, 2011). V syrovém mléce se mohou vyskytovat též látky anorganického a organického původu, které nejsou přirozenou složkou suroviny. Příčinou jejich výskytů může být přímá či nepřímá kontaminace ze vzduchu, půdy, vody, krmiva, ze zařízení, používání nevhodných přípravků nebo kontaminace v průběhu získávání, zpracování či skladování (Samková, 2010).

### **3. MATERIÁL A METODIKA**

#### **3.1. CÍL PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo sledování dynamiky celkového počtu mikroorganismů syrového kravského mléka v závislosti na vybraných faktorech.

#### **3.2. METODIKA ODBĚRU VZORKŮ**

Odběr vzorků syrového mléka z MA v Jihočeském, Západočeském a Severomoravském kraji byl prováděn podle Vyhlášky č. 211/2004 Sb. celkem ve třech obdobích.

##### ***Období 1: březen 2010 – listopad 2010, Severomoravský kraj***

Vzorky byly odebrány za období sedmi měsíců od března 2010 do listopadu 2010 z různých MA (viz tabulka 7). Mléko bylo odebíráno do sterilních vzorkovnic a ihned po odběru zpracováno v laboratoři Výzkumného ústavu pro chov skotu v Rapotíně.

##### ***Období 2: červen 2011 – listopad 2012, Jihočeský, Západočeský kraj***

Odběr vzorků probíhal nepravidelně od června 2011 do listopadu 2012 (viz tabulka 7). Mléko o objemu 0,5 l bylo odebíráno z MA do sterilních vzorkovnic a ihned po odběru bylo v chladicích boxech převezeno do laboratoře Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kde bylo zpracováno. Vzorky ke stanovení chemického složení byly převezeny do Centrální laboratoře Madeta a.s. v Českých Budějovicích.

##### ***Období 3: květen 2012 – květen 2013, Severomoravský kraj***

Vzorky byly odebrány v průběhu od května 2012 do května 2013, vždy jeden vzorek na farmě, jeden vzorek v příslušném MA (viz tabulka 7). Mléko bylo odebíráno do sterilních vzorkovnic a ihned po odběru zpracováno v laboratoři Výzkumného ústavu pro chov skotu v Rapotíně.

Tabulka 7: Celkový počet vzorků odebraných ve sledovaných mléčných automatech v rámci jednotlivých období

Období	Počet mléčných automatů	Počet vzorků
1	8	42
2	7	37
3	1	21

Období 1: březen 2010 – listopad 2010, Severomoravský kraj, období 2: červen 2011 – listopad 2012, Jihočeský, Západočeský kraj, období 3: květen 2012 – květen 2013, Severomoravský kraj

### 3.3. ANALÝZA VZORKŮ

Vzorky mléka pro stanovení chemického složení a PSB byly analyzovány v Centrální laboratoři Madeta a.s. v Českých Budějovicích (období 2) a v laboratoři Výzkumného ústavu pro chovu skotu v Rapotíně (období 1 a 3).

Analýza mikrobiologických ukazatelů byla provedena v laboratoři Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (období 2) a v laboratoři Výzkumného ústavu pro chovu skotu v Rapotíně (období 1 a 3).

Sledované ukazatele jakosti včetně počtu analyzovaných vzorků v jednotlivých obdobích odběru jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Počty analyzovaných vzorků v rámci sledovaných ukazatelů jakosti mléka

Ukazatele	Jednotky	Počty analyzovaných vzorků			Celkem
		období			
		1	2	3	
<b>Chemické složení</b>					
<b>TUK</b>	%	45	36	0	81
<b>TUKUPROSTÁ SUŠINA</b>	%	45	36	0	81
<b>BÍLKOVINY</b>	%	45	36	0	81
<b>LAKTÓZA</b>	%	45	36	0	81
<b>Hygienické a mikrobiologické ukazatele</b>					
<b>PSB</b>	tis./ml	45	36	0	81
<b>CPM</b>	tis./ml *	42	37	21	100
<b>ENTEROKOKY</b>	tis./ml *	45	6	22	73
<b>TRM</b>	tis./ml *	0	0	22	22
<b>CPP</b>	tis./ml *	0	3	22	25
<b>KB</b>	tis./ml *	0	3	22	25

PSB- počet somatických buněk, CPM- celkový počet mikroorganismů, TRM-termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- kolidformní bakterie

\* výsledky vyjádřeny rovněž v log



### ***Stanovení chemického složení a PSB***

Obsahy tuku, tukuprosté sušiny, bílkovin a laktózy byly stanoveny infračerveným absorpčním analyzátozem Milcoscan (Foss, Hillerød, Dánsko) dle ČSN 570536/1999.

Počty somatických buněk byly stanoveny fluoro-opto-elektronickým analyzátozem Fossomatic (Foss, Hillerød, Dánsko) dle ČSN EN ISO 13366-3/1998.

### ***Stanovení mikrobiologických ukazatelů***

Hodnoty CPM byly stanoveny podle normy ČSN EN ISO 4833, pro kultivaci byla použita kultivační půda „GTK M“ (Milcom Tábor) a inkubace proběhla při teplotě 30°C po dobu 72 hodin.

Hodnoty TRM byly stanoveny podle normy ČSN 57 0101, a pro kultivaci byla rovněž použita kultivační půda „GTK M“ (Milcom Tábor). Vzorky mléka byly před samotnou analýzou tepelně inaktivovány ve vodní lázni při teplotě 85 °C po dobu 10 minut a následně kultivovány při teplotě 30 °C/72 hodin.

Hodnoty KB byly stanoveny podle ČSN ISO 4832 s následnou konfirmací a identifikací pomocí ENTEROtestu a vyhodnocovacího programu TNW7.5 (Erba Lachema) a BIOLOG III (Biotech). Byla použita kultivační půda VČŽL (MILCOM, Tábor, ČR) a vzorek mléka byl kultivován při 36 °C po dobu 24 hodin.

Výchozí normou pro stanovení počtu enterokoků byla ČSN 57 0101. Vzorek mléka nebo jeho příslušné ředění o objemu 0,1 ml byl očkovan na povrch Slantetz-Bartley Agar (HiMedia) a důkladně rozetřen skleněnou hokejkou. Inkubace proběhla při teplotě 37 °C/48 hodin. Po ukončení se hodnotily typicky červeně zbarvené kolonie.

Hodnoty CPP byly stanoveny dle normy ČSN ISO 8552. Pro kultivaci byl použit GTK M Agar (Milcom Tábor), vzorky mléka byly inkubovány při teplotě 21 °C/25 hodin.

### 3.4. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Pro statistické výpočty a analýzy byla využita nabídka programu StatisticaCz 6.1 (StatSoft s.r.o.) a u souboru byly vyhodnoceny předpoklady pro užití parametrických metod. U hygienických a mikrobiologických ukazatelů byly počty mikroorganismů vyjádřeny rovněž v logaritmických jednotkách.

Ke statistickému vyhodnocení byla využita jednofaktorová analýza rozptylu, jako *nezávislé proměnné (faktory)* zvoleny:

- *období:* 1 (březen 2010 – listopad 2010), 2 (červen 2011 – listopad 2012), 3 (květen 2012 – květen 2013)
- *měsíce:* 2 - 11
- *roční období:* léto (květen až říjen), zima (listopad až duben)
- *doba odběru:* 1 (0. – 8. hod. po naplnění MA), 2 (9. – 16. hod. po naplnění MA), 3 (17. – 24. hod. po naplnění MA)
- *místo odběru:* farma vs. MA

*Závislé proměnné* byly jednotlivé ukazatele jakosti mléka – viz tabulka 8 ( kapitola 3.3.)

## **4. VÝSLEDKY A DISKUSE**

Jakost mléka v širším pohledu není jen chemické složení mléka (obsah tuku, bílkovin, laktózy a minerálních látek) či komplex jeho vlastností (smyslových, fyzikálních, technologických), ale především mikrobiologická a hygienická kvalita (CPM, PSB, RIL) zajišťující zdravotní nezávadnost (Samková et al., 2009).

Sledováním jednotlivých ukazatelů kvality mléka i kontrola dodržování limitů daných legislativními předpisy je zajištěna bezpečnost mléka. I přes tuto kontrolu je možné, že se v mléce mohou vyskytnout původci vyvolávající některá onemocnění např. listeriózu, salmonelózu nebo alimentární intoxikace (Karpíšková et al., 2011).

### **4.1. ZÁKLADNÍ STATISTICKÉ CHARAKTERISTIKY JAKOSTI MLÉKA VE SLEDOVANÝCH OBDOBÍCH**

V tabulce 9 je uveden základní přehled jakosti syrového mléka včetně mikrobiologických ukazatelů. Většina průměrných hodnot jakostních ukazatelů vyhovuje evropským legislativním předpisům i požadavkům stanovených ČSN 57 0529. Tyto ukazatele vyhovují i limitům publikovaných v literární rešerši. Např. zjištěný průměrný obsah bílkovin ve sledovaném souboru byl 3,3 %, tedy o 0,1 % nižší než obsah bílkovin uváděný Navrátilovou et al. (2012). Výsledky jsou rovněž shodné s průměrnými hodnotami udávanými ČMSCH (2013).

Přestože problematika ukazatelů chemického složení mléka nebyla hlavní součástí práce, je vzhledem k výsledkům ještě nutné zmínit hodnoty zjištěné u obsahu tuku. Zjištěná minimální hodnota obsahu tuku (1,74 %) ve sledovaném souboru prakticky odpovídá odtučněnému mléku. Jednou z příčin této nízké hodnoty by mohlo být nedostatečné promíchání mléka v tanku umístěném v MA, neboť jak je známo, tuk má nižší měrnou hmotnost a po určité době se hromadí v horní vrstvě mléka. Z praktického hlediska je tedy možné, že si některý ze zákazníků koupil syrové mléko z mléčného automatu skoro odtučněné a některý si koupil, za stejnou cenu, mléko plnotučné.

Hodnota tukuprosté sušiny ve sledovaném souboru byla 8,8 %, což odpovídá průměrným hodnotám udávaným ČMSCH (2013).

PSB a CPM jsou považovány za ukazatele hygienické a mikrobiologické jakosti.

PSB je také technologickým ukazatelem a zdravotním ukazatelem vemene, neboť se zvyšuje s výskytem a vzrůstem intenzity především infekčního zánětlivého procesu (mastitidy) (Doležal et al., 2000). V mléce z neinfikované mléčné žlázy od zdravé dojnice je PSB do 100 tis./ml. I hodnoty PSB do 200 tis./ml charakterizují zdraví stáda jako velmi uspokojivé. Pokud se hodnota bazénového PSB dostane do úrovně mezi 200 až 300 tis./ml, lze již zdraví stáda považovat za ohrožené. V souvislosti se zhoršováním zdravotního stavu dojnic, resp. se zvýšeným výskytem mastitid, může docházet k rapidnímu nárůstu PSB až na několikamilionové hodnoty (Seydlová, 2012). Z celkového počtu analyzovaných vzorků byly zaznamenány průměrné hodnoty PSB 233 tis./ml, daná hodnota je ještě nižší oproti ČMSCH (2013), kdy průměrná hodnota byla uváděna 254 tis./ml. Přestože žádná z uváděných hodnot nedosáhla limitu pro zdravé stádo, limity dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 (PSB < 400 tis./ml), byly splněny.

CPM v mléce vypovídá o úrovni hygieny v prvovýrobě, přičemž dodržováním správných hygienických zásad lze do značné míry výskytu i pomnožení mikroorganismů v mléce zabránit (Kralíčková a Kuchtík, 2011). Zdrojem CPM v mléce mohou být všechny mikrobiologicky kontaminované povrchy, které během dojení a skladování přijdou do styku s mlékem (Doležal et al., 2000). V naší studii byly zjištěny průměrné hodnoty CPM 34 tis./ml, ovšem dle ČMSCH (2013) byly hodnoty ve výši 44,5 tis./ml.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 vymezuje podmínky prodeje syrového mléka a určuje limit pro CPM < 100 tis./ml. S porovnáním s geometrickým průměrem byly zjištěny hodnoty 14 tis./ml, což odpovídá velmi dobré kvalitě mléka.

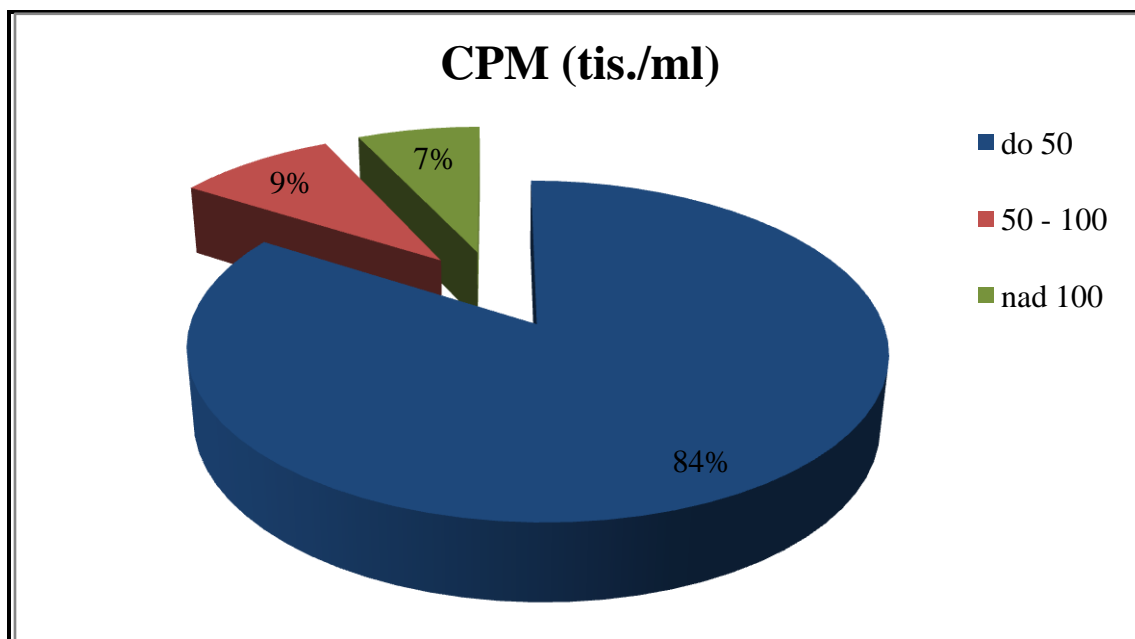
Procento vzorků překračujících požadovaný limit je patrné i z grafu 6 týkajícího se rozdělení četností CPM. Z celkového souboru 100 vzorků nevyhovělo 7 vzorků (7%). Jakostní třídě Q, pro níž je stanoven limit CPM do 50 tis./ml, odpovídalo 84 vzorků (84 %). Do I.jakostní třídy bylo na základě zjištěných hodnot CPM zařazeno 9 vzorků (9 %).

Tabulka 9: Základní přehled jakosti syrového mléka včetně mikrobiologických ukazatelů

UKAZATELE	n	$\bar{x}$	geometr. průměr	Sx	min.	max	x <sub>25</sub>	x <sub>75</sub>	koef. prom.
<b>CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ (%)</b>									
<b>TUK</b>	81	3,70	3,56	0,55	1,74	4,40	3,47	4,14	14,78
<b>TPS</b>	81	8,75	8,75	0,17	8,37	9,10	8,63	8,91	1,90
<b>BÍLKOVINY</b>	81	3,26	3,25	0,17	2,84	3,50	3,16	3,41	5,15
<b>LAKTÓZA</b>	81	4,86	4,86	0,09	4,39	5,10	4,82	4,90	1,75
<b>HYGIENICKÉ A MIKROBIOLOGICKÉ (tis./ml)</b>									
<b>PSB</b>	81	233	197	102	7	481	159	295	44,88
<b>CPM</b>	100	34	14	67	1,6	442	6	31	0,19
<b>ENTEROKOKY</b>	73	0,58	-	1,62	0	8	0,05	0,28	0,28
<b>TRM</b>	22	0,34	0,24	0,3	0,01	0,1	0,01	0,05	0,08
<b>CPP</b>	25	18	2,6	29	0,03	100	0,4	21	0,16
<b>KB</b>	25	0,70	0,1	1,5	0,001	6	0,30	0,28	0,20

TPS- tukuprostá sušina, PSB- počet somatických buněk, CPM- celkový počet mikroorganismů, TRM- termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- koliformní bakterie

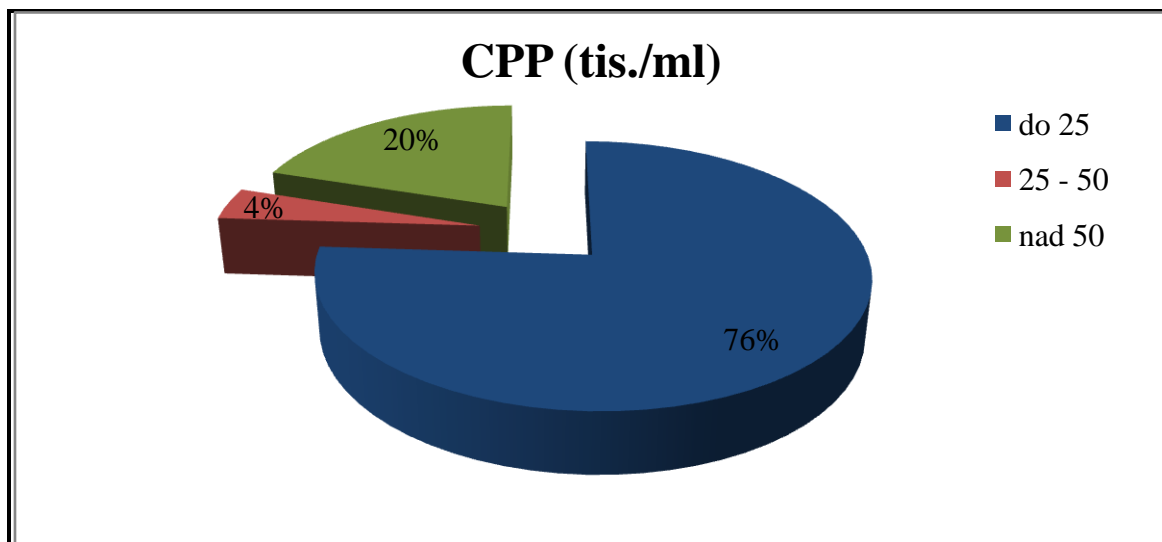
Graf 6: Rozdělení četnosti celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml)



CPM je představován zejména psychrotrofními mikroorganismy (CPP). Jejich specifickým je pomnožování i za chladničkových teplot, i když optimální teplota jejich růstu je vyšší. Počty do 10 tis./ml mléka lze hodnotit jako dobré. (Hanuš et al., 2012). Z hlediska kontaminace mléka je u psychrotrofních mikroorganismů a podobně též u termorezistentních velmi důležité zabránit jejich průniku z půdy přes krmiva a výkaly do mléka (Hanuš et al., 2012).

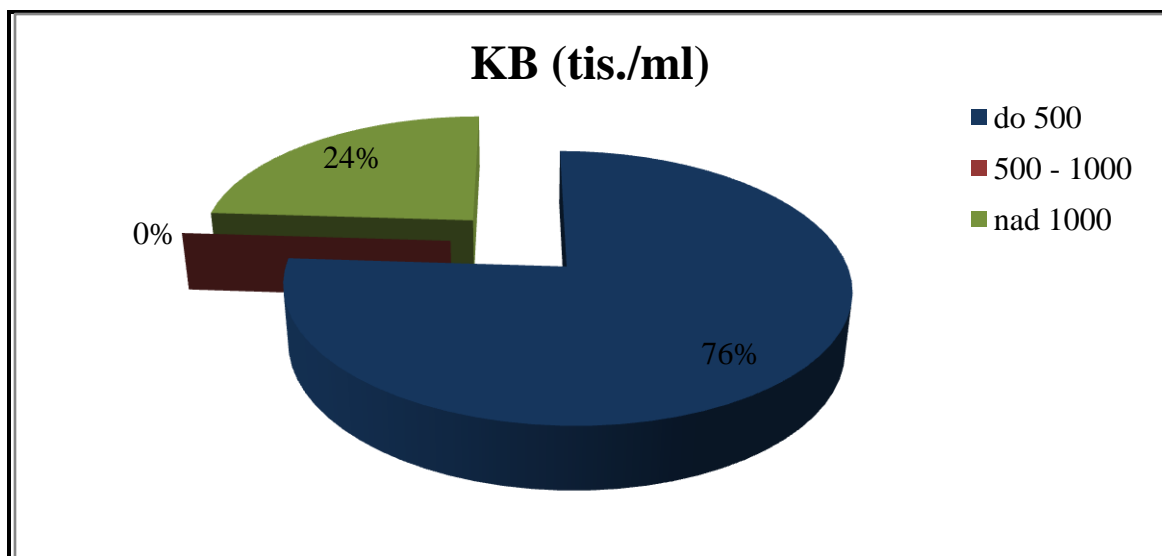
Dle ČSN 57 0529 je limit daný pro CPP < 50 tis./ml, z grafu 7, který rozděluje četnosti CPP (tis./ml) vyplývá, že z celkového souboru 25 vzorků nevyhovělo 20 % (5 vzorků). Intervalu od 25 do 50 tis./ml odpovídá 1 vzorek (4 %) a 19 vzorků (76 %) odpovídá do 25 tis./ml mléka.

Graf 7: Rozdělení četnosti celkového počtu psychrotrofních mikroorganismů CPP (tis./ml)



Koliformní bakterie (KB) hrají významnou roli jako indikátory úrovně hygieny získávání mléka a jeho případné kontaminace (Doležal et al., 2000). Dle ČSN 57 0529 musí splňovat limit < 1 tis./ml. Limitní hodnotě (< 1 tis./ml) nevyhovělo 6 vzorků (24 %) z celkem 25 vzorků. V intervalu do 500 KB v ml mléka bylo zjištěno 19 (76 %) vyšetřovaných vzorků (graf 8). Z uvedených výsledků vyplývá, že kontrole hygieny získávání mléka by měla být nadále věnována pozornost.

Graf 8: Rozdělení četnosti koliformních bakterií KB (tis./ml)



## **4.2. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE**

Mléko přítomné v parenchymu mléčné žlázy je u zdravých dojnic prakticky sterilní. Čerstvé nadojené mléko však sterilní není, ale vždy obsahuje určité množství mikroorganismů, proto je třeba dávat důslednou kontrolu na hygienu získávání mléka (Wiking et al., 2002). Dodržováním hygienických zásad lze do značné míry výskytu i pomnožení mikroorganismů v mléce zabránit (Cempírková et al., 2012). Množství mikroorganismů je mimo jiné ovlivněno dobou uplynutou po nadojení či teplotou skladování mléka. Z faktorů, které ovlivňují mikrobiologické ukazatele mléka byly sledovány: vliv měsíce, ročního období - léto vs. zima (léto: květen až říjen, zima: listopad až duben), délky skladování mléka v automatu a místa odběru (farma vs. automat).

### **4.2.1. VLIV MĚSÍCE NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE**

Při sledování vlivu měsíce byl zjištěn největší nárůst CPM v letních měsících, protože vyšší teploty umožňují rychlé množení mikroorganismů. Nejvyšší průměrné hodnoty byly zaznamenány v měsících duben a květen (108 tis./ml) (viz graf 9) a naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny v měsících únor, březen a srpen, září (17 tis./ml), jak i vyplývá z tabulky 10, která uvádí hodnoty v logaritmech. Kopunecz (2013) zjistil největší nárůst CPM v červenci (54 tis./ml) a nejnižší hodnotu v říjnu (29 tis./ml). Vliv měsíce na vybrané doplňkové mikrobiologické ukazatele je znázorněno v grafu 10.

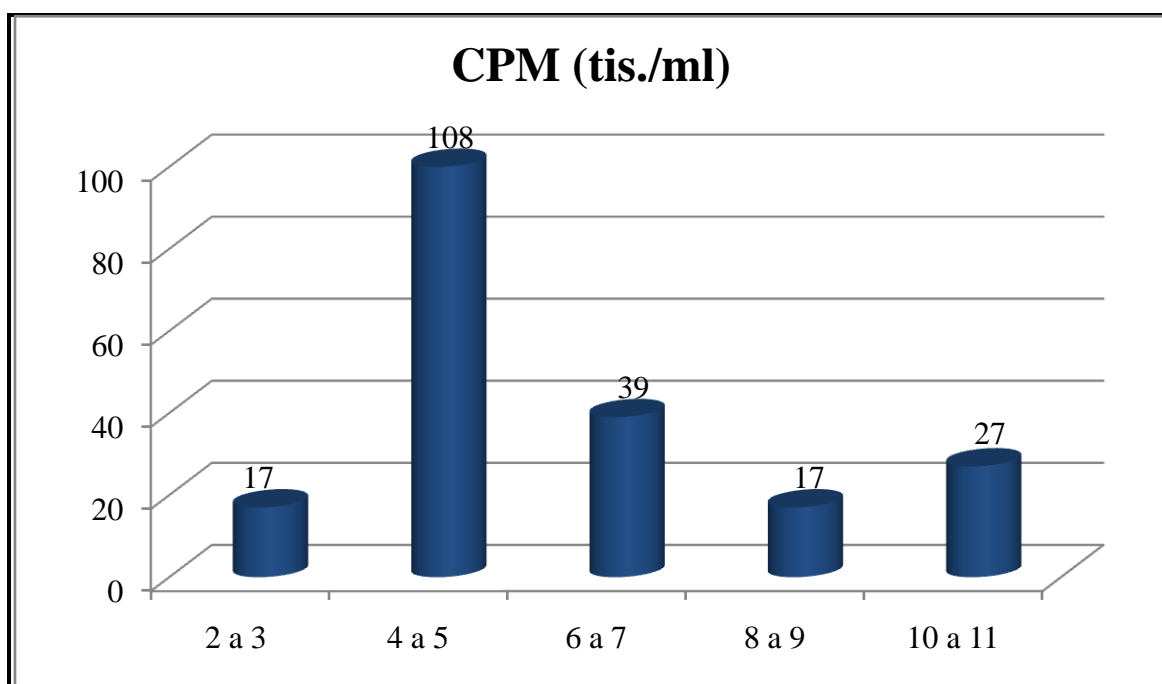
Tabulka 10: Vliv měsíce na vybrané mikrobiologické ukazatele (log)

UKAZATELE	únor, březen (n= 9)				duben, květen (n= 10)				červen, červenec (n= 24)			
	$\bar{x}$	Sx	min.	max.	$\bar{x}$	Sx	min.	max.	$\bar{x}$	Sx	min.	max.
CPM	3,96	0,54	3,20	4,74	4,34	0,87	3,30	5,65	4,27	0,56	3,48	5,27
ENTEROKOKY	1,86	0,67	1,00	2,80	1,69	0,80	0	2,620	1,65	1,00	1,00	2,79
TRM	1,15	0,21	1,00	1,30	1,65	0,31	1,30	2,00	1,36	0,43	1,00	1,85
CPP	1,63	0,21	1,48	1,78	4,13	1,17	2,48	5,00	2,73	0,19	2,60	3,00
KB	1,59	0,16	1,48	1,70	1,87	0,73	1,30	3,34	1,12	0,82	0	1,78
	srpen, září (n= 27)				říjen, listopad (n=30)				P			
CPM	4,10	0,33	3,53	4,80	4,11	0,53	3,30	5,18	0,3816			
ENTEROKOKY	2,44	0,75	1,30	3,90	2,21	0,76	00	3,90	0,0565			
TRM	1,18	0,28	1,00	1,60	1,41	0,47	1,00	1,85	0,2301			
CPP	3,79	0,73	2,85	4,72	3,38	0,70	2,48	4,32	0,0067			
KB	2,21	0,68	1,49	3,04	2,55	1,06	1,18	3,78	0,1115			

CPM- celkový počet mikroorganismů, TRM- termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- koliformní bakterie

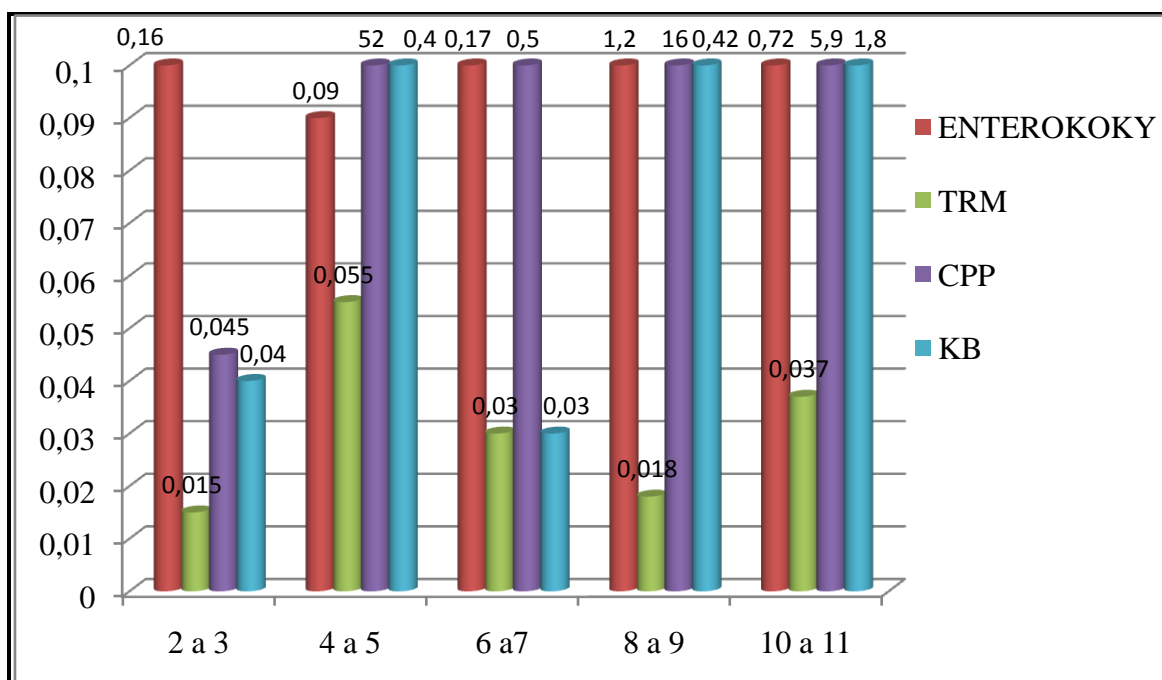


Graf 9: Vliv měsíce na celkový počet mikroorganismů CPM (tis./ml)



2 a 3- únor a březen, 4 a 5- duben, květen, 6 a 7- červen, červenec, 8 a 9- srpen, září, 10 a 11- říjen, listopad

Graf 10: Porovnání vlivu měsíce na vybrané doplňkové mikrobiologické ukazatele (tis./ml)



2 a 3- únor a březen, 4 a 5- duben, květen, 6 a 7- červen, červenec, 8 a 9- srpen, září, 10 a 11- říjen, listopad, TRM- termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- koliformní bakterie

## 4.2.2. VLIV ROČNÍHO OBDOBÍ NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE

Při porovnání vlivu období na CPM byla zjištěna nejvyšší hodnota v létě (květen až říjen) a to 38 tis./ml. a naopak nejnižší hodnota byla v zimě (listopad až duben) 23 tis./ml, jak i dále vyplývá z tabulky 11, kde je porovnání období na vybrané mikrobiologické ukazatele v logaritmech. Vyšší teploty umožňují rychlé množení mikroorganismů, proto je třeba dávat velký důraz na rychlost zchlazení mléka na požadovanou teplotu po nadojení a na způsob skladování mléka.

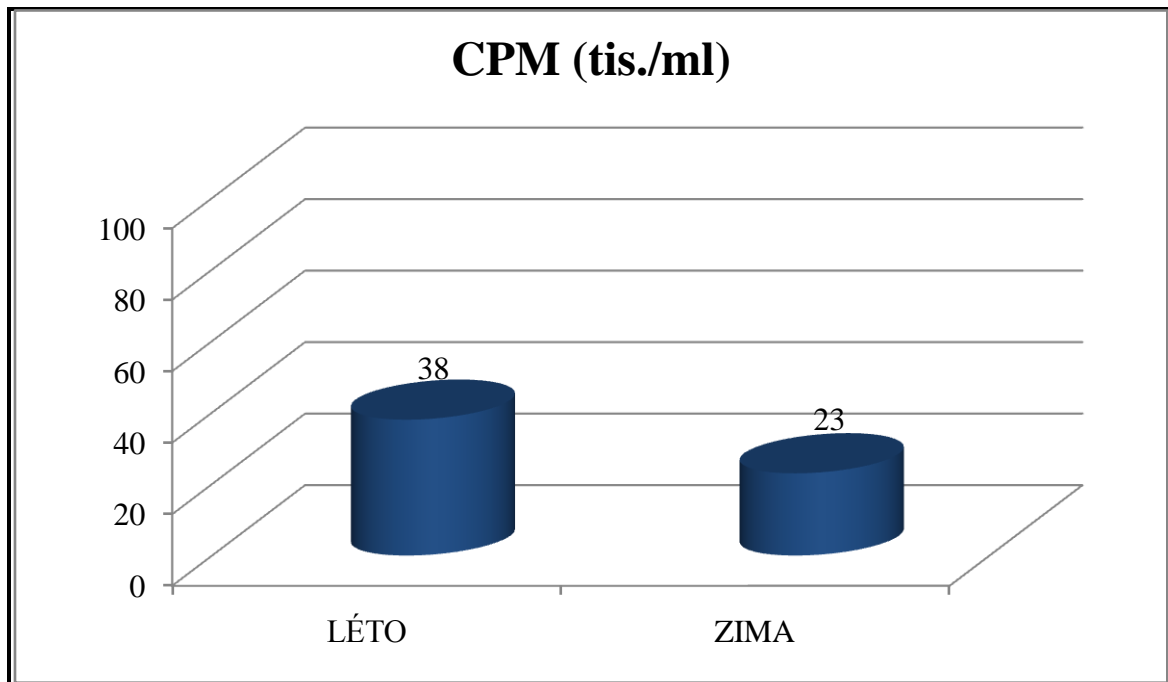
Zvýšení CPM mohlo být zapříčiněno taktéž dlouhou dobou přepravy od odebrání vzorku syrového mléka z automatu až do vyhodnocení jakostních a mikrobiologických ukazatelů. Hodnoty CPM mezi letním a zimním obdobím uvádí graf 11 a graf 12 znázorňuje vliv období na vybrané doplňkové ukazatele.

Tabulka 11: Vliv období na vybrané mikrobiologické ukazatele (log)

UKAZATELE	Léto (n= 43)		Zima (n= 62)		P
	$\bar{x}$	Sx	$\bar{x}$	Sx	
CPM	4,17	0,55	4,09	0,51	0,5077
ENTEROKOKY	2,18	0,87	1,85	0,70	0,1339
TRM	1,38	0,42	1,37	0,25	0,9270
CPP	3,48	0,86	3,29	1,30	0,6648
KB	1,76	0,75	2,42	1,04	0,0806

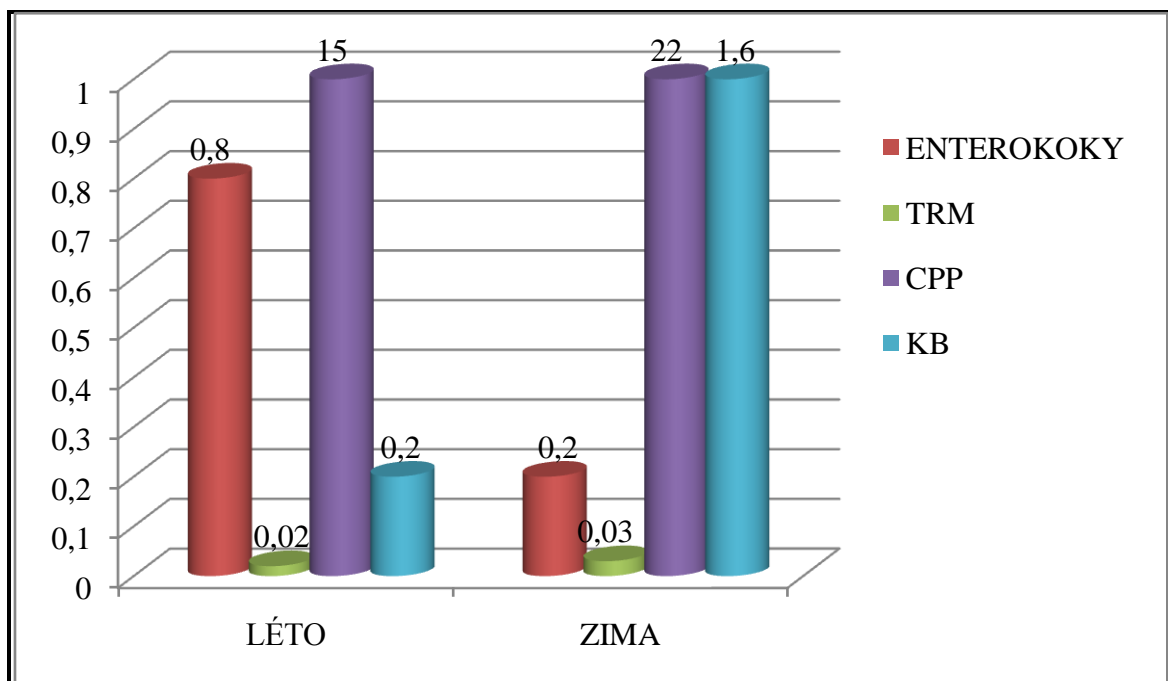
léto- květen až říjen, zima-listopad až duben, CPM- celkový počet mikroorganismů, TRM- termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- koliformní bakterie

Graf 11: Porovnávání celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml) mezi letním a zimním obdobím



léto- květen až říjen , zima- listopad až duben

Graf 12: Vliv ročního období na vybrané doplňkové ukazatele (tis./ml)



léto- květen až říjen, zima-listopad až duben, TRM- termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- koliformní bakterie

### 4.2.3. VLIV MÍSTA ODBĚRU NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE

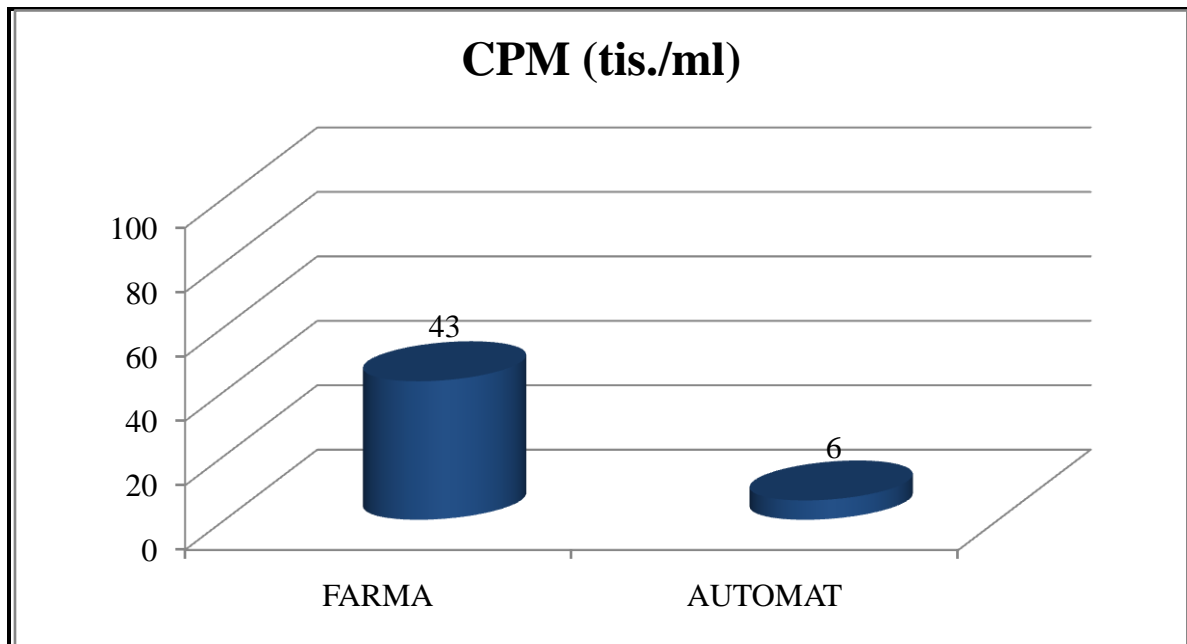
Průměrné hodnoty CPM z bazénových vzorků mléka odebraných na farmě byly 43 tis./ml a z MA 6 tis./ml (viz graf 13). Tento velký rozdíl mohl nastat důslednou kontrolou chlazení mléka při převozu z farmy do MA, či po následném zchlazení mléka v MA a udržení jeho stálé teploty v nižších hodnotách (od 0,5 do 1 °C), které brání množení mikroorganismů. Tento rozdíl je patrný i z tabulky 12, která porovnává vliv místa odběru na vybrané mikrobiologické ukazatele v logaritmech. V grafu 14, který porovnává vliv místa odběru na vybrané doplňkové ukazatele, vyplývají největší rozdíly v CPP a KB. Hodnoty CPP vzorků odebraných na farmě byly 8,5 tis./ml a v automatu 29 tis./ml., u KB byly hodnoty vzorků odebraných na farmě 0,2 tis./ml a z automatu 0,4 tis./ml. Rozdíl hodnot u CPP a KB mohl nastat nízkou úrovní hygieny při plnění mléka do mléčného automatu.

Tabulka 12: Vliv místa odběru na vybrané mikrobiologické ukazatele (log)

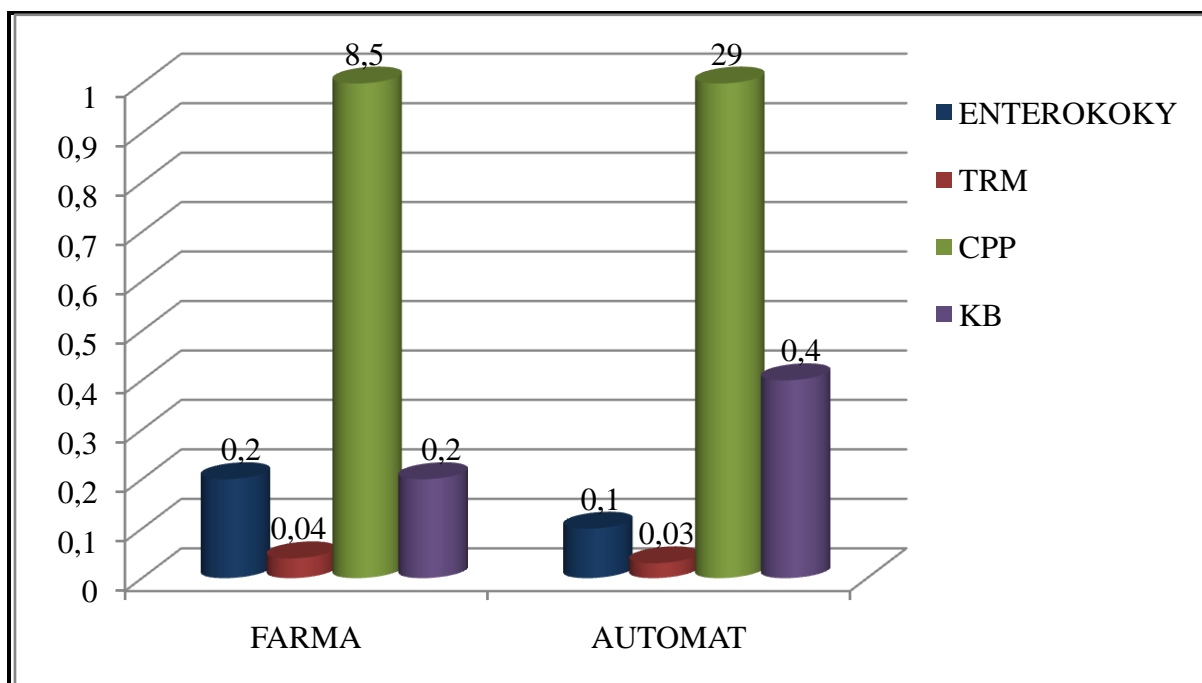
UKAZATELE	BAZÉNOVÝ VZOREK FARMA (n= 9)		BAZÉNOVÝ VZOREK AUTOMAT (n= 9)		P
	$\bar{x}$	Sx	$\bar{x}$	Sx	
CPM	3,67	0,68	3,71	0,28	0,8634
ENTEROKOKY	1,56	0,97	1,56	0,89	0,9840
TRM	1,41	0,41	1,35	0,35	0,7004
CPP	3,05	0,90	3,69	1,14	0,1600
KB	1,63	0,73	1,95	0,73	0,3134

CPM- celkový počet mikroorganismů, TRM- termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- koliformní bakterie

Graf 13: Porovnávání celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml) při odběru na farmě a z automatu



Graf 14: Porovnání vybraných doplňkových ukazatelů (tis./ml) při odběru na farmě a z automatu



TRM- termorezistentní mikroorganismy, CPP- celkový počet psychrotrofních mikroorganismů, KB- koliformní bakterie

#### 4.2.4. VLIV DÉLKY SKLADOVÁNÍ NA VYBRANÉ MIKROBIOLOGICKÉ UKAZATELE

Byl sledován vliv průběhu skladování mléka v MA na CPM a ostatní mikrobiologické ukazatele. Vzorky byly odebírány ve třech časech od naplnění MA – v prvních osmi hodinách, potom mezi 9. - 16.hod po naplnění a mezi 17. - 24. hod. Po uplynutí 24 hod. se musí MA vyprázdnit a naplnit novým syrovým mlékem.

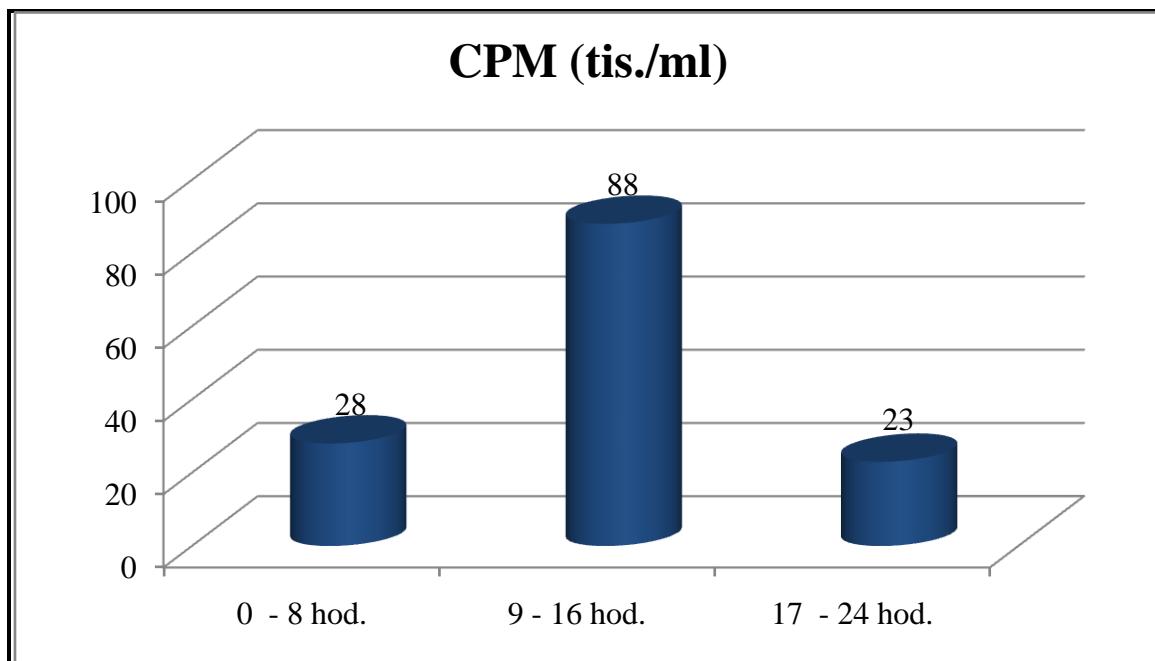
Průměrné hodnoty CPM ve vzorcích mléka odebraných v prvních osmi hodinách po naplnění byly 28 tis./ml, ve vzorcích odebraných v čase 9. - 16. hodin došlo k vzestupu na 88 tis./ml. a ve vzorcích odebraných v čase 17. - 24. hodin byly opět nízké 23 tis./ml. Tabulka 13 ukazuje vliv délky skladování v automatech na celkový počet mikroorganismů v logaritmech. V době od 9. do 16.hod byl zaznamenán mírný nárůst hodnot CPM (viz graf 15), což mohlo být způsobeno dobou před sepnutím chladicí techniky v mléčném automatu

Tabulka 13: Vliv délky skladování mléka v automatech na celkový počet mikroorganismů CPM (log)

UKAZATEL	0 - 8 hod. (n=14)				9 - 16 hod. (n= 7)				17 - 24 hod. (n= 6)				P
	$\bar{x}$	Sx	min.	max.	$\bar{x}$	Sx	min.	max.	$\bar{x}$	Sx	min.	max.	
CPM	4,32 <sup>a</sup>	0,36	3,61	4,88	4,82 <sup>b</sup>	0,42	4,07	5,27	4,27 <sup>a</sup>	0,27	4,04	4,80	0,0131

<sup>a,b</sup>... přeměny s odlišným horním indexem se statisticky významně liší na hladině  $p < 0,05$

Graf 15: Porovnání celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml) při různé délce skladování



## 5. ZÁVĚR

Hodnota celkového počtu mikroorganismů charakterizuje celkovou hygienicko-sanitační úroveň získávání mléka, proto je tento ukazatel jeden z hlavních jakostních ukazatelů mléka. Zdrojem mikroorganismů v mléce mohou být všechny mikrobiologicky kontaminované povrchy, které během dojení a skladování přijdou do styku s mlékem. Z celkového počtu (n=100) analyzovaných vzorků nevyhovělo legislativnímu limitu 7 % vzorků, z čehož vyplývá, že nejen kontrole kvality mléka z mléčných automatů by měla být nadále věnována velká pozornost, ale i hygieně při jeho získávání, ošetřování a skladování v prvovýrobě.

K množení mikroorganismů přispívá i teplé období. V tomto ohledu je tedy nutné klást velký důraz na rychlé zchlazení mléka na požadovanou teplotu a dodržovat podmínky chladírenského řetězce nejen výrobci (farmáři) a provozovateli mléčných automatů, ale vzhledem k charakteru prodeje také spotřebiteli.

Při vyhodnocování vzorků odebraných z farmy byly průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů vyšší (43 tis./ml) oproti vzorkům odebraných z mléčných automatů (6 tis./ml). Vyšší hodnoty u vzorků mléka z farmy mohly být zapříčiněny nízkou úrovní hygieny získávání mléka a jeho následnou kontaminací. Naopak průměrné výsledky ze vzorků odebraných z automatů byly více než výborné, což dokazuje důslednou kontrolu chlazení mléka při převozu z farmy do automatu, nebo po jeho následném zchlazení v automatu a udržení stálé teploty v nižších stupních (od 0,5 do 1 °C), které brání množení mikroorganismů.

Syrové mléko smí být v mléčném automatu skladováno maximálně 24 hodin, po uplynutí této doby musí být odebráno a nahrazeno mlékem novým.

Při sledování vlivu délky skladování na hodnoty celkových počtů mikroorganismů v mléce z mléčných automatů byly nejvyšší hodnoty (88 tis./ml) zjištěny v rozmezí mezi 9. - 16.hodinou od začátku skladování. Tato skutečnost mohla být způsobena pravděpodobně následkem doby před sepnutím chladicí techniky v mléčném automatu.

Závěrem bych chtěla zdůraznit, že syrové mléko může být zdrojem původců některých onemocnění (listerióza, kampylobakterióza a jiné alimentární nákazy) a jako takové by mělo být před konzumací vždy tepelně upraveno.



## 6. SUMMARY

The microbiological quality of raw milk from the perspective of the health of dairy products is one of the most important features. The amount of microorganisms is influenced by storage temperature and time of milk.

In the thesis was observed dynamics of total bacteria count (TBC) in raw milk depending on the selected factors (months, seasons, point of collection, the length of storage). To life of microorganisms contributes warm weather. The largest increase in TBC was observed in the months of April and May to 108 thousand /1 Ml. It is necessary to place great emphasis on rapid cooling of milk (max 150 min.) to the desired temperature (8 °C). Increase TBC could be caused by long transportation time of sampling raw milk from a milk vending machine to evaluate the quality and microbiological indicators.

In the second part of the thesis are compares the quality and microbiological characteristics of raw milk from selected milk vending machines. When evaluating the samples taken from the farm, average values of TBC were higher (43 thousand/ml) compared to samples collected from the milk vending machines (6 thousand/ml). Reason of higher values from farms could be caused by poor hygiene of the milk and his secondary contaminations. In contrast, the average results from samples taken from the milk vending machines were more than excellent. That's shows tight control of cooling milk during transportation from the farm to the milk vending machine. Next reason better results is right cooling and to maintain a constant temperature in the grades (from 0.5 to 1 °C). That's temperature, which prevents the growth of microorganisms.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Bečvář, O. (2008): Příčiny zvýšení a kontrola počtu somatických buněk, Zdraví a prevence chorob [příloha], *Náš chov* 68 (12), 55 - 58.
2. Bouška, J. (2006): Chov dojeného skotu, Praha.
3. Bradley, A. J., Geen, M. J. (2005): Use and interpretation of static cell count data in dairy cows, 27, 301 – 315.
4. Buček, P., ČMSCH, a. s. (2012): Management stád s mléčnými a kombinovanými plemeny, Vyřazování krav v kontrole užítkovosti, *Chov skotu*, 9 (3), 6 - 7.
5. Cempírková, R., Samková, E., Vyletěllová, M. (2012): Celkový počet mikroorganismů. In Samková, E. (ed.). *Mléko: produkce a kvalita*. 1. vyd., České Budějovice: JU ZF, 122-126, ISBN 978-80-7394-383-7.
6. Daniel, R. (2011): Problematika mléčných automatů, bakalářská práce, České Budějovice, ZFJU, 13.
7. Dianová, M., Ryba, Š. (2006): Sborník příspěvků z mezinárodního semináře na téma Vliv výrobních faktorů a welfare na zdraví a plodnost dojnic a kvalitu a bezpečnost mléka jako potravinové suroviny, Zdravie dojnic a kvalita mlieka z pohľadu kontroly užítkovosti a šľachtenia hovadzieho dobytku na Slovensku, Státní plemenářský ústav SR, Bratislava.
8. Doležal, O., Hanuš, O., Hlásný, J., Jílek, F., Kvapilík, J., Matouš, E., Pytloun, J. Vegricht, J., (2000): *Mléko, Dojení, Dojírny*, Praha, 28 – 60
9. Doležal, O. (2009): Kvalitní dojení souvisí i s kvalitním specializovaným poradenstvím, Faktory kvalitní produkce a zpracování mléka [příloha], *Náš chov*, 69 (4), 81 - 82.
10. Dragounová, H. (2010): Možnosti využití syrového kravského mléka i v domácích podmínkách, Techagro, nové trendy v živočišné výrobě [příloha], *Náš chov*, 70 (3), 69 - 70.
11. Elias, A. O., Cortez, A., Brandao, P. E., Silva, R. C., Langoni, H. (2012): Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks, *Research in veterinary science*, 93, 34 – 38.
12. Hanuš, O., Vyletěllová, M., Jeřábková, J. (2012): Kontrola jakosti mléka. In Samková, E. (ed.). *Mléko: produkce a kvalita*. 1. vyd., České Budějovice: JU ZF, 48 – 58, ISBN 978-80-7394-383-7.
13. Hlaváček, J. (2011): Výsledky mimořádných kontrolních akcí SVS ČR u mléčných automatů In *Produkce a zdravotní nezávadnost mléka II.*, České Budějovice, JU ZF, 68.

14. Kadlec, P. (2007): Technologie potravin II., Vysoká škola chemicko–technologická, Praha.
15. Kovařík, K. (2010): Nový přístup ke zdolávání virových infekcí respiračního traktu, Techagro 2010, Nové trendy v živočišné výrobě [příloha], *Náš chov*, 70 (3), 66 - 68.
16. Králíčková, Š., Kuchtík, J. (2011): Influence of parity and stage of lactation on somatic cell and bacteria counts in raw sheep milk, Brno.
17. Kvapilík, J. (2011): Ukazatele jakosti mléka zjištěné z bazénových vzorků v bavorských laboratořích, *Veterinářství*, 61 (6), 345 - 349.
18. Kvapilík, J., Růžička, Z., Bucek, P., ČMSCH a. s. (2013): Ročenka 2012, Chov skotu v České republice, Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2012, Praha.
19. Loučka, R. (2008): Hygienická nezávadnost krmiv, Zásady zoohygieny v chovech [příloha], *Náš chov*, 68 (6), 72 – 73.
20. Lukášová, J. (1996): Hygienicky významná mikroflóra v syrovém mléce. In Nové poznatky v technologii výroby a zpracování mléka, 29 – 30.
21. Machálek, A. (2008): Chlazení mléka na farmách - co je dobré vědět, Výroba mléka a jeho zpeněžování [příloha], *Náš chov*, 68 (5), 92 - 94.
22. Navrátilová, P. (2002): Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce, *Veterinářství*, (52) 478 - 481.
23. Navrátilová, P., Králová, M., Janštová, B., Přidalová, H., Cupáková, Š., Vorlová, L. (2012): Hygiena produkce mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
24. Olejník, P. (2008): Role dojícího zařízení v etiologii mastitid a při získávání kvalitního mléka v prvovýrobě III. část, Stavby a technologie v živočišné výrobě [příloha], *Náš chov*, 68 (9), 80 - 82.
25. Pařilová, M. (2006): Hygiena při získávání mléka, Zoohygienická opatření v chovech [příloha], *Náš chov*, 66 (6), 55 - 56, 58 - 59.
26. Roginski, H., Fuquay, J. W., Fox, P. F. (2003): Encyclopedia of Dairy Sciences, 4,1, 2095, Academic Press, USA.
27. Rychtařík, M. (2012): Legislativa a jakostní problematika prodeje mléka v mléčných automatech, bakalářská práce, Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 39.
28. Samková, E., Smetana, P., Hlaváček, J., Mrázek, J., Rozsypal, R., Pospíšil, M., Trávníček, P. (2009): *Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství*, 15 - 28 s., Olomouc, Bioinstitut.

29. Samková, E. (2010): Cizorodé látky v mléce. In produkce a zdravotní nezávadnost mléka I., České Budějovice, JU ZF, 85 s.
30. Samková, E., Cempírková, R. (2012): Získávání mléka. In Samková, E. (ed.). *Mléko: produkce a kvalita*. 1. vyd., České Budějovice: JU ZF, 48 – 58, ISBN 978-80-7394-383-7.
31. Seydlová, R. (2006): Sborník příspěvků z mezinárodního semináře na téma Vliv výrobních faktorů a welfare na zdraví a plodnost dojnic a kvalitu a bezpečnost mléka jako potravinové suroviny, Environmentální mastitidy, Praha.
32. Seydlová, R. (2012): Počet somatických buněk. In Samková, E. (ed.). *Mléko: produkce a kvalita*. 1. vyd., České Budějovice: JU ZF, 128-140, ISBN 978-80-7394-383-7.
33. Škarda, J., Škardová, O. (2000): Program péče o produkci a zdraví stáda dojnic, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Živočišná výroba, Praha, 18-33, ISB 807271-058-3.
34. Vilar, M. J., Diéguez, F. J., Yus, E., Rodriguez-Otero, J. L., Sanjuán, M. L., Varela, M. (2012): Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality, 23, 4 – 12.
35. Výmola, J. (2009): Matrace a mastitidy ve volném ustájení, *Farmář*, (1), XX.
36. Walterová, L., Falta, D., Chládek, G., Šarovská, L. (2010): Mikroklima v moderních stájích dojnic, *Farmář*, 16 (6), 26 - 28.
37. Wiking, L., Frost, M. B., Larsen, L. B., Nielsen, J. H. (2002): Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. *Milchwissenschaft*, 57, 190–194.
38. Zámstný, L. (2013): Analýza vybraných jakostních ukazatelů mléka, diplomová práce, České Budějovice, ZFJU, 30.
39. Zweifel, C., Muehlherr, J. E., Ring, M., Stephan, R. (2004): Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milkin Switzerland.

### **Internetové zdroje:**

1. Hanuš, O., Vyletělová, M. (2006): Postup při stanovení nového ukazatele mikrobiologické kvality syrového kravského mléka (MPAS) pro výrobu nových mlékárenských výrobků. [online], [cit. 2011-02-27]. Dostupné na [www: http://www.vuchs.cz/publikace/metodiky/EP\\_9058\\_UM1.pdf](http://www.vuchs.cz/publikace/metodiky/EP_9058_UM1.pdf)
2. Junk P. (2008): Mlékomaty: Právě mléko z automatu je levné a dobré [online]. [cit. 2013-11-07]. Dostupné z [www: http://www.nazeleno.cz/bio/biopotraviny/mlekomaty-prave-mleko-z-automatu-je-levne-a-dobre.aspx](http://www.nazeleno.cz/bio/biopotraviny/mlekomaty-prave-mleko-z-automatu-je-levne-a-dobre.aspx)
3. Karpíšková, R., Koláčková, I., Vyletělová, M., Janštová, B.: Studie „Mléčné automaty“ - nálezy původců alimentárních onemocnění v syrovém mléce [online]. 2011, [cit 20. 3. 2014]. Dostupné na [www: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/20\\_2011/06\\_cerven/212\\_Studie.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/20_2011/06_cerven/212_Studie.pdf)
4. Kopunecz, P. (2013): Přehledy jakosti nakupovaného mléka v roce 2012, podle analýz bazénových vzorků, Praha. [online], [cit. 2013-01-28]. Dostupné na [www: http://www.cmsch.cz/store/prehledy-jakosti-nakupovaneho-mleka-2012.pdf](http://www.cmsch.cz/store/prehledy-jakosti-nakupovaneho-mleka-2012.pdf)
5. Lapisz, B. (2013): Mlékomat v Heřmanicích: byl první a zůstal jediný, Agris, Agrární [www portál](http://www.agris.cz/potravinarstvi/pomazankove-maslo-zmeni-jmeno-asi-v-polovine-roku?id_a=178685), [online], [cit. 2014-01-03]. Dostupné na [www: http://www.agris.cz/potravinarstvi/pomazankove-maslo-zmeni-jmeno-asi-v-polovine-roku?id\\_a=178685](http://www.agris.cz/potravinarstvi/pomazankove-maslo-zmeni-jmeno-asi-v-polovine-roku?id_a=178685)
6. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. [cit. 2012-12-12]. Dostupné na [www: http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0853:2007114:C S:PDF](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0853:2007114:C S:PDF)
7. Pavlů, V. (2006): Chov mléčného skotu, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha, Ruzyně - Výzkumná stanice travních ekosystémů Liberec. [online], [cit. 2011-03-12]. Dostupné na [www: http://fle.czu.cz/~hejcman/Prednasky/Zemedenstvi9\\_mlecny\\_skot.pdf](http://fle.czu.cz/~hejcman/Prednasky/Zemedenstvi9_mlecny_skot.pdf)
8. Ryšánek, D. (2007-06): Somatické buňky v mléce. [online], [cit. 2011-12-13]. Dostupné na [www: http://www.vri.cz/userfiles/image/pracovnici/Rysanek/kapit\\_predn/Somaticke\\_bunky\\_v\\_mlece.pdf](http://www.vri.cz/userfiles/image/pracovnici/Rysanek/kapit_predn/Somaticke_bunky_v_mlece.pdf)

9. Seydlová, R. (2001): Airwashsystem, nová cesta prevence šíření mastitid. Výzkumný ústav mlékárenský Praha. [online], [cit. 2012-12-13]. Dostupné na [www: http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Airwash-system-nova-cesta-prevence-sireni-mastitid\\_s485x9699.html](http://www.naschov.cz/@AGRO/informacni-servis/Airwash-system-nova-cesta-prevence-sireni-mastitid_s485x9699.html)
10. Simonová, J. (2008-2011): Mléko. [online], [cit. 2012-01-18]. Dostupné na [www: http://www.agropress.cz/mleko.php](http://www.agropress.cz/mleko.php).
11. SVSR ČR (2009-2013): Státní veterinární správa registrované subjekty, [online], [cit. 2014-04-07]. Dostupné na [www: http://eagri.cz/public/app/svs\\_pub/subjekty/mleko.php](http://eagri.cz/public/app/svs_pub/subjekty/mleko.php).
12. Šefrová, J., Zink, V. (2008-2011): Správná technika dojení využitelná i v podmínkách malochovu. [online], [cit. 2012-01-18]. Dostupné na [www: http://www.agropress.cz/spravna\\_technika\\_dojeni.php](http://www.agropress.cz/spravna_technika_dojeni.php).
13. Toko Agri a.s. (2013), [online], [cit. 2013-11-30]. Dostupné na: <http://www.tmleko.cz/automat-na-mleko/>
14. Vaněk, J., Šimek, P., Jarolínek, J., Stočes, M. (2010): Agris, Agrární www portál, Mléko plné života, energie, chuti, minerálů a vitamínů [online]. [cit. 2013-11-07]. Dostupné z [www: <http://www.agris.cz/detail.php?iSub=518&id=166876>](http://www.agris.cz/detail.php?iSub=518&id=166876).
15. Vyhláška Mze č. 289/2008 Sb. o opatřeních pro předcházení a zdolávání nálezů a nemocí přenosných ze zvířat na člověka. Sbírka zákonů 2008, částka 96 (2008). [online], [cit. 2012-03-10]. Dostupné na [www: http://www.mvcr.cz/soubor/sb096-08-pdf.aspx](http://www.mvcr.cz/soubor/sb096-08-pdf.aspx)

## 8. SEZNAM TABULEK, GRAFŮ, OBRÁZKŮ

### *Seznam tabulek:*

Tabulka 1: Obsah základních složek mléka .....	12
Tabulka 2: Průměrné ukazatele jakosti syrového kravského mléka v ČR v období 2010- 2012 .....	14
Tabulka 3: Hlavní a doplňkové mikrobiologické ukazatele kvality syrového mléka .....	18
Tabulka 4: Skupiny mikroorganismů a jejich zástupců vyskytujících se v syrovém mléce ....	20
Tabulka 5: Příčiny vyřazování krav v kontrole užítkovosti dojnic .....	22
Tabulka 6: Počet registrovaných subjektů v jednotlivých krajích České republiky pro prodej mléka: mléčné automaty vs. přímý prodej mléka ze dvora .....	28
Tabulka 7: Celkový počet vzorků odebraných ve sledovaných mléčných automatech v rámci jednotlivých období.....	32
Tabulka 8: Počty analyzovaných vzorků v rámci sledovaných ukazatelů jakosti mléka.....	32
Tabulka 9: Základní přehled jakosti syrového mléka včetně mikrobiologických ukazatelů ....	37
Tabulka 10: Vliv měsíce na vybrané mikrobiologické ukazatele (log) .....	40
Tabulka 11: Vliv období na vybrané mikrobiologické ukazatele (log) .....	42
Tabulka 12: Vliv místa odběru na vybrané mikrobiologické ukazatele (log).....	44
Tabulka 13: Vliv délky skladování mléka v automatech na celkový počet mikroorganismů CPM (log).....	46

### *Seznam grafů:*

Graf 1: Vývoj celkového počtu mikroorganismů (CPM) v syrovém mléce z bazénových vzorků v ČR v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012.....	15
Graf 2: Vliv technologie ustájení na počet somatických buněk PSB (%).....	16
Graf 3: Vývoj počtu somatických buněk (PSB) v syrovém mléce v ČR v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012 .....	17
Graf 4: Procenta pozitivních vzorků v syrovém mléce v ČR na přítomnost reziduí inhibičních látek (RIL) v závislosti na jednotlivých měsících v letech 2010 – 2012 .....	18
Graf 5: Rozvoj celkového počtu mikroorganismů (CPM) v mléce při různé teplotě skladování .....	26
Graf 6: Rozdělení četnosti celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml).....	37
Graf 7: Rozdělení četnosti celkového počtu psychrotrofních mikroorganismů CPP (tis./ml). 38	
Graf 8: Rozdělení četnosti koliformních bakterií KB (tis./ml) .....	38

Graf 9: Vliv měsíce na celkový počet mikroorganismů CPM (tis./ml).....	41
Graf 10: Porovnání vlivu měsíce na vybrané doplňkové mikrobiologické ukazatele (tis./ml)	41
Graf 11: Porovnávání celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml) mezi letním a zimním obdobím .....	43
Graf 12: Vliv ročního období na vybrané doplňkové ukazatele (tis./ml).....	43
Graf 13: Porovnávání celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml) při odběru na farmě a z automatu .....	45
Graf 14: Porovnání vybraných doplňkových ukazatelů (tis./ml) při odběru na farmě a z automatu .....	45
Graf 15: Porovnání celkového počtu mikroorganismů CPM (tis./ml) při různé délce skladování.....	47

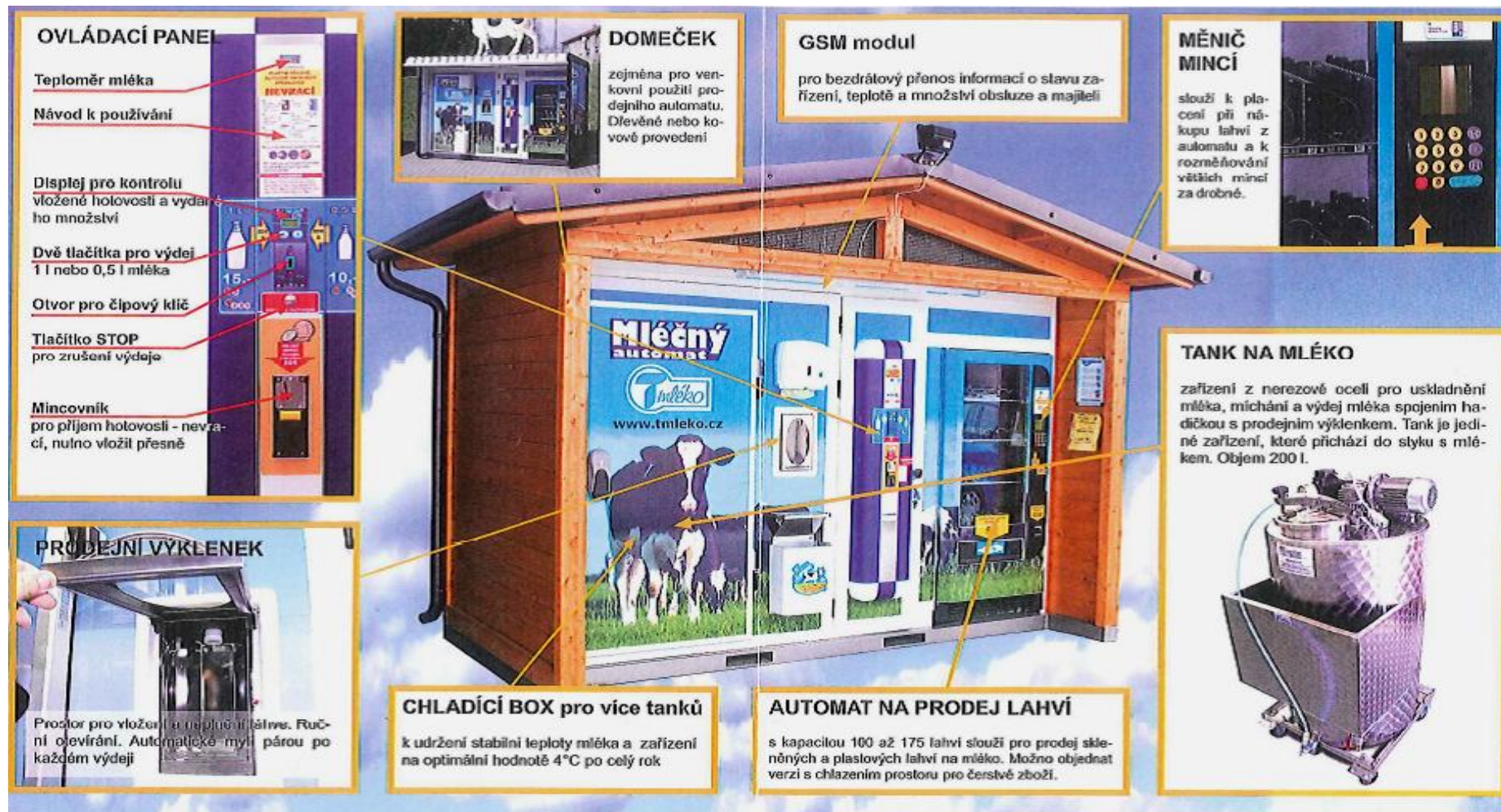
***Seznam obrázků:***

Obrázek 1: Obecné rozdělení složek mléka .....	13
Obrázek 2: Mikroorganismy vyskytující se v syrovém mléce .....	20
Obrázek 3: Mapa rozmístění mléčných automatů v České republice, stav ke dni 03.04.2013	27
Obrázek 4: Tank na mléko .....	29
Obrázek 5: Sanitace tanků.....	29



## 9. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Schéma mléčného automatu typu „XL“ a jeho stručný popis



Příloha 2: Detail místa pro vložení lahve s mincovníkem, typ „Li“ (mléčný automat Staňkov)



(Zdroj: autor diplomové práce)

Příloha 3: Detail návodu pro použití mléčného automatu, typ „Li“ (mléčný automat Klatovy)



(Zdroj: autor diplomové práce)