

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské inženýrství - Zpracování produktů

Katedra: Katedra kvality zemědělských produktů

Diplomová práce

**Vliv přerušení chladírenského řetězce na růst  
mikroorganismů v mléce**

Autor: Bc. Michaela Beerová

Vedoucí práce: MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

České Budějovice, 2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela BEEROVÁ**  
Osobní číslo: **Z14387**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Zemědělské inženýrství - Zpracování produktů**  
Název tématu: **Vliv přerušení chladírenského řetězce na růst mikroorganismů v mléce**  
Zadávající katedra: **Katedra kvality zemědělských produktů**

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

#### Úvod a cíl:

Celkový počet mikroorganismů přítomných v syrovém mléce je hlavním hygienickým ukazatelem, který poskytuje obraz o mikrobiální kontaminaci mléka, a tedy o dodržování hygienických zásad a technologických postupů. Většina mikroorganismů je z mléka eliminována pasterací. Prodej mléka z mléčných automatů klade v tomto ohledu nároky na samotného spotřebitele a v potaz je nutno brát i přerušování chladírenského řetězce, k němuž může dojít. Počet mikroorganismů v mléce se mění v závislosti na teplotě okolí.

**Cílem práce** je vypracovat literární přehled dané problematiky a posoudit dynamiku celkového počtu mikroorganismů v syrovém mléce, odebíraném z mléčných automatů, při různé délce a teplotě inkubace. Součástí diplomové práce bude krátké dotazníkové šetření mezi spotřebiteli nakupujícími z mléčných automatů.

Diplomová práce bude vypracována podle následující rámcové osnovy:

**Úvod** - charakteristika a význam řešené problematiky včetně uvedení cílů práce

**Literární přehled** - současný stav poznání dané problematiky získaný studiem soudobé vědecké a odborné literatury

**Materiál a metodika** - popis použitých analytických metod včetně metod statistických

**Výsledky a diskuse** - tabulkové a grafické zpracování získaných dat navazující na cíl práce, jejich statistické vyhodnocení a porovnání s dostupnými literárními údaji

**Závěr** - stručné shrnutí výsledků vlastní práce, návrhy a doporučení vyplývající z řešené problematiky

**Summary** - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)

**Seznam literatury** - jednotný, podle platných citačních zásad

Rozsah grafických prací: 5-10 stran (tabulky, grafy, fotografie)

Rozsah pracovní zprávy: 35-60 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- **BYLUND, G.:** Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden, 2003, 452 pp.
- **LEJEUNE, J.T., RAJALA-SCHULTZ, P.J.:** Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat. Clinical Infectious Diseases, 48 (1), 93-100.
- **PERKO, B.:** Effect of prolonged storage on microbiological quality of raw milk. Mljekarstvo, 2011, 61 (2), 114-124.
- **SEYDLOVÁ R., SNÁŠELOVÁ J.:** Současný stav mikrobiologické a bakteriologické kvality syrového mléka. Mlékařské listy, 21, 31-35.
- **KARPIŠKOVÁ, R., KOLÁČKOVÁ, I., VYLETĚLOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B.:** Studie "Mléčné automaty" - nálezy původců alimentárních onemocnění v syrovém mléce. Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav Praha, 2011, 20 (6), 212.
- Elektronické informační zdroje Akademické knihovny JU v Č. Budějovicích (internetové databáze): ISI Web of Knowledge (Web of Science), Agroweb, Scopus atd.

Vedoucí diplomové práce: **MVDr. Lucie HASOŇOVÁ, Ph.D.**

Katedra zootechnických věd

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.**

Katedra zootechnických věd

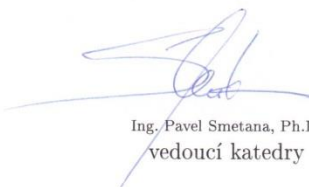
Datum zadání diplomové práce: **18. března 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2016**



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

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



Ing. Pavel Smetana, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 18. března 2015

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to 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 dne .....

Michaela Beerová

### **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D. a doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za pomoc při zpracování této diplomové práce a za poskytnutí důležitých informací a cenných rad.

## **Abstrakt**

Syrové mléko je jedním z nejméně sledovaných produktů, nejen z hlediska mikrobiálního, ale také z hlediska technologického, chemického a senzorického.

Cílem diplomové práce bylo sledování vlivu přerušení chladírenského řetězce na dynamiku celkového počtu mikroorganismů (CPM) v syrovém kravském mléce. Z výsledků vyplývá, že teplota i čas mají na hodnoty CPM výrazný vliv. Vzorky, které byly tři hodiny uchovávané při 15 °C, vykazovaly v rozmezí 0 – 27 hodin neustálý nárůst, jehož dynamika se měnila (5,13, resp. 6,66 log KTJ/ml). Vzorky, které byly vystavené 30 °C, vykazovaly rovněž výrazný nárůst, ale mezi 25. a 26. hodinou uchování nastal pokles (6,88, resp. 6,69 log KTJ/ml) a o hodinu později opětovný nárůst (na hodnotu 7,37 log KTJ/ml). Vzorky uchovávané při 6 °C vykazovaly nejnižší hodnoty CPM, i když i zde bylo zjištěno po 24 hodinách zvýšení (5,87 log KTJ/ml).

Druhou částí diplomové práce bylo vyhodnocení dotazníkového šetření u osob nakupujících syrové kravské mléko z mléčného automatu. Z šetření vyplynulo, že více jak polovina oslovených respondentů (88 %) přeruší chladírenský řetězec na dobu kratší než je 1 hodina a 75 % osob uvedlo, že mléko konzumují bez další úpravy. Důvody, které respondenty vedou ke konzumaci syrového mléka, byly: chuť (35 %), čerstvost (19 %), kvalita (16 %) a nutriční hodnota (12 %).

**Klíčová slova:** syrové mléko, celkový počet mikroorganismů, jakost mléka, dotazníkové šetření

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	8
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	9
2.1	Mikroflóra syrového mléka .....	9
2.1.1	Primární mikroflóra syrového mléka .....	9
2.1.2	Sekundární mikroflóra syrového mléka .....	10
2.2	Faktory ovlivňující růst mikroorganismů .....	13
2.2.1	Vnitřní faktory – vlastnosti mléka .....	13
2.2.2	Vnější faktory .....	14
2.3	Ukazatele mikrobiologické jakosti mléka .....	16
2.4	Faktory ovlivňující mikrobiologickou jakost mléka .....	16
2.4.1	Zdravotní stav dojnic.....	17
2.4.2	Získávání mléka .....	17
2.4.3	Ošetření mléka .....	18
2.5	Rizika konzumace syrového mléka .....	19
2.6	Legislativní požadavky pro syrové mléko.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b> .....	22
3.1	Cíl práce .....	22
3.2	Metodika analytické části .....	22
3.2.1	Odběr vzorků a jejich zpracování .....	22
3.2.2	Stanovení celkového počtu mikroorganismů .....	23
3.3	Metodika dotazníkového šetření .....	24
3.4	Statistické vyhodnocení dat.....	25
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	26
4.1	Dynamika celkového počtu mikroorganismů.....	26
4.1.1	Přehled základních výsledků hodnot CPM u jednotlivých pokusů.....	26
4.1.2	Vliv teploty a času na CPM .....	28
4.2	Dotazníkové šetření týkající se nákupu a spotřeby syrového kravského mléka .....	33
4.2.1	Nákup syrového kravského mléka v mléčných automatech .....	33
4.2.2	Postoj oslovených respondentů k nákupu a konzumaci syrového mléka	
	35	
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	43
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	44
<b>7</b>	<b>SEZNAM LITERATURY</b> .....	45

# 1 ÚVOD

Mléko je svými vlastnostmi ideálním živným a ochranným médiem pro mikroorganismy, což je dáno dostupností živin a vody, vhodným pH a oxidačně-redukčním potenciálem. Růst mikroorganismů je mimo jiné ovlivněn podmínkami, ve kterých je syrové mléko skladováno. Z vnějších faktorů má největší vliv na dynamiku rozmnožování mikroorganismů teplota a čas. Generační doba mikroorganismů a teplota prostředí spolu úzce souvisí, proto je důležité uchovávat mléko takovým způsobem, aby se generační doba mikroorganismů co nejvíce prodloužila. Při kratší generační době mikroorganismů totiž dochází rychleji ke kažení mléka a v důsledku toho k výrazným změnám v chemických, sensorických a technologických vlastnostech.

Konzumace syrového mléka se u spotřebitelů stává čím dál atraktivnější. Z toho důvodu jsou tedy mnohem častěji diskutována nejen pozitiva, ale i případná zdravotní rizika, neboť nepasterované syrové mléko může být zdrojem potenciálně patogenních mikroorganismů. Prevence spočívá v dodržování zásad správné hygienické praxe v celém procesu získávání mléka, protože denzita mikroorganismů se odvíjí zejména od zdravotního stavu dojníc a hygieny získávání mléka. Zároveň je důležité nepřerušovat chladírenský řetězec, protože ten zpomaluje růst mikroorganismů v syrovém mléce. Nicméně ani tyto kroky neeliminují mikroorganismy, především některé potenciálně patogenní, které již v syrovém mléce mohou být přítomné. Je tedy doporučováno syrové mléko před konzumací preventivně tepelně upravit, protože většina patogenních mikroorganismů nepřežívá pasterační proces.

Cílem práce bylo posoudit dynamiku celkového počtu mikroorganismů v syrovém kravském mléce, při různé délce a teplotě inkubace. Součástí diplomové práce bylo krátké dotazníkové šetření mezi spotřebiteli nakupujícími z mléčných automatů.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Mikroflóra syrového mléka

Mléko je svým složením ideálním živným a ochranným médiem pro mikroorganismy. Kravské mléko je složeno z 87,4 – 87,6 % vody a 12,4 – 12,6 % sušiny. Sušina je tvořena tuky (3,7 – 3,9 %), proteiny (3,2 - 3,5 %), laktózou (4,6 - 4,9 %) a obsahuje 0,7 % popelovin (FOX a McSWEENEY, 1998; BELITZ et al., 2004; FERNANDES, 2009), pH mléka se pohybuje v rozmezí od 6,5 do 6,7 (O'CONNOR, 1995; HANUŠ, 2000). Dle ČSN ISO 21807 spadá do kategorie tzv. velmi vlhkých potravin, kvůli vysoké aktivitě vody, jejíž hodnota je  $>0,95$ . Důsledkem těchto vlastností je, že mikroorganismy přítomné v mléce se rychle množí a ovlivňují jeho kvalitu příznivě, ale i nepříznivě (LEROY a VUYST, 2004; BELLOQUE et al., 2009).

#### 2.1.1 Primární mikroflóra syrového mléka

Denzita primární mikroflóry se odvíjí od zdravotního stavu dojnic a hygieny získávání mléka (BOOR a FROMM, 2006). V hygienicky získaném mléce bývá méně jak  $10^3$  mikroorganismů v 1 ml, kdežto v nehygienicky získaném mléce, může být více než  $10^6$  mikroorganismů v 1 ml (CHAMBERS, 2002; BOOR a FROMM, 2006; PARK a HAENLEIN, 2013). Primárním zdrojem kontaminace je mléčná žláza, která je infikována cestou vnější - strukovým kanálkem nebo cestou vnitřní - krevním oběhem (GAJDŮŠEK et al., 1996; CEMPÍRKOVÁ et al., 2012).

Nejčastěji se v mléce vyskytují grampozitivní koky (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp.), bakterie mléčného kvašení, *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp. a kvasinky. Odlišná situace proti zdravé mléčné žláze nastává u dojnic stížených subklinickou nebo klinickou mastitidou, kdy se do mléka dostává velké množství mikroorganismů, např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* a *Escherichia coli* (BOOR a FROMM, 2006; FERNANDES, 2009).

Primární mikroflóra zdravých dojnic nemá velký vliv na trvanlivost a jakost mléka. Velmi časně od nadojení je potlačena mikroflórou sekundární, která kontaminuje mléko při dojení a během dalšího zpracování (MURPHY a BOOR, 2010; MOATSOU a MOSCHOPOULOU, 2014).

#### a) Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (dále BMK) je skupina příznivých a přirozeně se vyskytujících mikroorganismů v mléce (GRIEGER a LUKÁŠOVÁ, 1990). Některé druhy patří k nejvýznamnějším bakteriím používaných v mlékařském průmyslu. Využívají se k výrobě mléčných výrobků a označují se jako startovací kultury nebo jako čisté mlékárenské kultury (LEROY a VUYST, 2004). Činností BMK u mléčných výrobků vzniká požadovaná chuť, konzistence a nutriční hodnota

(ŠPANOVÁ et al., 2009). Jiné druhy BMK způsobují kažení mléka a mléčných výrobků (CHRAMOSTOVÁ et al., 2014a).

Přirozený výskyt BMK není pouze v mléce, ale vyskytují se též v zažívacím traktu člověka a zvířat, na povrchu rostlin a u žen v pochvě (KÖNIG a FRÖHLICH, 2009; HAYA, 2014). Typičtí zástupci BMK rostou při standardních podmínkách, jedná se o grampozitivní, aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie, nesporeující, acidotolerantní a kataláza negativní. Do této skupiny v současnosti náleží rody *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Oenococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Tetragenococcus* spp., *Vagococcus* spp., *Weissella* spp. z kmenu *Actinobacteria* a rod *Bifidobacterium* spp., který náleží do kmenu *Actinomyceta* (AXELSSON, 2004; ŠPANOVÁ et al., 2009).

BMK rostou v rozpětí teplot 10 – 45 °C, pH 3,5 – 9,5, s optimem 25 – 37 °C při pH 5 – 6 (DJADOUNI a KIHAL, 2012).

Z hlediska metabolismu se BMK řadí mezi striktně fermentativní, které se podle produktů metabolismu rozlišují na homofermentativní a heterofermentativní druhy. Homofermentativní BMK produkují primárně kyselinu mléčnou. Jedná se například o rody *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp. a některé druhy *Lactobacillus* spp. Heterofermentativní druhy produkují kyselinu mléčnou a různé aromatické sloučeniny (aldehydy, ketony, diacetyl aj.). Jedná se například o rody *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp. a některé druhy *Lactobacillus* spp. (HAMMES a VOGEL, 1995; AXELSSON, 2004; KÖNIG a FRÖHLICH, 2009)

Již bylo řečeno, že některé druhy BMK osidlují zažívací trakt člověka, kde napomáhají správnému trávení potravy a příznivě působí na zdraví jedince. Proto se vybrané druhy BMK v současnosti užívají jako probiotika, která jsou součástí tzv. funkčních potravin nebo jsou k dostání ve formě potravinových doplňků (PEROUTKOVÁ et al., 2011; HAYEK a IBRAHIM, 2013).

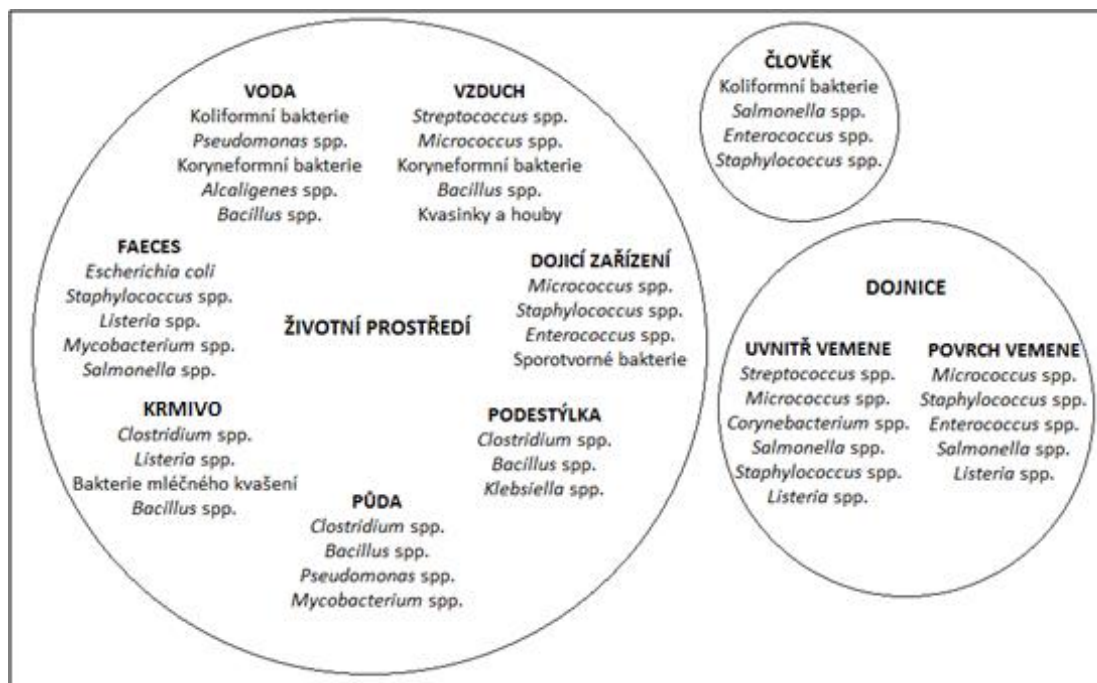
### **2.1.2 Sekundární mikroflóra syrového mléka**

Sekundární mikroflóra ovlivňuje technologické zpracování a trvanlivost mléka (NEVIANI et al., 2013). Druhové zastoupení sekundární mikroflóry je ovlivněno úrovní hygieny získávání mléka a následným zpracováním (BOOR a FROMM, 2006).

Sekundárním zdrojem kontaminace je zejména povrch celého vemene, které nebylo očištěno, bylo očištěno nečistou vodou nebo bylo masírováno nečistou utěrkou. Nedostatečná sanitace dojícího zařízení a skladovacího vybavení způsobuje usazování mikroorganismů v trhlínách či záhybech, které jsou následně uvolňovány do mléka během procesu získávání a skladování. Dalším zdrojem sekundární kontaminace může být podestýlka, krmivo, voda apod. (**Obr. 1**). K další kontaminaci

může docházet i při manipulaci s mlékem a během skladování (GAJDŮŠEK et al., 1996). Velmi významnou skupinou z hlediska potravin jsou mikroorganismy způsobující kažení.

**Obrázek 1 - Zdroje kontaminace syrového mléka**



zdroj: HASSAN a FRANK, 2011 – upraveno

### 2.1.2.1 Mikroorganismy způsobující kažení

Při kažení mléka dochází k výrazné změně chemických, senzoryckých a technologických vlastností (SAMARŽIJA et al., 2012; FOOD SCIENCE, 2014). Tyto změny jsou způsobeny jednak rozkladem proteinů a tuků účinkem bakteriálních enzymů proteolytických a lipolytických, dále v důsledku fermentace sacharidů (mléčné, propionové nebo máselné kvašení) (HANTSIS–ZACHAROV a HALPERN, 2007; FOOD SCIENCE, 2014).

Mezi nejvýznamnější mikroorganismy způsobující kažení mléka patří gramnegativní tyčinky (*Pseudomonas* spp., koliformní bakterie), grampozitivní sporotvorné bakterie (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.), některé bakterie mléčného kvašení, koryneformní bakterie, kvasinky a plísňe (CHRAMOSTOVÁ et al., 2014a).

#### a) Psychrotrofní bakterie

Psychrotrofní bakterie (dále PSY) jsou v současnosti významnou a sledovanou skupinou v mlékařském průmyslu. Jsou zdrojem ekonomických ztrát, které mohou být až 30 %. PSY způsobují kažení mléka a mléčných výrobků, protože jsou schopny tvořit proteázy, lipázy a fosfolipázy, které štěpí složky mléka, tyto vyprodukované enzymy mohou být termostabilní a jejich aktivita je uchována

i po pasterizaci. Také se v mléce můžou vyskytovat podmíněně patogenní druhy PSY (GRIEGER a LUKÁŠOVÁ, 1990; SAMARŽIJA et al., 2012; CHRAMOSTOVÁ et al., 2014a). Přítomnost PSY v syrovém mléce je způsobena výhradně kontaminací po nadojení mléka, protože nejsou součástí přirozené mikroflóry vemene, mají environmentální charakter - nachází se ve vodě, v půdě, prachu, na rostlinách (GOUNOT, 1986; MOYER a MORITA, 2001). Nejčastější zdroje kontaminace mléka jsou vnější prostředí, znečištěná voda, nedostatečná sanitace dojicího zařízení a skladovacích prostor (SAMARŽIJA et al., 2012).

Mléko získané hygienicky obsahuje méně než 10 % PSY z celkového počtu mikroorganismů, který nepřesahuje  $10^4$  v 1 ml. V nehygienických podmínkách však může zastoupení PSY činit 75 – 99 % z celkového počtu mikroorganismů (GRIEGER a LUKÁŠOVÁ, 1990; SAMARŽIJA et al., 2012).

Většina PSY v mléce patří do čeledi *Pseudomonaceae*, s převahou *Pseudomonas fluorescens*, méně často *P. fragi*, *P. putida*. Z dalších PSY jsou z mléka izolovány zástupci rodů *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Alcaligenes* spp. aj. (GOUNOT, 1986; SAMARŽIJA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Psychrotrofní bakterie jsou schopny růst při 7 °C či méně, a to bez ohledu na jejich optimální teplotu růstu (SAMARŽIJA et al., 2012). PSY mají optimum růstu kolem 15 °C. Růstové minimum je 0 °C a růstové maximum je okolo 30 °C (MOYER a MORITA, 2001; CHRAMOSTOVÁ et al., 2014b). Odolnost PSY k nízkým teplotám je dána schopností syntetizovat membránové neutrální lipidy a fosfolipidy, které obsahují zvýšený podíl nenasycených mastných kyselin, čímž se snižuje bod tání. Funkčnost, transport rozpuštěných látek, sekrece extracelulárních enzymů a tekutost cytoplasmatické membrány je tedy zachována i při nízkých teplotách prostředí (OLIVEIRA et al., 2015).

Další důležitou vlastností PSY je syntéza exopolysacharidů nebo lipopeptidů, které umožňují bakteriím přilnout k povrchu a následně mohou tvořit biofilm. Vytvořený biofilm je obtížné odstranit z povrchu, tudíž může být dlouhodobým zdrojem kontaminace (VASUT a ROBECCI, 2009; SAMARŽIJA et al., 2012).

## **b) Koliformní bakterie**

Zástupci koliformních bakterií (dále KOLI) náleží do čeledi *Enterobacteriaceae*. Označení KOLI se používá k popisu gramnegativních, nesporulujících, fakultativně anaerobních, oxidáza negativních, kataláza pozitivních tyčinkovitých bakterií, patřících do rodů *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. Někteří zástupci KOLI se prolínají s předchozí skupinou psychrotrofních mikroorganismů a urychlují kažení mléka (GRIEGER a LUKÁŠOVÁ, 1990; MOATSOU a MOSCHOPOULOU, 2014).

Výskyt jednotlivých rodů a druhů je různorodý. Například *Escherichia coli* se běžně vyskytuje v gastrointestinálním traktu teplokrevných živočichů, tudíž je základním indikátorem fekálního znečištění. *Klebsiella* spp. a *Proteus* spp. jsou běžnou součástí mikroflóry zažívacího traktu zvířat a lidí, ale zároveň mají environmentální charakter (NORDMANN et al., 2011).

Koliformní bakterie hrají významnou roli jako indikátory úrovně hygieny získávání mléka a jeho případné fekální kontaminace. Rovněž mohou indikovat přítomnost střevních patogenů. Možnými zdroji kontaminace syrového mléka jsou hnůj, půda či fekálně kontaminovaná voda. Přítomnost KOLI v mléce může být též zapříčiněna mastitidami této etiologie (SMITH a HOGAN, 2002).

## **2.2 Faktory ovlivňující růst mikroorganismů**

Růst mikroorganismů v mléce určují vnitřní faktory, tj. vlastnosti samotné suroviny, a dále faktory vnější.

### **2.2.1 Vnitřní faktory – vlastnosti mléka**

Mléko je svými vlastnostmi ideálním růstovým médiem pro mikroorganismy, což je dáno dostupností živin a vody, vhodným pH a oxidačně - redukčním potenciálem (LEDENBACH a MARSHALL, 2009).

#### ***Obsah živin***

Mléko je excelentním zdrojem všech důležitých živin pro růst a množení mikroorganismů. Mikroorganismy získávají dusík z kaseinu, syrovátkových bílkovin a nebílkovinných dusíkatých látek (močovina, volné aminokyseliny, amoniak). Zdrojem uhlíku a energie je zejména laktóza, kterou ovšem většina mikroorganismů nedokáže, vzhledem k chybějící laktáze, využít. Naproti tomu bakterie mléčného kvašení disponují laktázou, což jim poskytuje konkurenční výhodu proti ostatním mikroorganismům (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; BYLUND, 2003; ERKMEN a BOZOGLU, 2016).

#### ***Aktivita vody***

Voda je nezbytnou složkou buněčné hmoty mikroorganismů, veškeré chemické reakce v živé buňce probíhají ve vodném prostředí. Voda musí být pro mikroorganismy využitelná, což je ovlivněno zejména přítomností solí, sacharidů aj. Míru její využitelnosti vyjadřuje vodní aktivita. Většina bakterií je schopna růst pouze při vysoké vodní aktivitě 0,99 - 0,93, zatímco kvasinky a plísně jsou schopné růst i při nižší aktivitě vody v rozmezí 0,91 – 0,70 (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; MURPHY, 2010).

Mléko má vysoký obsah vody (87,4 – 87,6 %), hodnota vodní aktivity je > 0,95, tudíž spadá do kategorie rychle se kazících potravin

(FOX a McSWEENEY, 1998; BELITZ et al., 2004; FERNANDES, 2009, ČSN ISO 21807).

### ***Koncentrace vodíkových iontů***

Koncentrace vodíkových iontů (pH) silně ovlivňuje růst, odolnost a biochemickou činnost, změnou v poměru hlavních produktů metabolismu u mikroorganismů. Optimální hodnota pH pro většinu bakterií se pohybuje v rozmezí od 5 do 7, pro většinu kvasinek je optimální pH v rozmezí 4,2 – 5,5 a optimální pH pro většinu plísní se pohybuje kolem 7 (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; MURPHY, 2010).

Mléko má ideální hodnotu pH pro většinu mikroorganismů v rozmezí od 6,5 do 6,7 (O'CONNOR, 1995; HANUŠ, 2000).

### ***Oxidačně-redukční potenciál***

Oxidačně-redukční potenciál je schopnost odevzdávat elektrony a je dán přítomností oxidačních nebo redukčních činidel v prostředí. Mezi nejvýznamnější činidla obecně patří kyslík, dusičnany, železité ionty (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; MURPHY, 2010).

Mikroorganismy mají odlišné požadavky ke koncentraci kyslíku v prostředí. Aerobní mikroorganismy potřebují ke svému růstu rozpuštěný kyslík neboli potraviny s pozitivním oxidačně-redukčním potenciálem a anaerobní mikroorganismy vyžadují negativní oxidačně-redukční potenciál, prostředí bez kyslíku (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; MURPHY, 2010).

Mléko vykazuje pozitivní oxidačně-redukční potenciál (+250 mV), který je ideální pro aerobní či fakultativně anaerobní mikroorganismy (MARTIN et al., 2013).

### ***Přirozené inhibiční látky v syrovém mléce***

Specifickou vlastností čerstvě nadojeného mléka je inhibiční schopnost, kdy je omezen rozvoj všech mikroorganismů. Mléko obsahuje malé množství přirozených inhibičních látek s antibakteriálními vlastnostmi, patří sem laktoperoxidázový systém, lysozym, laktoferrin, imunoglobuliny. Tato inhibice trvá 0,5 – 4 hodiny po nadojení a může být prodloužena včasným zchlazením mléka (CUPÁKOVÁ et al., 2001; MURPHY, 2010; SAMKOVÁ, 2010).

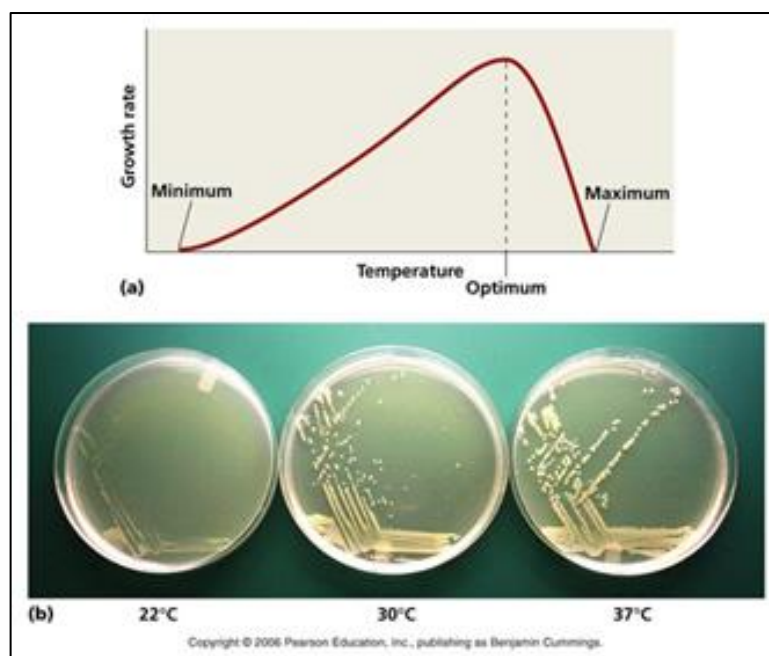
### **2.2.2 Vnější faktory**

Vlastnosti prostředí významně ovlivňují růst mikroorganismů, jedná se zejména o teplotu prostředí, které je mléko vystaveno a dobu působení, dále o UV záření, relativní vlhkost vzduchu, hydrostatický tlak a obsah plynů v atmosféře (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

## Teplota a čas

Hlavní faktor, který ovlivňuje rychlost množení mikroorganismů je teplota a čas, po který daná teplota působí. Každý mikrobiální druh se liší v minimální, optimální a maximální teplotě, při které je schopen se rozmnožovat a dle této vlastnosti jsou mikroorganismy děleny do čtyř skupin (termofilní, mezofilní, psychrotrofní a psychrofilní). Minimální teplota je nejnižší teplota, při které se daný druh rozmnožuje zjizitelnou rychlostí, při optimální teplotě se daný druh rozmnožuje nejrychleji a maximální teplota je nejvyšší teplota, při které je daný druh schopen se rozmnožovat (**Obr. 2**) (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; MURPHY, 2010; WAREING et al., 2011).

Obrázek 2 – Vliv teploty na růst mikroorganismů



Zdroj: BAUMAN, 2004

Mikroorganismy se množí s různou intenzitou v závislosti na vnějších podmínkách. Mikroorganismy vykazující v daném prostředí kratší generační dobu velice brzy přebírají dominantní postavení. Teplota prostředí je tedy významný faktor, který ovlivňuje rychlost množení mikroorganismů a je proto důležité potraviny uchovávat takovým způsobem, aby se generační doba mikroorganismů co nejvíce prodloužila (**Tab. 1**) (ERKMEN a BOZOGLU, 2016).

**Tabulka 1 – Maximální doba skladování mléka při dané teplotě, po které počet mikroorganismů nejčastěji přesáhne stanovený legislativní limit**

Teplota [°C]	Čas [h]
30 - 38	4
27 - 29	6 - 8
20 - 26	15 - 24
10 - 15	24
4 - 6	48 - 72
0 - 4	3 dny
-20	1 měsíc

Zdroj: WEISS, 2005 - upraveno

### **2.3 Ukazatele mikrobiologické jakosti mléka**

Ukazatele mikrobiologické jakosti mléka jsou základním znakem dobré jakosti a hygieny mléka. Jsou indikátorem technologie krmení a ustájení. Poukazují na nevhodné ošetření a skladování mléka. Při překročení limitních hodnot u jednotlivých ukazatelů je potřeba se důsledně zaměřit na kontrolu hygienických podmínek, dezinfekci a sanitaci používaných prostředků a zařízení apod. (HANUŠ et al., 2012).

Hlavním ukazatelem mikrobiologické jakosti syrového mléka je celkový počet mikroorganismů (CPM), který je indikátorem hygienických návyků v celé technologii dojení, úpravy mléka po nadojení a rovněž slouží jako kritérium pro proplácení mléka (CEMPÍRKOVÁ et al., 2012). CPM zahrnuje mezofilní, aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy. Jedná se o veškeré bakterie, plísňe a kvasinky, které rostou na neselektivních kultivačních půdách při 30 °C 72 hodin (ČSN ISO 4833).

Doplňkové mikrobiologické ukazatele jsou psychrotrofní, koliformní, termorezistentní a sporotvorné anaerobní mikroorganismy (ČSN 57 0529).

### **2.4 Faktory ovlivňující mikrobiologickou jakost mléka**

Jakost mléka je charakterizována chemickým složením, sensorickými, fyzikálními, technologickými vlastnostmi a mikrobiologickými parametry. Mikrobiologickou jakost ovlivňuje zejména zdravotní stav dojnice, stupeň znečištění povrchu vemene, sanitace dojícího zařízení a skladovacího vybavení a také vnější prostředí (OLIVEIRA et al., 2015).



### 2.4.1 Zdravotní stav dojnic

Dobrý zdravotní stav dojnic je předpoklad pro produkci jakostního mléka. Zdravotní stav dojnic se odvíjí především od výživy, způsobu ustájení, způsobu dojení, kvality ošetřování, stájového prostředí a věku. Směsná krmná dávka musí splňovat živinovou hodnotu a vyrovnanost, musí být stabilní z nutričního, dietetického a hygienického hlediska. Volný způsob ustájení vytváří vhodné podmínky pro tvorbu kvalitního mléka a podporuje celkový zdravotní stav (HOGEVEEN et al., 2011; SAMKOVÁ a CEMPÍRKOVÁ, 2012).

Významným produkčním onemocněním ve vztahu k mléku jsou mastitidy. Dojnice stížená mastitidou představuje pro chovatele závažný ekonomický problém, neboť se snižuje mléčná užitkovost, v mléce je zvýšené množství mikroorganismů a somatických buněk. Takové mléko není vhodné k technologickému zpracování, navíc může být pro člověka zdrojem patogenních mikroorganismů, např. enterotoxigenní kmeny *Staphylococcus aureus* (OLIVER, 2010; HOGEVEEN et al., 2011).

Přestože za rozvojem mastitidy stojí řada faktorů (polyfaktoriální charakter onemocnění), vlastní příčinou je mikrobiální agens. Mastitidy jsou děleny dle zdroje patogenních mikroorganismů na kontagiózní (infekční) a environmentální (JÍLEK, 2000; ERSKINE, 2014).

Environmentální původci se běžně vyskytují ve vnějším prostředí, zaživacím traktu a na těle dojnice, proto mastitidy environmentálního charakteru nelze eradikovat a představují trvalý zdravotní problém, který však lze minimalizovat důkladnou hygienou životního prostředí, správnou výživou a péčí o dojnici. Mezi nejčastější etiologické agens patří koliformní bakterie (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. a *Yersinia* spp.), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus parauberis*, *Staphylococcus* - koaguláza negativní druhy a *Enterococcus* spp. (JÍLEK, 2000; ERSKINE, 2014).

Kontagiózní mastitidy způsobují především *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma* spp. a *Corynebacterium bovis*. Jejich zdrojem je pouze infikovaná mléčná žláza a nejčastěji se přenáší nehygienickým získáváním mléka, kdy nedochází k desinfekci strukových násadců, dále rukama dojičů a nečistými utěrkami, které jsou využity na více dojnic. Důkladnou prevencí lze kontagiózní mastitidy z chovu eradikovat (JÍLEK, 2000; ERSKINE, 2014).

### 2.4.2 Získávání mléka

Nejčastěji se mléko z mléčné žlázy získává strojním dojením v dojírnách nebo automatizovaným dojicím systémem minimálně 2x denně, které částečně napodobují sání telete (SAMKOVÁ a CEMPÍRKOVÁ, 2012). Kvalitní dojicí zařízení musí odpovídat anatomickým a fyziologickým vlastnostem mléčné žlázy

a nesmí negativně ovlivňovat zdravotní stav. Dojírna a dojící zařízení musí splňovat parametry, které jsou předepsané národní a evropskou legislativou. Musí mít optimální velikost, žádoucí mikroklima, včetně větrání a správného osvětlení apod. (DOLEŽAL, 2000; VEGRICHT, 2000). Hygienické požadavky jsou také kladeny na dojiče. Každá osoba manipulující s potravinami musí udržovat vysoký stupeň osobní hygieny, dále musí nosit pokrývku hlavy a vhodný, čistý oděv. Žádná osoba, která trpí nakažlivým onemocněním (infikovaná poranění, kožní infekce, vředy nebo průjmy) nesmí manipulovat s potravinami nebo vstupovat do jakékoli oblasti, kde se s potravinami manipuluje (Nařízení EP a Rady (ES) č. 852/2004; KUNC et al., 2004).

Správná funkce dojícího zařízení - vysoká provozní spolehlivost, rychlé zjištění a odstranění závad jsou základní předpoklady zisku kvalitního a hygienicky jakostního mléka. Optimální provozní podtlak působící na hrot struku se pohybuje v rozmezí od 37,5 do 40,8 kPa, tento podtlak může kolísat maximálně o 2 kPa. Při působení vysokého podtlaku dochází k poškozování sekrečních buněk a strukových svěračů. Optimální provozní podtlak je doprovázen optimálním počtem a poměrem pulzů. Dojící zařízení by mělo pracovat rychlostí 50 – 60 pulzů za minutu v poměru taktu sání k taktu stisku 2:1. V důsledku nesprávné pulzace nastává zduření až cyanóza struku, přičemž nižší pulzace je bolestivá a vyšší pulzace snižuje kvalitu stisku strukových násadců (MACHÁLEK, 1996; VEGRICHT, 2000; BYLUND, 2003; LIŠKA, 2006).

Dojení by mělo začínat kontrolou vemene z hlediska příznaků klinické mastitidy a toaletou mléčné žlázy. Tato je volena dle stupně znečištění – suchá, polosuchá nebo mokrá. Poté se provede oddojení prvních stříků do speciální nádoby s tmavým dnem a posoudí se charakter sekretu. V indikovaných případech je používána dezinfekce před dojením (tzv. predipping), která minimalizuje bakteriální kontaminaci povrchu kůže struků a snižuje výskyt nových infekcí (SAMKOVÁ a CEMPÍRKOVÁ, 2012). Vlastní dojení by mělo být zahájeno nejpozději do jedné minuty po toaletě vemene. Délka dojení by neměla přesáhnout 6 – 8 minut, tedy dobu, po kterou působí oxytocin. Delší dojení vede k traumatizaci hrotu struku. Po dojení následuje dezinfekce struků po dojení, postdipping, významný z hlediska prevence mastitid (BYLUND, 2003; BEWLEY, 2012).

Přesné požadavky na dojnice, prostředí, personál i postupy při zacházení se syrovým mlékem jsou uvedeny v Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004.

### **2.4.3 Ošetření mléka**

I když je správným postupem získáno kvalitní mléko, s nízkým obsahem mikroorganismů, je nutno správným ošetřením po nadojení jeho kvalitu udržet (BYLUND, 2003; DELAVAL, 2008).

### ***Cezení a filtrace mléka***

Čistění je nezbytný krok před uskladněním mléka v chladicí nádrži. Slouží k odstranění nečistot, jakými jsou částičky prachu, kousky steliva a krmiva, hmyz či srst. Nečistoty jsou zdrojem mikroorganismů, a tedy čím je jejich přítomnost v mléce delší, tím větší množství jich je uvolněno do mléka. V technologii čištění je využíváno cezení a filtrace – metod založených na velikosti molekul (DELAVAL, 2008).

Pro filtraci se využívají mléčné filtry, které je nutno pravidelně vyměňovat před vyčerpáním absorpční schopnosti filtru. K tomu se využívají plošné nebo rukávcové filtry. Textilie použité k výrobě nesmí být tkaná. Textilní filtry mohou být nahrazeny filtry kovovými, které jsou vhodné k opakovanému použití (SAMKOVÁ a CEMPÍRKOVÁ, 2012).

### ***Chlazení mléka***

Druhým krokem ošetření mléka po nadojení je chlazení. Chlazení probíhá v tancích, které jsou umístěné v samostatné místnosti. Po nadojení má mléko přibližně 33 °C (SAMKOVÁ a CEMPÍRKOVÁ, 2012). Dle veterinárních požadavků musí být vychlazené na požadovanou teplotu do 150 minut od nadojení (CHRAMOSTOVÁ et al., 2014b).

Prováděcí Vyhláška č. 289/2007 Sb. určuje, že pokud není syrové mléko určené k přímému prodeji prodáno do 2 hodin po nadojení, musí být zchlazeno na 8 °C a zchlazené prodáno do 24 hodin po nadojení, nebo musí být zchlazeno na 6 °C a zchlazené prodáno do 48 hodin po nadojení. Během přepravy k dalšímu zpracování nesmí teplota mléka stoupnout nad 10 °C, stejně tak teplota pod 4 °C není žádoucí (CHRAMOSTOVÁ et al., 2014b).

Chlazení mléka zpomaluje množení mezofilních a termofilních mikroorganismů přítomných v mléce. Množení psychrotrofních mikroorganismů omezeno není, proto je nezbytný včasný odvoz mléka k dalšímu zpracování (BYLUND, 2003; SAMKOVÁ a CEMPÍRKOVÁ, 2012).

## **2.5 Rizika konzumace syrového mléka**

Syrové mléko může být zdrojem potenciálně patogenních i patogenních mikroorganismů. Jedná se především o bakterie a jejich toxiny, ale též o parazity, viry, plísňe a jejich toxiny. Jejich původ lze hledat jednak u zvířat, často klinicky bez potíží, dále ve vnějším prostředí a v neposlední řadě může být zdrojem kontaminace mléka i člověk manipulující s mlékem (DHANASHEKAR et al., 2012).

Onemocnění přenášená potravinami (alimentární) se v lidské populaci vyskytují od nepaměti. Od druhé poloviny 20. století má jejich výskyt vzestupný charakter (HASONOVÁ, 2012). Ten je vysvětlován měnícím se životním stylem, zdokonalováním medicíny, rozšířením mediálního zastoupení (tisk, televize apod.),

změnami v technologii a v metodách, které slouží k průkazu mikroorganismů (JIČÍNSKÁ a HAVLOVÁ, 1995).

K významným původcům alimentárních onemocnění, u nichž bylo jako zdroj infekce potvrzeno též syrové mléko, patří *Staphylococcus aureus* (jeho enterotoxigenní kmeny), jehož zdrojem jsou zejména mastitidy a hnisavé infekce kůže lidí manipulujících s mlékem (CUPÁKOVÁ et al., 2001). Lidé jsou k působení stafylokokových enterotoxinů velmi vnímaví. Z dalších původců lze jmenovat *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, patogenní kmeny *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*. K méně častým původcům onemocnění z mléka patří např. *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp., virus klíšťové meningoencefalitidy aj. (VYLETĚLOVÁ, 2008; HASONOVÁ, 2012).

Prevence onemocnění z mléka zahrnuje jednotlivá opatření k zajišťování mikrobiální nezávadnosti mléka a výrobků z něj vyrobených. Preventivní kroky musí pečlivě postihovat všechny kritické body při současném zohlednění znalostí o jednotlivých původcích onemocnění z mléka. Za nejefektivnější metodu zajišťující mikrobiální nezávadnost mléka lze označit pasterizaci, která eliminuje většinu patogenních mikroorganismů z mléka (Nařízení komise (ES) č. 2073/2005; SZPI, 2015).

## 2.6 Legislativní požadavky pro syrové mléko

Po vstupu do Evropské unie (EU) se Česká republika zavázala k akceptování legislativy EU. V první řadě syrové mléko musí splňovat požadavky tzv. hygienického balíčku. Hygienický balíček je složen ze čtyř legislativních předpisů, přičemž dva (Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004, o hygieně potravin a Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 882/2004, o úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiva potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat jsou zaměřeny na všechny potraviny a zbývající dva předpisy jsou zaměřeny na potraviny živočišného původu, jedná se o Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu a Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 854/2004, kterým se stanoví zvláštní pravidla pro organizaci úředních kontrol produktů živočišného původu určených k lidské spotřebě.

V Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu, je vysvětlen pojem „syrové mléko“. Syrovým mlékem se rozumí mléko produkované sekrecí mléčné žlázy hospodářských zvířat, které nebylo podrobeno ohřevu nad 40 °C a nebylo ani ošetřeno žádným způsobem s rovnocenným účinkem. Mimo jiné nařízení udává hygienické požadavky na výrobu syrového mléka, včetně požadavků na prostory a vybavení výroby, hygieny během dojení, sběru a přepravy, hygieny personálu. Spravuje otázku kritérií pro prvovýrobu syrového mléka

(**Tab. 2**). Při prodeji syrového mléka konečnému spotřebiteli nesmí být CPM vyšší než 300 000 KTJ/1ml. To znamená, že vzorky odebrané z mléčných automatů, nebo z nádob musí odpovídat stejným parametrům, jako při zpracování syrového mléka v mlékárně. Tato hodnota se stanovuje přímo, nepočítá se průměr a frekvence vzorkování není legislativně stanovena.

**Tabulka 2 - Kritéria mikrobiologických ukazatelů pro prvovýrobu syrového mléka.**

Nařízení	Mikrobiologický ukazatel	Objem	KTJ*
Nařízení č. 853/2004 Sb.	CPM při 30 °C	1 ml	≤ 100 000**
	Počet somatických buněk	1 ml	≤ 400 000***
<p>* Kolonie tvořící jednotky  ** Klouzavý geometrický průměr za dobu dvou měsíců při alespoň dvou vzorcích za měsíc.  ***Klouzavý geometrický průměr za dobu tří měsíců při alespoň jednom vzorku za měsíc, pokud příslušný orgán nespecifikuje jinou metodiku s cílem zohlednit sezónní variace v úrovni výroby.</p>			

Zdroj: Nařízení č. 853/2004 Sb.

V Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004, o hygieně potravin, příloha II, kapitola III je uvedeno, že prostory a prodejní automaty musí být umístěny, navrženy, konstruovány a udržovány v čistotě a v dobrém stavu, tak aby nedocházelo k riziku kontaminace, zejména zvířaty a škůdci. Vnitřní povrchy mléčného automatu musí být hladké, snadno čistitelné, dezinfikovatelné a použitý materiál nesmí být toxický.

V České republice je povolen a upraven přímý prodej syrového mléka Zákonem č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a prováděcí vyhláškou č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. „Prodej ze dvora“ jako prodej malého množství vlastních produktů z prvovýroby přímo konečnému spotřebiteli je povolen dle těchto legislativních podkladů od roku 2003. V roce 2009 byl schválen prodej syrového mléka prostřednictvím mléčných automatů podle Vyhlášky č. 128/2009 Sb., o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty, jako „okrajová omezená činnost“. V rámci toho farmář může prodávat denně nejvýše 500 l kravského mléka.

Vyhláška č. 289/2007 Sb. dále stanovuje, že syrové mléko musí pocházet od zdravého zvířete z hospodářství úředně prostého tuberkulózy a úředně prostého nebo prostého brucelózy, jež nevykazuje žádné příznaky nakažlivého onemocnění přenosného mlékem na člověka. Každé výdejní místo musí obsahovat viditelné upozornění „Syrové mléko, před použitím tepelně opracovat nebo pasterovat“.

### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Cíl práce

Cílem práce bylo posoudit dynamiku celkového počtu mikroorganismů v syrovém kravském mléce, při různé délce a teplotě inkubace. Součástí diplomové práce bylo krátké dotazníkové šetření mezi spotřebiteli nakupujícími z mléčných automatů.

#### 3.2 Metodika analytické části

Pro vyhodnocení dynamiky celkového počtu mikroorganismů (CPM) v syrovém mléce při přerušení chladírenského řetězce byly zvoleny teploty 15 °C a 30 °C. Jako kontrolní vzorek sloužilo mléko uložené v chladničce (6 – 8 °C), u kterého nebyl přerušen chladírenský řetězec.

##### 3.2.1 Odběr vzorků a jejich zpracování

Vzorky mléka byly odebírány z mléčného automatu (České Budějovice – u Terna) v souladu s Vyhláškou č. 211/2004 Sb., v platném znění. Celkem byly uskutečněny čtyři odběry vzorků (září a listopad 2015, leden a únor 2016). Vzorky byly odebírány do plastových lahví o objemu 1 l a ihned byly přepraveny do laboratoře, nejpozději do 30 minut.

Po převozu bylo mléko zpracováno v laboratoři Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Kontrolní vzorky byly vyšetřeny po přivezení do laboratoře (hodina 0), uloženy do chladničky při teplotě 6 – 8 °C a vyšetřeny znovu za 24 hodin (hodina 24). Testované vzorky byly uloženy při teplotě 15 (30) °C a vyšetřeny v čase dosažení požadované teploty (hodina 0), a dále po 1, 2 a 3 hodinách (hodina 1, 2 a 3), poté byly uloženy při chladničkové teplotě a znovu vyšetřeny po 24, 25, 26 a 27 hodinách (hodina 24, 25, 26 a 27). Celkem bylo vyšetřeno 80 vzorků mléka (**Tab. 3**).

**Tabulka 3 - Přehled o počtu vzorků vyšetřených při stanovené teplotě a v daném čase.**

Teplota	Hodina								Celkem
	0	1	2	3	24	25	26	27	
6 °C	8				8				16
15 °C	4	4	4	4	4	4	4	4	32
30 °C	4	4	4	4	4	4	4	4	32
<b>Vzorky celkem</b>									<b>80</b>

### 3.2.2 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

#### *Příprava vzorků pro mikrobiologické vyšetření*

Ředění a příprava vzorků pro mikrobiologické vyšetření je upraveno v ČSN ISO 8261. V 1000 ml ředícího roztoku bylo rozpuštěno 1 g peptonu a 8,5 g chloridu sodného. Ředící roztoky ve zkumavkách o objemu 9 ml a v Erlenmeyerově baňce o objemu 90 ml byly před použitím sterilizovány po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

#### *Stanovení CPM*

Ke kultivaci CPM byla použita komerční kultivační půda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů s odstředěným mlékem. Typické složení kultivační půdy na litr destilované vody: Trypton 5 g, přídavek kvasnic 2,5 g, sušené odstředěné mléko prosté inhibitorů 1 g, glukóza 1 g, Agar – agar 10,5 g. Každá Petriho miska byla řádně označena.

Průkaz CPM byl proveden dle ČSN ISO 6610 a ČSN EN ISO 4833. Z každého vzorku bylo připraveno desítkové ředění. Inokulum bylo přelito kultivační půdou. Po přelití bylo inokulum promícháno, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení mikroorganismů v kultivační půdě. Na vodorovné a chladné podložce se kultivační plotny nechaly ztuhnout a poté byly uloženy dnem vzhůru do termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

#### *Vyhodnocení*

Po skončení inkubace byly spočítány narostlé kolonie. Pro výpočet byly použity kultivační plotny, na nichž bylo normou stanovené rozpětí 15 – 300 kolonií.

K výpočtu byl použit vzorec, který je napsán níže a výsledek byl zaokrouhlen do formy čísla 1,0 – 9,9x10<sup>x</sup>. Jako měrná jednotka byla využita KTJ/ml.

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0,1 n2) d}$$

- $\sum C$  - součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách
- n1 - počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění
- n2 - počet ploten používaných pro výpočet z druhého ředění
- d - faktor prvního pro výpočet použitého ředění

### 3.3 Metodika dotazníkového šetření

Potřebné informace ohledně nákupu syrového kravského mléka byly získány krátkým dotazníkovým šetřením zaměřeným pouze na osoby, které syrové mléko nakupují z mléčných automatů. Respondenti byli osloveni osobně a zjištěné informace byly zapsány do tištěné formy dotazníku v místě šetření. Vlastní šetření probíhalo u mléčného automatu (Terno České Budějovice) v období od listopadu 2015 do února 2016. Celkem bylo osloveno 51 respondentů. Podrobnosti jsou komentovány v samostatné kapitole 4.

Dotazníkové šetření bylo složeno kromě identifikačních otázek (pohlaví, věk, vzdělání, obor) z následujících otázek:

**Jak často nakupujete mléko z mléčného automatu?** (1. 3-5x týdně, 2. 1-2x týdně, 3. 1-2x měsíčně, 4. 3-5x měsíčně)

**Jakým způsobem zakoupené mléko převážíte?** (1. auto, 2. veřejná doprava, 3. kolo, 4. pěšky)

**Jaký preferujete materiál pro skladování zakoupeného mléka?** (1. plast, 2. sklo)

**Jak dlouho trvá převoz zakoupeného mléka?** (1. do 30 minut, 2. do 1 hodiny, 3. nad 1 hodinu)

**Jakým způsobem mléko z mléčného automatu upravíte před konzumací?** (1. tepelná úprava, 2. bez úpravy)

**Jak dlouho trvá, než zpracujete 1 l syrového mléka?** (1. 1 den, 2. 2 dny, 3. 3 dny)

**Z jakého důvodu dáváte přednost syrovému mléku před mlékem čerstvým/trvanlivým z obchodu?**

**Konzumuje syrové mléko celá rodina?** (1. ano – včetně dětí, seniorů, těhotných žen, 2. ne)



### **3.4 Statistické vyhodnocení dat**

Získaná data byla vyhodnocena s využitím programu Microsoft Office Excel 2010 a Statistica 12 (StatSoft ČR). Byly vypočteny základní statistické charakteristiky (střední hodnoty, charakteristiky variability), příp. vytvořeny tabulky četností.

#### ***Vyhodnocení celkového počtu mikroorganismů***

Počty mikroorganismů byly vyjádřeny kromě tis./1 ml také v logaritmických jednotkách. Pro vyhodnocení vlivu teploty a času byla zvolena jednofaktorová analýza rozptylu, statistické průkaznosti mezi skupinami byly ověřeny LSD testem při obvyklých hladinách významnosti.

#### ***Vyhodnocení dotazníkového šetření***

Četnosti byly vyjádřeny (pokud není v textu uvedeno jinak) vždy k celkovému počtu odpovědí v dané skupině. Pro vyhodnocení byly zvoleny kontingenční tabulky, k ověření statistické průkaznosti byl zvolen Pearsonův chí-kvadrát test.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Dynamika celkového počtu mikroorganismů

Jedním z nejdůležitějších ukazatelů jakosti syrového mléka je celkový počet mikroorganismů (CPM), který je sledován společně s rezidui inhibičních látek (RIL) a počtem somatických buněk (PSB) v rámci legislativních předpisů EU.

#### 4.1.1 Přehled základních výsledků hodnot CPM u jednotlivých pokusů

Vzorky mléka byly odebírány v období od září 2015 do února 2016. Hodnoty CPM kontrolních vzorků (teplota uchování vzorků  $6 \pm 2$  °C) v hodině 0 se pohybovaly v rozpětí od  $9,1 \times 10^4$  do  $1,2 \times 10^5$  KTJ/ml (**Tab. 4**). Pro syrové mléko určené k dalšímu zpracování je limit  $3,0 \times 10^5$  KTJ/ml (Zákon č. 166/1999 Sb.).

Významný vliv na hodnotu CPM má počáteční kontaminace získávaného mléka (ERKMEN a BOZOGLU, 2016). Součástí CPM jsou též psychrotrofní mikroorganismy, pokud jimi bylo mléko kontaminováno, tak jejich množení pokračovalo i přes zchlazení. S přihlédnutím k časovému odstupu mezi jednotlivými plněními mléčného automatu, mohl být tento čas dostatečný k dosažení námi zjištěných hraničních hodnot CPM. PERKO (2011) zkoumal vliv doby skladování mléka při teplotě 4 °C na množení mikroorganismů. Autor ve své studii zjistil, že počáteční hodnoty CPM (den 0) byly navýšeny již během 1. kontrolního dne ( $2,7 \times 10^5$ , resp.  $3,8 \times 10^5$  KTJ/ml). Ještě větší nárůst autor pozoroval u psychrotrofních mikroorganismů (den 0. -  $1,9 \times 10^4$  KTJ/ml, den 1. -  $2,3 \times 10^4$  KTJ/ml, den 2. -  $4,5 \times 10^4$  KTJ/ml).

Vzhledem k tomu, že po odběru syrového mléka nenastal zřetelný proplach dávkovače mléka, mohlo vyšší hodnotu CPM v kontrolních vzorcích (1. odebíraný vzorek) způsobit i pořadí odebraných vzorků. Po každém dávkování mléka zůstalo v dávkovači minimální množství syrového mléka, které plně přišlo do kontaktu s vnějším prostředím, tudíž v něm mohlo dojít k silnému nárůstu mikroorganismů.

Z výsledků je dále patrné, že mezi použitými teplotami přerušení chladírenského řetězce byl potvrzen rozdíl v rozvoji CPM. Ve 3. a 4. pokusu (15 °C) byly počty CPM ve stejných časech téměř shodné, kdežto v 1. a 2. pokusu (30 °C) je evidentní rozdíl.

**Tabulka 4 - Hodnoty CPM (KTJ/ml; log KTJ/ml) v syrovém kravském mléce v rámci jednotlivých pokusů**

CPM [KTJ/ml]								
Pokus								
Čas [h]	1. pokus		2. pokus		3. pokus		4. pokus	
	Teplota [°C]							
	6	30	6	30	6	15	6	15
0	9,1x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>
1	-	7,8x10 <sup>5</sup>	-	1,5x10 <sup>5</sup>	-	2,0x10 <sup>5</sup>	-	1,2x10 <sup>5</sup>
2	-	8,8x10 <sup>5</sup>	-	2,0x10 <sup>5</sup>	-	1,8x10 <sup>5</sup>	-	2,6x10 <sup>5</sup>
3	-	4,1x10 <sup>6</sup>	-	6,0x10 <sup>5</sup>	-	2,0x10 <sup>5</sup>	-	3,0x10 <sup>5</sup>
24	2,4x10 <sup>6</sup>	6,1x10 <sup>7</sup>	2,2x10 <sup>5</sup>	7,6x10 <sup>5</sup>	6,8x10 <sup>5</sup>	9,9x10 <sup>5</sup>	8,2x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>6</sup>
25	-	5,8x10 <sup>7</sup>	-	1,0x10 <sup>6</sup>	-	1,2x10 <sup>6</sup>	-	1,6x10 <sup>6</sup>
26	-	1,0x10 <sup>7</sup>	-	2,4x10 <sup>6</sup>	-	1,2x10 <sup>6</sup>	-	2,5x10 <sup>6</sup>
27	-	1,4x10 <sup>7</sup>	-	4,0x10 <sup>7</sup>	-	1,3x10 <sup>6</sup>	-	1,6x10 <sup>7</sup>
CPM [log KTJ/ml]								
Pokus								
Čas [h]	1. pokus		2. pokus		3. pokus		4. pokus	
	Teplota [°C]							
	6	30	6	30	6	15	6	15
0	4,96	5,93	5,04	5,18	5,08	5,18	5,04	5,08
1	-	5,89	-	5,18	-	5,30	-	5,34
2	-	5,94	-	5,30	-	5,26	-	5,41
3	-	6,61	-	5,78	-	5,30	-	5,48
24	6,38	7,79	5,34	5,88	5,83	6,00	5,91	6,04
25	-	7,76	-	6,00	-	6,08	-	6,20
26	-	7,00	-	6,38	-	6,08	-	6,40
27	-	7,15	-	7,60	-	6,11	-	7,20

CPM: celkový počet mikroorganismů; log: dekadický logaritmus; KTJ: kolonie tvořící jednotka

#### 4.1.2 Vliv teploty a času na CPM

Průměrné hodnoty CPM rostly se zvyšující se teplotou (6 °C – 5,45 ± 0,5 log KTJ/ml; 15 °C – 5,78 ± 0,6 log KTJ/ml; 30 °C – 6,34 ± 0,9 log KTJ/ml) (**Tab. 5**). Zjištěné výsledky byly statisticky významné ( $p < 0,05$ ). Růst CPM byl potvrzen již po dvou hodinách uchovávání při teplotě 15 a 30 °C (15 °C – 5,13, resp. 5,34 log KTJ/ml; 30 °C – 5,56, resp. 5,62 log KTJ/ml). SLÁDKOVÁ et al. (2006) zjistili, že nárůst CPM nastal při 22 °C již za 8 hodin. Ve studii CHRAMOSTOVÉ et al. (2014b) byl potvrzen nárůst vybraných kmenů mikroorganismů při 10 – 12 °C v syrovém mléce již první kontrolní den.

**Tabulka 5 - Vliv teploty na hodnoty CPM (KTJ/ml; log KTJ/ml) v syrovém mléce.**

CPM			log			p
Teplota [°C]	n	x	x	s <sub>x</sub>	v%	
6	8	2,8x10 <sup>5</sup>	5,45	0,5	10	0,0142
15	16	6,0x10 <sup>5</sup>	5,78	0,6	10	
30	16	2,2x10 <sup>6</sup>	6,34	0,9	14	

CPM: celkový počet mikroorganismů; log: dekadický logaritmus; n: počet údajů; x: průměr; s<sub>x</sub>: směrodatná odchylka, v%: variační koeficient = (s<sub>x</sub>/x).100, p (teplota) = hladina významnosti (počítáno pouze pro průměrné hodnoty log KTJ/ml)

Výsledky dále poukazují na vyšší variační koeficient (pro 6 a 15 °C – 10 %; pro 30 °C – 14 %), který je nejspíše dán dříve zmiňovanou rozdílnou počáteční kontaminací u jednotlivých vzorků. Rozdílná počáteční kontaminace vzorků mohla být způsobena i rozdílným ročním obdobím odběru (od září 2015 do února 2016), při působení rozdílných klimatických podmínek. Následkem vyšších teplot prostředí se mohla zhoršit zoohygienická úroveň ve stájích dojníc a hygiena získávání mléka. CEMPÍRKOVÁ (2001) uvádí, že v chovech dojníc lze obecně pozorovat sezónní vývoj mikrobiální kontaminace, přičemž zvýšení CPM je nejvíce patrné v měsících leden – únor a říjen – prosinec. HAVRÁNKOVÁ (2014) naopak zjistila, že nejvyšší nárůst CPM nastal v letním období.

Nárůst CPM od hodiny 0 nastal u všech zkoumaných vzorků, přičemž růst CPM byl významný se zvyšující se teplotou i s časem (**Tab. 6**). Každý mikrobiální enzym, který se podílí na katalytických reakcích, má svou optimální reakční teplotu. Rychlost metabolismu se tedy odvíjí od teploty prostředí (INGRAHAM et al., 2006). Působením nízkých teplot se generační čas mikroorganismů prodlužuje a působením optimálních teplot se generační doba zkracuje (INGRAHAM et al., 2006). ERKMEN a BOZOGLU (2016) uvádějí, že mezofilní mikroorganismy vykazovaly při 30 °C o polovinu kratší generační čas ve srovnání s 20 °C (27 min, resp. 56 min).

CHRAMOSTOVÁ et al. (2014b) uvádějí, že generační čas psychrotrofních mikroorganismů se při 4 - 5 °C pohybuje v rozmezí 5 - 20 hodin. Z našich výsledků vyplývá, že největší rozdíly v počtu CPM byly mezi 6 °C a 30 °C, výsledky byly statisticky významné ( $p < 0,05$ ). Toto zjištění je v souladu s výsledky SLÁDKOVÉ et al. (2006), kteří zaznamenali největší rozdíl v růstu mikroorganismů mezi teplotami 7 °C a 27 °C ( $3,6 \times 10^1$ , resp.  $1,7 \times 10^4$  KTJ/ml). Vliv teploty na růst psychrotrofních mikroorganismů potvrzují i CHRAMOSTOVÁ et al. (2014b). Uvedení autoři zjistili, že při teplotě skladování 4 °C vykazovalo růst 47 % studovaných kmenů. Při teplotách skladování v rozmezí 10 - 12 °C rostly počty většiny testovaných kmenů (96 %).

Jak již bylo dříve zmíněno, průměrné hodnoty CPM u kontrolních vzorků (6 °C) v hodině 0 byly v souladu s limitní hodnotou ( $< 3,0 \times 10^5$  KTJ/ml - Zákon č. 166/1999 Sb.). U testovaných vzorků (15 °C) byly v hodině 0 průměrné hodnoty též v souladu s povoleným limitem pro CPM -  $1,4 \times 10^5$  KTJ/ml. U testovaných vzorků (30 °C) byly v hodině 0 průměrné hodnoty již nad povoleným limitem -  $3,6 \times 10^5$  KTJ/ml.

**Tabulka 6 – Průměrné hodnoty CPM (KTJ/ml; log KTJ/ml) v syrovém kravském mléce v závislosti na teplotě a času.**

čas [h]	CPM			log		
	teplota [°C]			teplota [°C]		
	6	15	30	6	15	30
0	$1,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	5,03	5,13	5,56
24	$7,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$	5,87	6,02	6,83

CPM: celkový počet mikroorganismů; log: dekadický logaritmus; KTJ: kolonie tvořící jednotka; p (teplota) = 0,0398; p (čas) = 0,0039 (hladina významnosti; počítáno pouze pro průměrné hodnoty log KTJ/ml)

Rozdíl v hodnotách CPM mezi hodinou 0 a hodinou 24 je patrný u všech zkoumaných vzorků. Vliv délky uchovávání byl statisticky významný ( $p < 0,01$ ). Tento výsledek je zajímavý zejména v souvislosti s kontrolním vzorkem uchovávaným při chladničkových teplotách po takto krátký čas. GRANT (1955), který zkoumal vliv doby skladování v hodinách 0, 24, 48, 72 a 96 při 40 °F (4,5 °C) na růst mikroorganismů v syrovém mléce, zjistil, že rozdíl mezi 0 a 48 hodinou v počtu mikroorganismů nastal, ale byl nízký (4295, resp. 4566 KTJ/ml). Teprve třetí den byl nárůst mikroorganismů téměř o polovinu vyšší (8247 KTJ/ml) a na konci pokusu autor zjistil nárůst až na 19693 KTJ/ml. CHRAMOSTOVÁ et al. (2014b) ve své studii popsali tři různé trendy růstu zkoumaných kmenů při teplotě  $2 - 4 \pm 1$  °C. Zjistili, že 37 % izolátů vykazovalo v průběhu skladování pokles CPM, 16 %

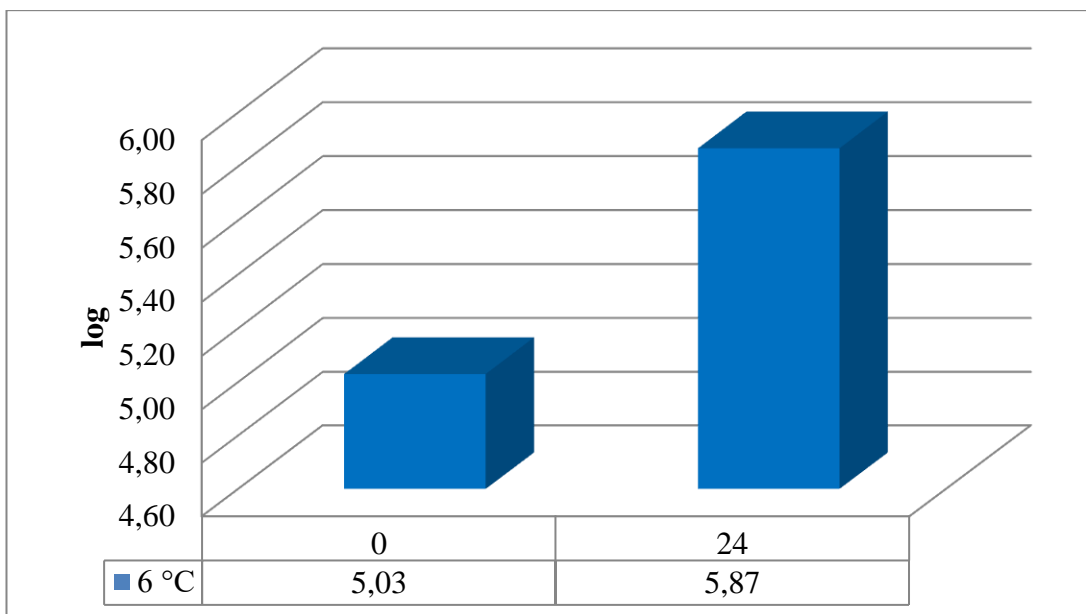
izolátů vykazovalo po prvním dni pokles, ale poté již změny nenastaly. 47 % studovaných kmenů vykazovalo taktéž po prvním dni skladování pokles, ale po 48 hodinách opětovný růst. Opětovný růst v průběhu skladování vykazovaly zejména kmeny *Pseudomonas* spp.

Podle uvedených studií se mikroorganismy uchovávané při  $\pm 4$  °C dostanou do exponenciální fáze růstu za 2 – 4 dny. Lze usuzovat, že ve zkoumaných vzorcích, které byly použity pro naši studii, převažovaly psychrotrofní mikroorganismy.

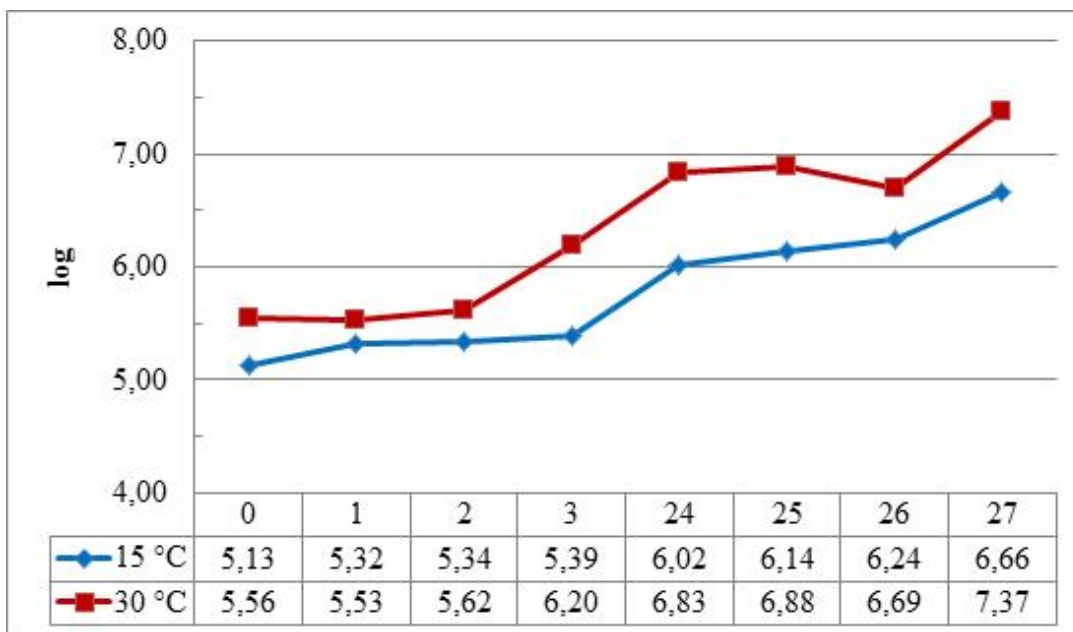
Byl pozorován nárůst mikroorganismů v syrovém mléce při 6 °C z 5,03 log KTJ/ml na 5,87 log KTJ/ml za 24 hodin (**Graf 1**). Při teplotě 15 °C bylo této hodnoty dosaženo mezi 3. – 24. hodinou a při teplotě 30 °C bylo této hodnoty dosaženo již za  $\pm 2,5$  hodiny (**Graf 2**). Lze říci, že se stoupající teplotou se zrychlovalo množení mikroorganismů. CHRAMOSTOVÁ et al. (2014b) zjistili, že první kontrolní den nárůst počtu mikroorganismů o více než jeden řád nastal u 43,8 % vzorků skladovaných při teplotě 2 - 4 °C. Autoři dále zjistili, že při teplotách skladování v rozmezí 10 - 12 °C tento nárůst nastal u 56,3 % testovaných vzorků. Po dvou dnech skladování rostly počty mikroorganismů u všech vzorků syrového mléka, při teplotě skladování 10 - 12 °C výrazněji. MALACARNE et al. (2013) rovněž zkoumali vliv teploty na rychlost množení mikroorganismů a zjistili, že při 6 °C byl nárůst z 5,02 log KTJ/ml na 5,12 log KTJ/ml po 48 hodinách. Při 10 °C bylo stejné hodnoty dosaženo za 24 hodin a při 15 °C již za 12 hodin.

Zajímavé je, že MALACARNE et al. (2013) pro pokus použili mléko téměř stejné mikrobiologické kvality (hodina 0 - 5,02 log KTJ/ml) jako v naší studii (hodina 0 - 5,03 log KTJ/ml). Po 48 hodinách trvání pokusu však vykazovali mnohem nižší CPM v porovnání s naším pokusem po 24 hodinách (5,12 log KTJ/ml, resp. 5,87 log KTJ/ml). Uvedený rozdíl mohl být např. způsoben prodlouženou lag fází mikroorganismů v uvedené studii v porovnání s naší studií, v níž mikroorganismy v testovaných vzorcích již mohly být adaptovány na dané prostředí. Význam adaptace mikroorganismů na dané prostředí uvádí též GUINOT-THOMAS et al. (1995), kteří zkoumali nárůst mikroorganismů v syrovém mléce při 4 °C. Uvedení autoři zjistili, že přítomné mikroorganismy byly dva dny v lag fázi a teprve za 4 - 6 dnů se dostaly na počátek stacionární fáze růstu s konečnými hodnotami  $10^6$  -  $10^7$  KTJ/ml.

**Graf 1 - Vliv délky uchovávání syrového mléka při 4 °C na dynamiku růstu CPM [log KTJ/ml] v čase (0 h;24 h)**



**Graf 2 – Vliv délky uchovávání syrového mléka při 15 °C a 30 °C na dynamiku růstu CMP [log KTJ/ml] v čase (0 h – 27 h)**



Hodnoty CPM v rozmezí 0 - 3 hodiny pro vzorky mléka, které byly uchovávány při 15 °C, se příliš neměnily (5,13, resp. 5,39 log KTJ/ml). Obdobný trend vykazovaly hodnoty CPM zjištěné v rozmezí 0 - 2 hodiny pro vzorky uchovávané při 30 °C (5,56, resp. 5,62 log KTJ/ml). Teprve po 3 hodinách nastal rapidní nárůst hodnoty CPM (6,20 log KTJ/ml), nejspíše v důsledku přechodu z lag fáze do exponenciální fáze růstu.

Vzorky mléka uchovávané při 15 a 30 °C byly po 3 hodinách uloženy do chladničky. Z výsledků je patrné, že i po zchlazení růst mikroorganismů neustal. Trend růstu mikroorganismů pro 15 a 30 °C mezi 3. - 24. hodinou zůstal téměř nezměněn (15 °C – 5,39, resp. 6,02 log KTJ/ml; 30 °C – 6,20, resp. 6,83 log KTJ/ml). Teprve mezi 24. – 25. hodinou trend růstu výrazně zpomalil (15 °C – 6,02, resp. 6,14 log KTJ/ml; 30 °C – 6,83, resp. 6,88 log KTJ/ml).

Vzorky, které byly vystavené 15 °C, vykazovaly v rozmezí 0 – 27 hodin neustálý nárůst v hodnotách CPM, jehož dynamika se měnila. Obdobně vzorky vystavené 30 °C vykazovaly zpočátku výrazný nárůst v hodnotách CPM, ale mezi 25. - 26. hodinou nastal pokles (6,88, resp. 6,69 log KTJ/ml) a o hodinu později opětovný nárůst (6,69, resp. 7,37 log KTJ/ml). Uvedený pokles CPM mohl být způsoben změnou v životním prostředí mikroorganismů (např. pokles pH, živin), na niž se mikroorganismy musely znovu adaptovat. Obdobné výsledky uvádí ZAHARI et al. (1995), který ve vzorcích pasterovaného mléka zjistil, že dynamika růstu mikroorganismů při 7 °C byla pomalá (den 0. –  $10^2$  -  $10^3$  KTJ/ml; den 5. –  $10^5$  -  $10^6$  KTJ/ml; den 7. –  $10^7$  -  $10^8$  KTJ/ml). Při 25 °C byl nárůst v počtu mikroorganismů rapidní, kdy z původní mikrobiální kontaminace  $10^2$  –  $10^3$  KTJ/ml počet mikroorganismů vzrostl na  $10^7$  -  $10^8$  KTJ/ml již za 20 – 24 hodin.

Vliv teploty a času na hodnoty CPM byl našimi výsledky potvrzen. Hodnoty CPM výrazně ovlivňují nejen zdravotní nezávadnost, ale i trvanlivost mléka (ERKMEN a BOZOGLU, 2016). Je důležité dodržovat zásady správné zoohygienické praxe v celém procesu získávání mléka a udržovat dojnice v dobrém zdravotním stavu (OLIVEIRA et al., 2015). Získané syrové mléko musí být zchlazeno do 150 minut na požadovanou teplotu, aby se zastavil či omezil rozvoj přítomných mikroorganismů (CHRAMOSTOVÁ et al., 2014b).

V prodeji syrového mléka z mléčného automatu je nesmírně důležitá také sanitace mléčného automatu, dále dodržování pravidelných kontrol a výměny syrového mléka. Podle legislativních předpisů (Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004) by mělo být mléko prodáváno maximálně po dobu 48 hodin a po uplynutí této doby by mělo být nahrazeno mlékem novým. CHRAMOSTOVÁ et al. (2014b) doporučují, že maximální doba pro ponechání mléka v mléčném automatu by měla být dokonce 24 hodin. Po zakoupení syrového mléka spotřebitelem je však nezbytné syrové mléko tepelně upravit, aby se eliminovala případná rizika spojená s konzumací syrového mléka a zároveň, aby se prodloužila trvanlivost mléka (CUPÁKOVÁ et al., 2001).



## 4.2 Dotazníkové šetření týkající se nákupu a spotřeby syrového kravského mléka

Dotazníkové šetření bylo zaměřeno pouze na osoby, které nakupují syrové mléko z mléčného automatu. Potřebné informace byly získány od 51 oslovených respondentů, z toho bylo 35 žen (69 %) a 16 mužů (31 %).

### 4.2.1 Nákup syrového kravského mléka v mléčných automatech

Pomocí uzavřených identifikačních otázek bylo zjištěno, že nejčastěji nakupovala syrové mléko skupina respondentů ve věkovém rozpětí 31 - 50 let (49 %) (Tab. 7). Také skupiny respondentů pod 30 let a nad 50 let tvořily významnou část spotřebitelů syrového mléka (nad 50 let – 27 %; pod 30 let - 24 %). Výsledky se shodují s údaji DANIELA (2011), který zjistil, že 53 % oslovených osob (konzumentů mléka z automatu) patřilo do věkového rozpětí 30 až 50 let. Také KOUTSKÁ (2011) zjistila, že tato věková kategorie patří mezi časté konzumenty syrového mléka, neboť 62 % oslovených osob bylo ve věku 30 až 55 let.

Nejčastěji syrové mléko nakupovali respondenti se středoškolským vzděláním (43 %). DANIEL (2011) také zjistil, že nejčastěji v mléčném automatu nakupovali lidé se středoškolským vzděláním (60 %). Autor dále zjistil, že mléko bylo nejvíce oblíbené u lidí, kteří pracovali v potravinářství, zemědělství a státní správě.

Tabulka 7 - Rozložení četností respondentů v závislosti na pohlaví, věku, vzdělání a oboru.

Kategorie	Skupiny	Počet	%
Pohlaví	žena	35	69
	muž	16	31
Věk	pod 30	12	24
	31 - 50	25	49
	nad 50	14	27
Vzdělání	ZŠ, SOU	19	37
	SŠ	22	43
	VOŠ, VŠ	10	20
Obor	Obchod/prodej	10	19
	Potravinářství	5	10
	Zdravotnictví	3	6
	Pedagogický	3	6
	Ekonomický	3	6
	Doprava	3	6
	Ostatní	24	47

Z dotazníkového šetření vyplynulo, že ženy nakupovaly syrové mléko častěji než muži. Četnost nákupu 3 – 5x týdně potvrdilo 40 % žen, zatímco u mužů to bylo pouze 18 % (**Tab. 8**). Zjištěné výsledky potvrzuje DANIEL (2011), který uvádí, že ženy nakupovaly syrové mléko z mléčného automatu častěji (58 %).

KOUTSKÁ (2011) zjistila, že lidé nejvíce nakupují syrové mléko vícekrát týdně (35 %). To je v souladu s výsledky našeho dotazníkového šetření, kde podstatná část respondentů nakupovala v mléčném automatu vícekrát týdně (1 – 2x týdně - 29 %; 3 – 5x týdně – 33 %). SAMKOVÁ et al. (2011) uvádějí, že respondenti preferují denní konzumaci mléka, přičemž tato preference stoupá s věkem a se vzděláním.

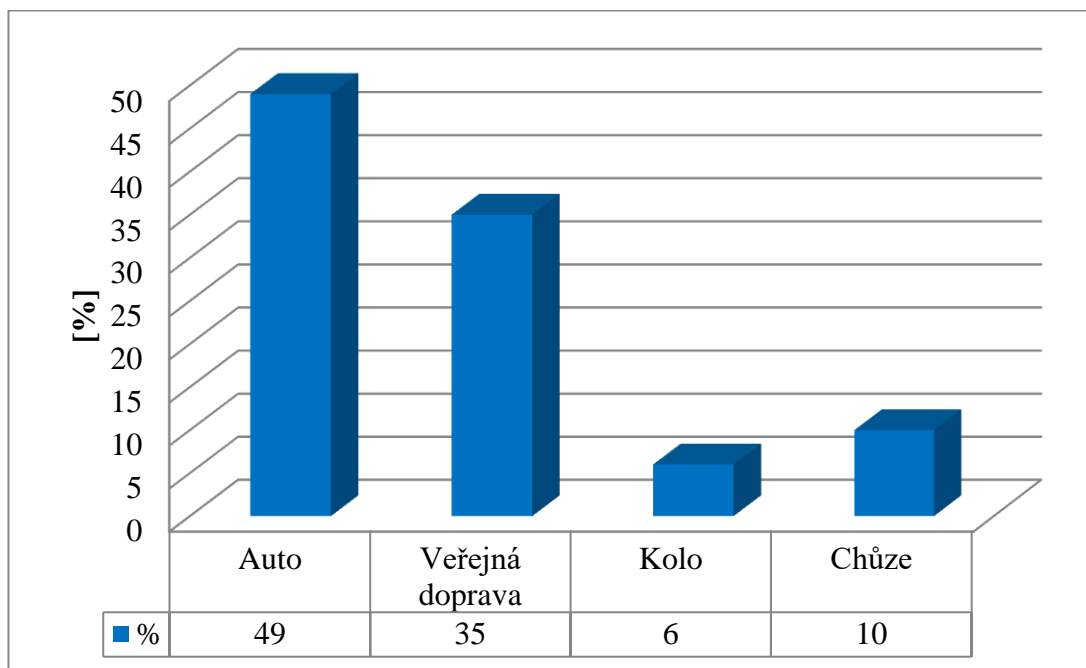
**Tabulka 8 - Četnosti (%) frekvence nákupu syrového mléka v závislosti na pohlaví, věku a vzdělání.**

Kategorie	Skupina	n	3 - 5x týdně	1 - 2x týdně	1 - 2x měsíčně	3 - 5x měsíčně	p
Pohlaví	Žena	35	40	26	14	20	0,4536
	Muž	16	18	38	13	31	
Věk	pod 30	12	41	25	17	17	0,6680
	31 - 50	25	40	28	8	24	
	nad 50	14	14	36	21	29	
Vzdělání	ZŠ, VOU	19	16	41	11	32	0,1580
	SŠ	22	54	18	14	14	
	VOŠ, VŠ	10	20	30	20	30	
Celkem		51	33	29	14	24	

Oslovení respondenti používali pro převoz syrového mléka nejčastěji auto (49 %), dále pak veřejnou dopravu (35 %) (**Graf 3**).

V dotazníkovém šetření byla také zjišťována preference materiálu používaných lahví pro uskladnění syrového mléka. Nejvíce byl využíván plast (71 %) z důvodu lehkosti a pevnosti lahve. Oslovení respondenti, kteří preferovali skleněné lahve, oceňovali snadnou omyvatelnost, delší životnost a uváděli i lepší údržnost teploty zakoupeného mléka, protože pro transport nevyužívali termotašky.

**Graf 3 – Četnosti (%) způsobu převozu syrového mléka.**

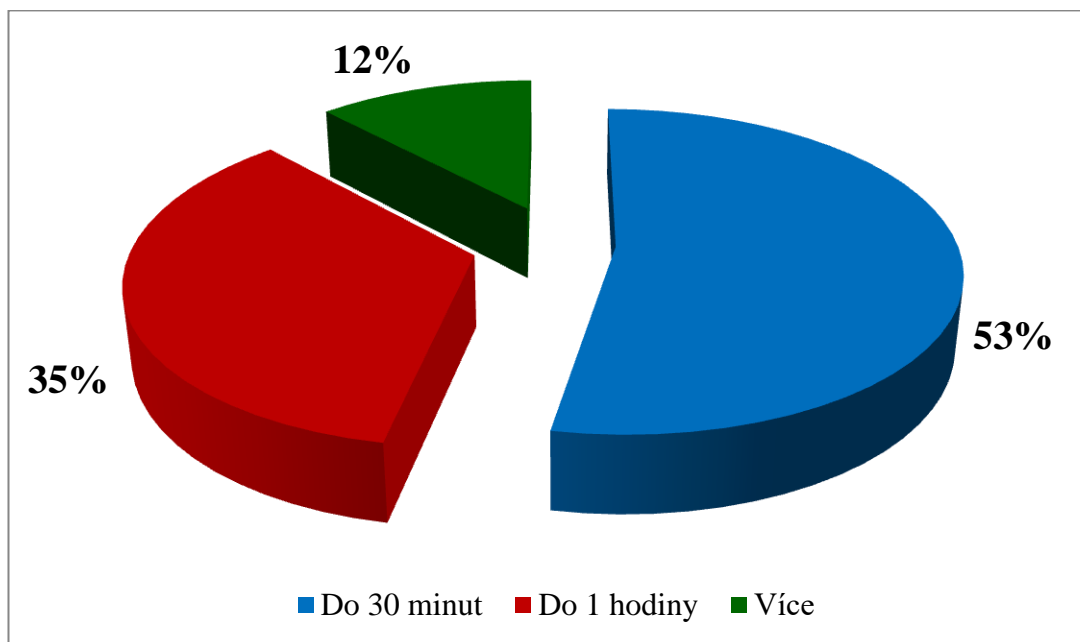


#### **4.2.2 Postoj oslovených respondentů k nákupu a konzumaci syrového mléka**

Dotazníkovým šetřením byla zjišťována délka přerušení chladírenského řetězce (**Graf 4**). Někteří dodavatelé syrového mléka na mléčných automatech uvádějí, že by konzument neměl uchovávat zakoupené mléko při teplotě vyšší než 8 °C déle než 1 hodinu (VFU, 2010; VORLOVÁ, 2010; VRŠKOVÁ, 2011). Toto tvrzení podporuje CHRAMOSTOVÁ et al. (2014b), kteří upozorňují, že nejproblematičtější teploty pro skladování syrového mléka jsou nad 10 °C, při kterých hodnoty CPM značně rostou.

Většina (53 %) respondentů uvedla, že pro převoz mléka si vystačí s časem kratším než 30 minut. 35 % respondentů převáželo syrové mléko maximálně 1 hodinu. Pouze 12 % respondentů uvedlo délku přepravy nad 1 hodinu, přičemž jeden respondent dokonce uvedl čas nad 3 hodiny. V dotazníkovém šetření VORLOVÉ (2010), 33 % oslovených respondentů uvedlo, že jim přeprava mléka trvá déle jak 1 hodinu.

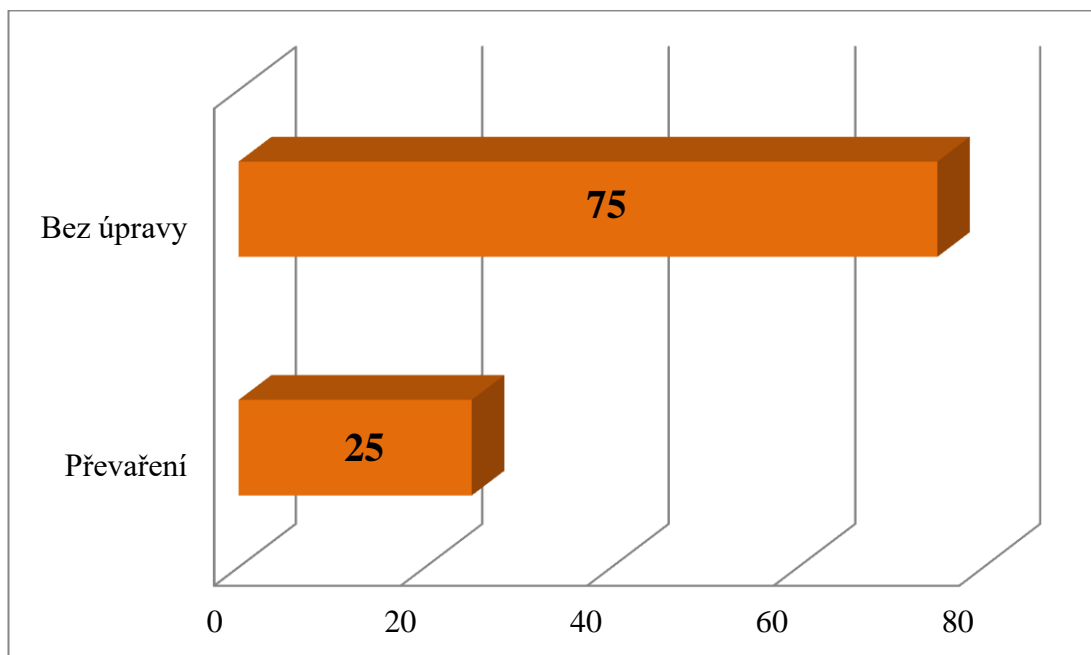
**Graf 4 – Četnosti (%) doby převozu syrového mléka.**



Všechna prodejní místa syrového mléka musí být zřetelně označena nápisem „Syrové mléko, před použitím tepelně opracovat nebo pasterovat“, tento nápis má spotřebitele informovat o skutečnosti, že zakupuje syrovou potravinu, která může být zdrojem potencionálně patogenních mikroorganismů (CUPÁKOVÁ, 2001; Vyhláška č. 289/2007 Sb.).

Z výsledků dotazníkového šetření je zřejmé, že 75 % (**Graf 5**) oslovených respondentů tuto skutečnost nebere na zřetel. Nejčastější uváděné důvody byly, že dotazovaní dosud neměli po konzumaci mléka zdravotní komplikace (90 %) a že tepelně upravené mléko ztrácí svou charakteristickou chuť (71 %). SAMKOVÁ et al. (2011) uvádějí, že 35 % oslovených respondentů se domnívá, že tepelná úprava není potřeba a 40 % nedokázalo na danou otázku odpovědět. K podobným výsledkům dospěla VORLOVÁ (2010), která uvádí, že 32 % oslovených respondentů mléko tepelně neupravuje. Stejně tak KOUTSKÁ (2011) zjistila, že syrové mléko před jeho konzumací 28 % lidí neupravuje. Autorka dále uvádí, že žádní dotazovaní neměli nikdy zdravotní problémy po konzumaci syrového mléka. V našem šetření bylo zjištěno, že pouze 25 % respondentů mléko před konzumací tepelně upravuje. K podobným výsledkům dospěli též jiní autoři. V dotazníkovém šetření SAMKOVÉ et al. (2011), oslovení respondenti z 26 % syrové mléko před konzumací tepelně upraví. VORLOVÁ (2010) zjistila, že téměř polovina (47,4 %) dotazovaných syrové mléko převarí, případně zahřeje (17,3 %). Obdobné výsledky zaznamenala i KOUTSKÁ (2011), která zjistila, že necelá polovina lidí syrové mléko před jeho konzumací převarí (45 %).

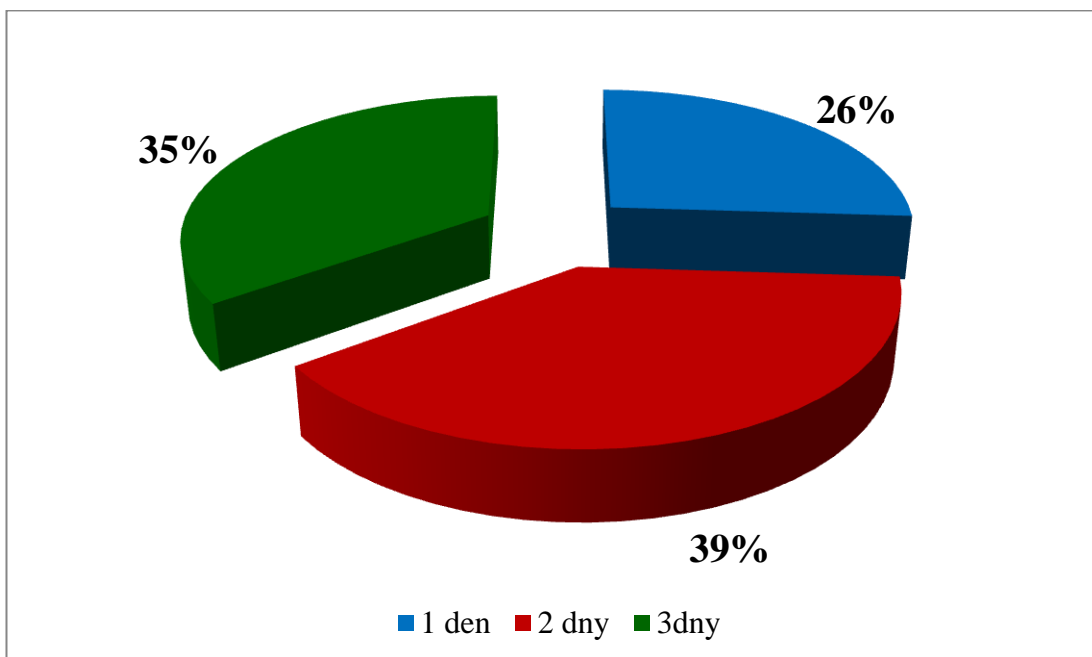
**Graf 5 – Četnosti (%) způsobu ošetření syrového mléka před konzumací.**



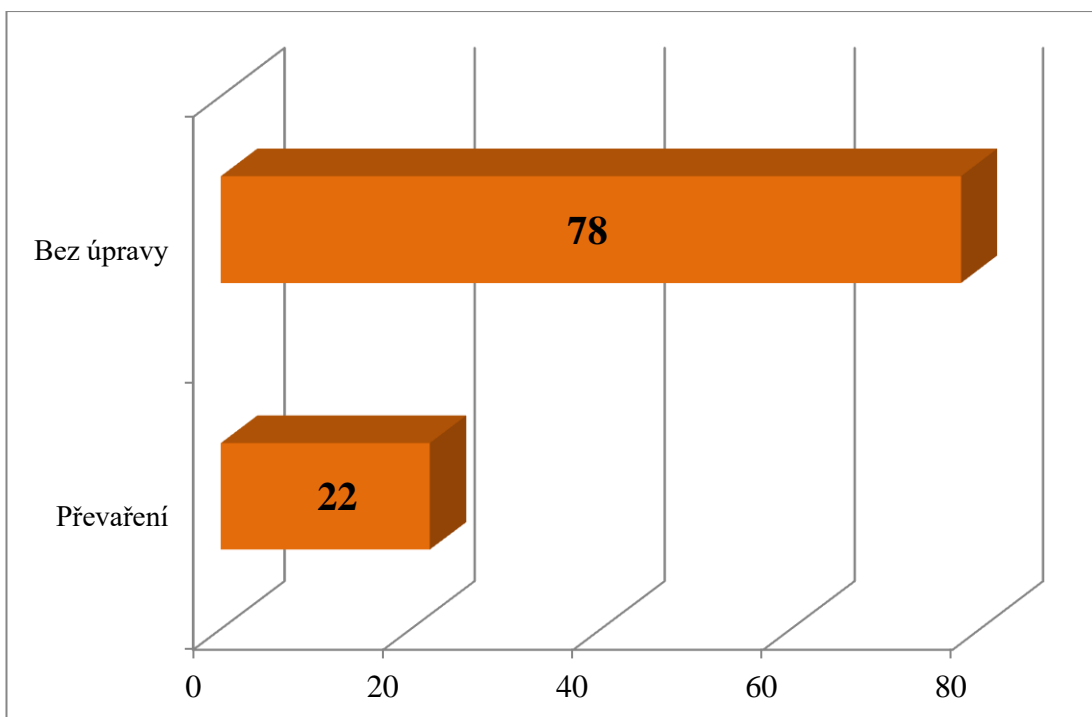
Na každém mléčném automatu by měla být uvedena doba použitelnosti syrového mléka, která je po tepelné úpravě maximálně tři dny (Vyhláška č. 113/2005 Sb.; VORLOVÁ, 2010).

Oslovení respondenti nejčastěji skladovali syrové mléko maximálně do dvou dnů, konkrétně – 26 % (13 respondentů) do jednoho a 39 % (20 respondentů) do dvou dnů (**Graf 6**). 35 % (18 respondentů) prodlužuje délku skladování syrového mléka až na 3 dny, přičemž 78 % (14 respondentů) z nich jej konzumuje bez tepelné úpravy (**Graf 7**). Obdobné výsledky uvádí VORLOVÁ (2010), která zjistila, že 19 % oslovených respondentů spotřebovalo zakoupené syrové mléko do 3 dnů. 10 % dotázaných zpracovalo zakoupené syrové mléko dokonce za dobu delší 3 dnů. K podobným výsledkům dospěla i KOUTSKÁ (2011), která uvádí, že 10 % respondentů spotřebovalo syrové mléko až za 5 – 7 dnů od zakoupení, ale 60 % dotazovaných jej spotřebovalo do 2 dnů.

**Graf 6 - Procentuální vyjádření doby skladování syrového mléka.**



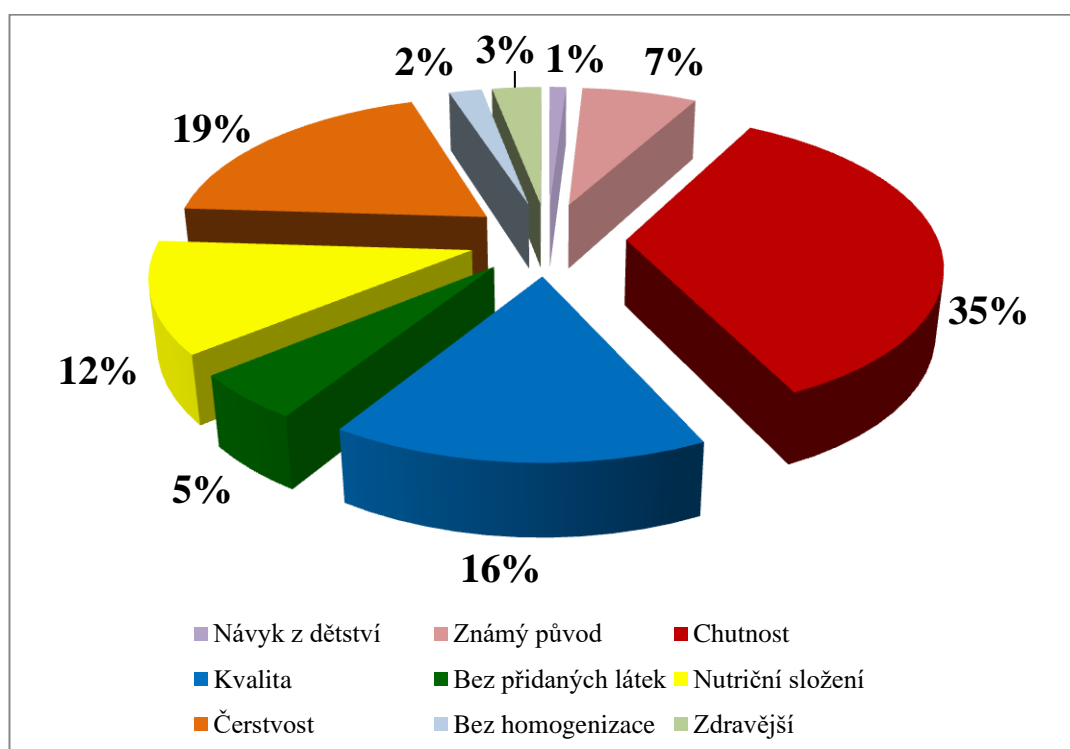
**Graf 7 - Četnosti (%) způsobu ošetření syrového mléka u skupiny lidí, kteří syrové mléko skladují 3 dny (n= 18).**



CHRAMOSTOVÁ et al. (2014b) doporučují dobu skladování syrového mléka co nejvíce zkrátit tak, aby nedocházelo k poškození mléka termostabilními enzymy psychrotrofních bakterií. Psychrotrofní bakterie jsou schopné růst v rozmezí teplot 0 - 30 °C, přičemž jejich generační doba se při 4 - 5 °C pohybuje v rozmezí 5 - 20 hodin. Z toho důvodu uvedení autoři doporučují skladovat syrové mléko maximálně při 4 °C po dobu 24 hodin, čímž se zajistí nízký počet mikroorganismů a dobrá jakost syrového mléka.

V České republice se díky zavedení mléčných automatů a rozšiřování prodeje ze dvora, diskutují pozitiva a případná zdravotní rizika způsobená konzumací syrového mléka. Spotřebitelé, kteří byli osloveni u mléčného automatu, oceňovali jeho chuť (35 %), čerstvost (19 %), kvalitu (16 %) a nutriční hodnotu (12 %). Dále spotřebitelé oceňovali známý původ nakupovaného mléka, a že je mléko v původním stavu bez úprav pasterací, homogenizací a bez přidaných látek (**Graf 8**). Podobné důvody uváděli i respondenti v jiných studiích - lepší chuť (25 %), syrové mléko je zdravější (28 %) než pasterované či UHT mléko (KOUTSKÁ, 2011). Ve studii SAMKOVÉ et al. (2011) se dokonce 93 % respondentů, nakupujících z mléčných automatů, domnívalo, že syrové mléko je zdravější než mléko trvanlivé.

**Graf 8 – Četnosti (%) důvodů preference syrového mléka z mléčného automatu.**



Procenta jsou počítána z celkového počtu odpovědí (n= 107)

Část dotazovaných (5 %) se domnívalo, že do trvanlivého mléka jsou oproti syrovému mléku přidávány různé látky typu sladidel. Průzkum agentury STEM/MARK (2008) ukázal, že dokonce 74 % dotazovaných si myslelo, že trvanlivé mléko obsahuje různé látky (konzervanty, sladidla, barviva atd.). Průzkum dále ukázal, že 86 % lidí považuje syrové mléko za zdravější ve srovnání s mlékem trvanlivým.

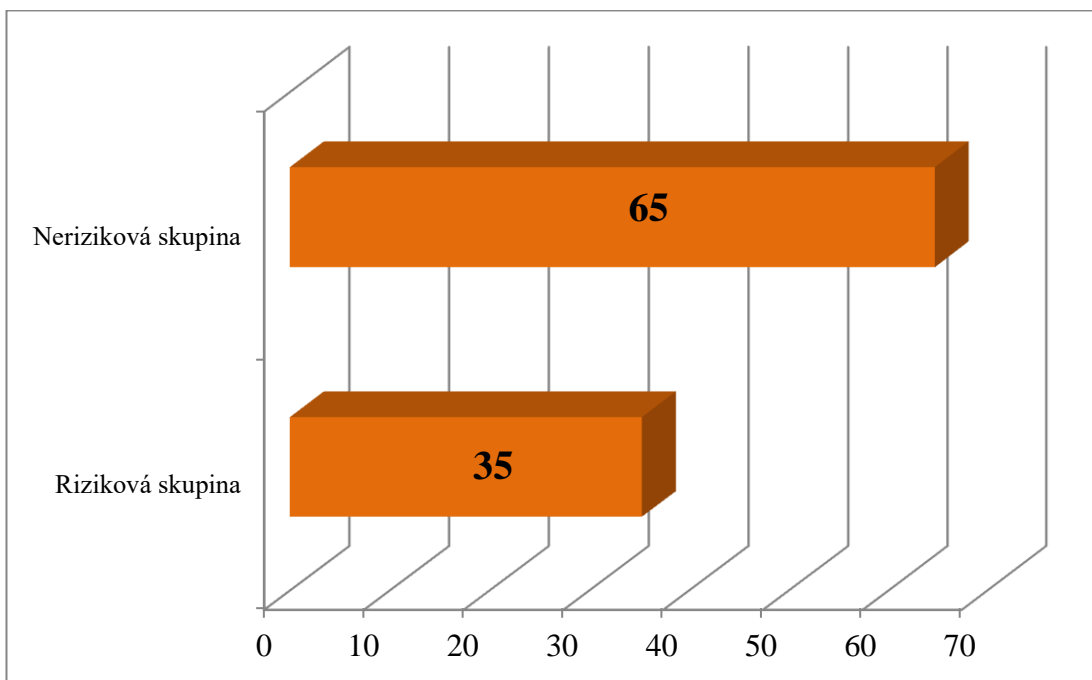
Zjištěné informace svědčí o neznalosti konzumentů o mlékárenském zpracování mléka, protože do mléka konzumního je zakázáno přidávat jakékoliv přídatné látky (KOPÁČEK, 2014). Nutriční složení mléka by šetrným tepelným ošetřením nemělo být výrazně ovlivněno a takto ošetřené mléko má zachované i sensorické vlastnosti. Vlivem šetrného tepelného ošetření dochází pouze k částečné denaturaci syrovátkových bílkovin a k částečnému snížení obsahu vitamínů a minerálních látek (CLAEYS et al., 2013).

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2015) vydalo oznámení o vzrůstající konzumaci syrového mléka v celé EU, protože lidé věří v jeho příznivé účinky na zdraví. EFSA zároveň upozorňuje na možná rizika plynoucí z konzumace syrového mléka, přičemž nejvíce ohrožené jsou tzv. rizikové skupiny. Ve vyspělých zemích a v zemích EU je až 20 % populace, která je náchylnější k alimentárním onemocněním. Do rizikových skupin jsou řazeni lidé s imunodeficiencí, diabetici, lidé s onemocněním ledvin a jater, novorozenci, děti, senioři a těhotné ženy. Těmto lidem stačí konzumace minimálního množství patogenních mikroorganismů, aby se projevilo onemocnění (PALÁNOVÁ et al., 2016).

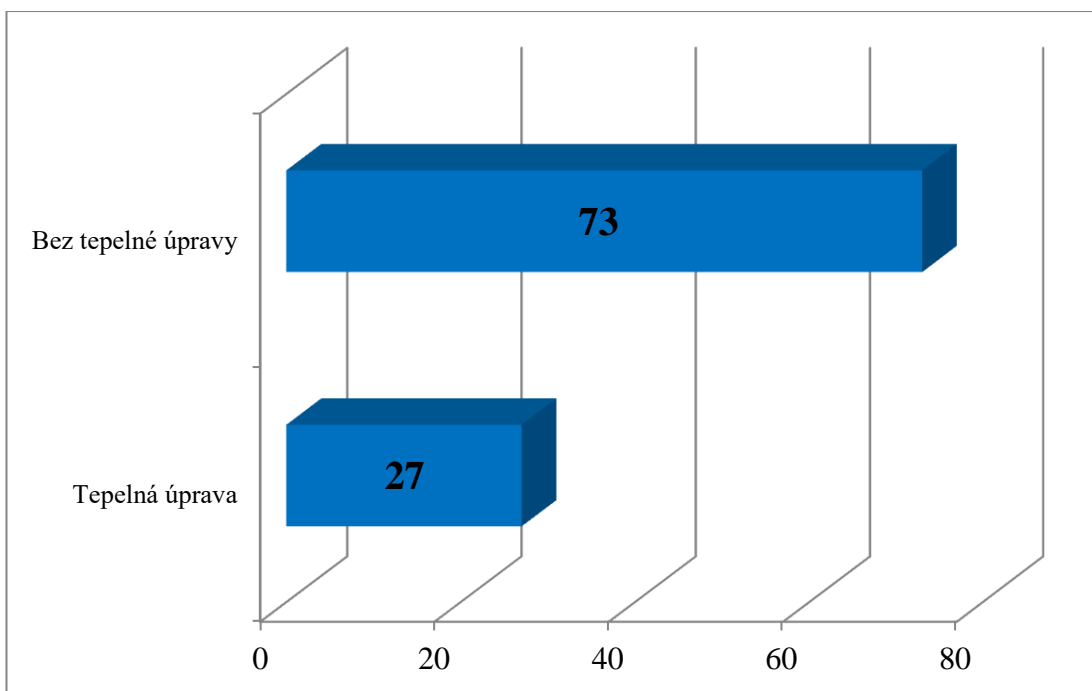
Z dotazníkového šetření bylo dále zjištěno, že syrové mléko bylo nejvíce konzumováno osobami (65 %), které nepatří mezi rizikové skupiny (tj. zdraví, dospělí lidé) (**Graf 9**). Významnými konzumenty syrového mléka byly však i osoby patřící mezi rizikové skupiny (35 %), které také toto mléko nejčastěji konzumovali jako tepelně neupravené (73 %) (**Graf 10**). Zajímavé výsledky uvádí KOUTSKÁ (2011), která zjistila, že 42 % rodin oslovených respondentů konzumují syrové mléko, včetně dětí v průměrném věku 13 let. Autorka dále zjistila, že konzumace syrového mléka pouze dospělými osobami byla nízká (15 %).



**Graf 9 – Četnosti (%) konzumace syrového mléka rizikovými skupinami.**



**Graf 10- Četnosti (%) konzumace tepelně neupraveného syrového mléka rizikovými skupinami (n=18).**



V průběhu našeho dotazníkového šetření byl osloven muž, který syrové kravské mléko tepelně neošetřuje, ale pokud jej podává dětem, tak pouze po tepelném ošetření. Ostatní respondenti, u kterých syrové kravské mléko konzumuje celá rodina včetně rizikových skupin, nedělali rozdíl v úpravě pro jednotlivé členy rodiny. Vedle toho byla oslovena žena s přístupem k syrovému kozímu mléku, které bez úpravy konzumuje celá rodina včetně dětí. Za zmínku stojí, že u hospodářských zvířat (skot, ovce, kozy) infikovaných virem klíšťové meningoencefalitidy (KME) dochází k virémii, při které virus může přecházet do mléka. V České republice došlo v letech 1997 - 2008 k přenosu infekce tímto způsobem u 64 nemocných (0,9 %). Ve většině případů se jednalo o tepelně neupravené kozí mléko a šlo o rodinné výskyty (SMETANA, 2011). Poslední záznam o této infekci je z roku 2014 z Libereckého kraje, kdy byly postiženy tři osoby (DUBEN, 2014). Obdobný případ se stal v říjnu 2011 v Maďarsku, který byl však spojen s konzumací syrového kravského mléka. Tato událost byla pravděpodobně prvním případem přenosu infekce KME syrovým kravským mlékem v rámci Evropské unie. Ve všech ostatních případech se jednalo o kozí nebo ovčí mléko (CAINI, 2012).

## 5 ZÁVĚR

Hlavním ukazatelem mikrobiologické jakosti syrového mléka je celkový počet mikroorganismů (CPM), který je indikátorem hygienických podmínek v celé technologii dojení a úpravy mléka po nadojení a rovněž slouží jako kritérium pro proplácení mléka.

Průměrné hodnoty CPM u kontrolních vzorků (6 °C) v hodině 0 byly v souladu s limitní hodnotou ( $9,1 \times 10^4 - 1,2 \times 10^5$  KTJ/ml  $< 3,0 \times 10^5$  KTJ/ml). U testovaných vzorků (15 °C) byly v hodině 0 průměrné hodnoty též v souladu s povoleným limitem pro CPM -  $1,4 \times 10^5$  KTJ/ml. U testovaných vzorků (30 °C) byly v hodině 0 průměrné hodnoty již nad povoleným limitem -  $3,6 \times 10^5$  KTJ/ml.

Rozdíl mezi počáteční hodnotou CPM a hodnotou zjištěnou po 24 hodinách uchovávání syrového mléka při 6 °C byl 5,03, resp. 5,87 log KTJ/ml;  $p < 0,01$ . Vzorky, které byly uchovávány první tři hodiny pokusu při 15 °C, vykazovaly v čase 0 - 27 hodin neustálý nárůst v hodnotách CPM. Obdobně vzorky, které byly vystavené 30 °C, vykazovaly zpočátku výrazný nárůst CPM, ale mezi 25. a 26. hodinou nastal pokles (6,88, resp. 6,69 log KTJ/ml) a o hodinu později opětovný nárůst (6,69, resp. 7,37 log KTJ/ml). Zjištěné výsledky potvrzují, že teplota prostředí a čas spolu velice úzce souvisí. Z těchto důvodů je nutné manipulovat se syrovým mlékem a uchovávat jej za takových podmínek, aby se co nejvíce prodloužila trvanlivost dané potraviny.

Dotazníkové šetření ukázalo, že 75 % oslovených respondentů zakoupené syrové mléko před konzumací tepelně neupravuje, přesto, že jsou všechna prodejní místa syrového mléka povinně označena nápisem „Syrové mléko, před použitím tepelně opracovat nebo pasterovat“. Dále bylo zjištěno, že syrové mléko je konzumováno i respondenty, kteří spadají do tzv. rizikových skupin (35 %), přičemž mnoho z nich konzumuje syrové mléko tepelně neupravené (73 %). Oslovení respondenti zejména oceňovali chuť syrového mléka (35 %), čerstvost (19 %), kvalitu (16 %) a nutriční hodnotu (12 %).

V dotazníkovém šetření bylo zjišťováno i chování konzumentů při nákupu syrového kravského mléka z mléčných automatů. Za příznivé lze považovat zjištění, že většina (53 %) respondentů obvykle přepravuje syrové mléko po zakoupení maximálně 30 minut. Za varující lze označit zjištění, že 35 % respondentů uchovává syrové mléko i tři dny a toto pak tepelně neupravují.

S ohledem k tomu, že mléko jakožto surovina živočišného původu může být potenciálním zdrojem patogenů, je třeba s ním zacházet patřičným způsobem od získávání, přes ošetřování, skladování a konečnou úpravu u konzumenta. Zejména ve vztahu k rizikovým skupinám je třeba podporovat informovanost obyvatel.

## 6 SUMMARY

Raw milk is one of the most monitored product not only in terms of microbial, but also in terms of technology, chemistry and sensory.

The aim of the thesis was the examination of the influence of cold chain interruptions on dynamic of total bacteria count (TBC) in raw cow milk. The results show that the temperature and time have a significant impact on TBC.

The samples stored during the first three hours of experiment at 15 °C showed (in time 0 – 27 hours) a continuous growth with changing dynamic (5.13, 6.66, resp. log CFU/ml). The samples stored at 30 °C showed a significant increase, however there was a decrease between an hour of 25<sup>th</sup> and 26<sup>th</sup> (6.88, 6.69, resp. log CFU/ml). An hour later another increase was found (to 7.37 log CFU/ml). The samples stored at 6 °C showed the lowest values of TBC, although an increase was found after 24 hours (5.87 log CFU/ml).

The second part of the thesis was an evaluation of the questionnaire survey among people consuming raw cow milk from a vending machine. The survey showed that more than a half of respondents (88%) interrupt the cold chain for no more than an hour. Then it was found that 75% of respondents do not overcook raw milk. The consumers appreciate the taste of raw milk (35%), freshness (19%), quality (16%), and a nutritional value (12%).

**Key words:** raw milk, total bacteria count, milk quality, questionnaire survey

## 7 SEZNAM LITERATURY

AXELSSON, L. (2004): Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. 1-66, In: *Lactic acid bacteria - Microbiological and functional aspects*. Salminen, S. a kol., 3<sup>rd</sup>. USA, 633 ss. ISBN 0-8247-5332-1.

BAUMAN, W. R. (2004): Microbial Nutrition and Growth. In: *Microbiology*, Cummings B. Pearson Education.

BELITZ, H. D., GROSCHE W., SCHIEBERLE P. (2004): *Food chemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin: Springer Verlag, 1071 ss. ISBN 978-3-540-408185.

BELLOQUE, J., CHICÓN R., RECIO I. (2009): Quality Control. 72-100, In: *Milk Processing and Quality Management*. Tamime A. Y., 1. United Kingdom: Blackwell Publishing, 324 ss. ISBN 978-1-405 - 1 4530-5.

BEWLEY, J. (2012): Recommended Milking Procedures for Maximum Milk Quality. *Cooperative extension service*. University of Kentucky, 2012, 1-4 s.

BOOR, K. a FROMM H. (2006): Managing microbial spoilage in the dairy industry. 171-188, In: *Food Spoilage Microorganisms*. Blackburn, C. W., USA: Woodhead publishing, 711 ss. ISBN 1-85573-966-6.

BYLUND, G. (2003): *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden, 436 ss. ISBN: 9163134276.

CAINI, S., SZOMOR E., SZÉKELYNÉ GÁSPÁR Á., CSOHÁN Á., KRISZTALOVICS K., MOLNÁR Z., HORVÁTH J. K. (2012): Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Euro Surveill.* 22; 17 (12).

CUPÁKOVÁ, Š., JANŠTOVÁ B., NAVRÁTILOVÁ P., NECIDOVÁ L. (2001): Rizika konzumace syrového kravského mléka. *Veterinářství*, (51): 182-184.

CEMPÍRKOVÁ, R. (2001): Technologie chovu dojnic ve vztahu k hygienické kvalitě mléka. *Collection of Scientific Papers, Series for Animal Sciences*. České Budějovice: Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity, 33 – 46. ISSN 1212-558X.

CEMPÍRKOVÁ, R., SAMKOVÁ E., VYLETĚLOVÁ M. (2012): Celkový počet mikroorganismů. 122 – 127, In: *Mléko: produkce a kvalita*. Samková E., Cempírková E., Hanuš O., Hasoňová L., Hlaváček J., Jelen P., Jeřábková J., Kopáček J., Lužová T., Navrátilová P., Seydlová R., Špička J., Šustová K., Vorlová L., Vyletěllová M., vědecká monografie. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 122-127 s. ISBN 978-80-7394-383-7.

CLAEYS, W. L., CARDOEN S., DAUBE G., DE BLOCK J., DEWETTINCK K., DIERICK K., DE ZUTTER L., HUYGHEBAERT A., IMBERECHTS H.,

THIANGE P., VANDENPLAS Y., HERMAN L. (2013): Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*. 31: 251-262.

DANIEL, R. (2011): Problematika mléčných automatů. *Bakalářská práce*. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

DELAVAL (2008): *Efficient milk filtration*, DeLaval International AB, 36 ss.

DHANASHEKAR, R., S. AKKINPELLI a NELLUTLA A. (2012): Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *Germs*, 3(2), 101-109.

DJADOUNI, F. a KIHAL M. (2012): Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(3), 435-443.

DOLEŽAL, O. (2000): Dojírny. 110 – 126, In: *Mléko, dojení, dojírny*. Doležel O., Hlásný J., Jílek F., Hanuš O., Vegricht J., Pytloun J., Matouš E., Kvapilík J., Praha: Agrospoj.

ERKMEN, O. a BOZOGLU F. (2016): Principles of food spoilage. 269-279, In: *Food Microbiology: Principles Into Practice*. Erkmen O., Bozoglu F., USA: Wiley and sons, 431pp. ISBN: 978-1-119-23776-1.

ERSKINE, R. J. (2014): Mastitis in Cattle. *The Merck veterinary manual*.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2015): Raw drinking milk: what are the risks?. *EFSA Journal* 2015;13(1).

FERNANDES, R. (2009): *Microbiology handbook dairy products*. 1. Velká Británie: Leatherhead Food International. 174 ss. ISBN 978-1-905224-62-3.

FOX, P. F. a McSWEENEY P. L. H. (1998): *Dairy Chemistry and Biochemistry*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 478 ss. ISBN 0-412-72000-0.

GAJDŮŠEK, S., ŠUSTOVÁ K., HABÁŇ R. (1996): Mikrobiologická kvalita syrového kravského mléka. 72 – 73, In: *Nové poznatky v technologii výroby a zpracování mléka*. Sborník – kolektiv autorů. České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing, ISBN 80-85645-23-8.

GOUNOT, A. M. (1986): Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*, 42(11), 1192-1197.

GUINOT-THOMAS, P., AL AMMOURY M., LE ROUX Y., LAURENT F. (1995): Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: Effect of plasmin and microbial proteinases. *International dairy journal* 5(7): 685-697.

GRANT, F. M. (1955): Farm methods of cooling milk. Washington D. C., 16 ss.

GRIEGER, C. a LUKÁŠOVÁ J. (1990): Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. Bratislava, 39–57. ISBN 80-07-00253-7.

HAMMES, W. P. a VOGEL R. F. (1995): The genus *Lactobacillus*. 19-49, In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood B. J. B. a Holzapfer W. H., 2. Velká Británie, 1995. 405 ss. ISBN 978-1-4613-7666-8.

HANTSIS–ZACHAROV, E. a HALPERN M. (2007): Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 22(73): 7162-7168.

HANUŠ, O. (2000): Složení a kvalita mléka. 28 – 62, In: *Mléko, dojení, dojírny*. Doležel O., Hlásný J., Jílek F., Hanuš O., Vegricht J., Pytloun J., Matouš E., Kvapilík J., Praha: Agrospoj.

HANUŠ, O., VYLETĚLOVÁ M., JEŘÁBKOVÁ J. (2012): Kontrola jakosti mléka. 178 – 203, In: *Mléko: produkce a kvalita*. Samková E., Cempírková E., Hanuš O., Hasoňová L., Hlaváček J., Jelen P., Jeřábková J., Kopáček J., Lužová T., Navrátilová P., Seydlová R., Špička J., Šustová K., Vorlová L., Vyleťelová M., vědecká monografie. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 122-127 s. ISBN 978-80-7394-383-7.

HASSAN, A. N. a FRANK J. F. (2011): Microorganisms associated with milk. 447-457, In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Fuquay J. W., Fox P. F. a McSweeney P. L. H. Second Edition, Elsevier, Amsterdam, 4170 ss. ISBN: 978-0-12-374402-9.

HASOŇOVÁ, L. (2012): Potenciální zdravotní rizika konzumace mléka a mléčných výrobků. 204 – 220, In: *Mléko: produkce a kvalita*. Samková E., Cempírková E., Hanuš O., Hasoňová L., Hlaváček J., Jelen P., Jeřábková J., Kopáček J., Lužová T., Navrátilová P., Seydlová R., Špička J., Šustová K., Vorlová L., Vyleťelová M., vědecká monografie. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 122-127 s. ISBN 978-80-7394-383-7.

HAYA, J., GARCÍA A., LÓPEZ-MANZANARA C., BALAWIL M., HAYA L. (2014): Importance of Lactic Acid in Maintaining Vaginal Health: Review of Vaginitis and Vaginosis Etiopathogenic Bases and a Proposal for a New Treatment. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2014, (4), 787-799.

HAYEK, S. A. a IBRAHIM S. A. (2013): Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, (4) 73-87.

HAVRÁNKOVÁ, I. (2014): Mikrobiologická jakost syrového kravského mléka. *Diplomová práce*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.

HOGVEEN, H., HUIJPS K., LAM T. J. (2011): Economic aspects of mastitis: new developments. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(1):16-23, doi: 10.1080/00480169.2011.547165.

CHAMBERS, J. V. (2002): The Microbiology of Raw Milk. 39-90, In: *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products*. Robinson R. K. 3<sup>rd</sup>. USA: Wiley and sons, 765 ss. ISBN 0-471-38596-4.

CHRAMOSTOVÁ, J., HAVLÍKOVÁ Š., PURKRTOVÁ S., NĚMEČKOVÁ I., ROUBA P. (2014a): Potenciál mikroorganismů při kažení mléka a mlékárenských produktů. *Mlékařské listy*, 25(147): 17-20.

CHRAMOSTOVÁ, J., RUBINA N., ŠEDIVCOVÁ V., DRAGON M., NĚMEČKOVÁ I. a ROUBAL P. (2014b): Vliv chladiřenských teplot na růst a proteolytickou činnost mikroorganismů syrového mléka. *Mlékařské listy*, 1(146), 10 – 13.

INGRAHAM, J. L., MAALØE O., NEIDHARDT F. C. (2006): Microbial Growth. 126-152, In: *Microbe*. Ingraham J. L., Maaløe O., Neidhardt F. C., ISBN: 978-1-55581-320-8

JIČÍNSKÁ, E. a HAVLOVÁ J. (1995): *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. 1. vyd. Praha: ÚZPI, 106 ss. ISBN 80-85120-47-x.

JÍLEK, F. (2000): Mastitidy. 192 -205, In: *Mléko, dojení, dojírny*. Doležel O., Hlásný J., Jílek F., Hanuš O., Vegricht J., Pytloun J., Matouš E., Kvapilík J., Praha: Agrospoj.

KOPÁČEK, J. (2014): Jak poznáme kvalitu? Mléko a mléčné výrobky. Ministerstvo zemědělství České republiky. ISBN: 978-80-88019-02-2.

KOUTSKÁ, M. (2011): Mikrobiologická kvalita syrového mléka z mléčných automatů. *Diplomová práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

KÖNIG, H. a FRÖHLICH J. (2009): Lactic Acid Bacteria. 3-29, In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. König H. a kol. 1<sup>rd</sup>. Německo: Springer Berlin Heidelberg, 511 ss. ISBN 978-3-540-85462-3.

KUNC, P., KNÍŽKOVÁ I., DOLEŽAL O., KNÍŽEK J., NĚMEČKOVÁ J. (2004): Správná rutina dojení v dojárnách. *Metodické listy*, Výzkumný ústav živočišné výroby, ISBN 80-86454-54-1.

LEROY, F. a VUYST L. D. (2004): Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 15(2): 67-78 . DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.004.

LEDENBACH, L. H. and MARSHALL R. T. (2009): Microbiological Spoilage of Dairy Products. 41-67, In: *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Sperber W. H., Doyle M. P. Springer Science+Business Media, 367 ss. DOI 10.1007/978-1-4419-0826-1.



MACHÁLEK, A. (1996): Význam včasné diagnostiky dojícího zařízení. 109 – 111, In: *Nové poznatky v technologii výroby a zpracování mléka*. Sborník – kolektiv autorů. České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing, ISBN 80-85645-23-8.

MALACARNE, M., SUMMER A., FRANCESCHI P., FORMAGGIONI P., PECORARI M., PANARI G., VECCHIA P., SANDRI S, FOSSA E., SCOTTI C., MARIANI P. (2013): Effects of storage conditions on physico-chemical characteristics, salt equilibria, processing properties and microbial development of raw milk. *International Dairy Journal* (29), 36 – 41.

MARTIN, F., EBEL B., ROJAS C., GERVAIS P., CAYOT N., CACHON R. (2013): Redox Potential: Monitoring and Role in Development of Aroma Compounds, Rheological Properties and Survival of Oxygen Sensitive Strains During the Manufacture of Fermented Dairy Products. 73–94, In: *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Kongo M., 669 ss. ISBN 978-953-51-0955-6.

MOATSOU, G. a MOSCHOPOULOU E. (2014): Microbiology of raw milk. 1–37, In: *Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments*. Özer B., Akdemir-Evrendilek G., 1<sup>rd</sup>. Velká Británie: CRC Press, 464 ss. ISBN 978-1482235029.

MOYER, C. a MORITA R. (2007): Psychrophiles and Psychrotrophs. USA: John Wiley & Sons.

MURPHY, S. C. a BOOR K. J. (2010): Sources and Causes of High Bacteria Counts in Raw Milk: An Abbreviated Review.

MURPHY, S. C (2010): Basic dairy bacteriology. *Dairy Foods Science Notes*, Cornell University.

NEVIANI, E., BOTTARI B., LAZZI C., GATTI M. (2013): New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. *Front Microbiol*, 36(4). DOI: 10.3389/fmicb.2013.00036.

NORDMANN, P., NAAS T., POIREL L. (2011): Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10): 1791-1798.

O'CONNOR, C. B. (1995): *Rural Dairy Technology*. Ethiopia: International Livestock Research Institute. 119 ss. ISBN 92-9146-000-1.

OLIVEIRA, G. B., FAVARIN L., LUCHESE R. H. McINTOSH M. (2015): Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2).

OLIVER, S. P. (2010): How Milk Quality is Assessed. The University of Tennessee.

PALÁNOVÁ, B., STÁVKOVÁ J., LEFNEROVÁ D., MATĚJOVÁ H. (2016): Mikrobiologická rizika z potravin během těhotenství. *Výživa a potraviny*, 1, 15–18.

PARK, Y. W. a HAENLEIN G. F. W. (2013): *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. 1. USA: Wiley-Blackwell. 728 ss. ISBN 978-1-118-53422-9.

PERKO, B. (2011): Effect of prolonged storage on microbiological quality of raw milk. *Mljekarstvo* 61 (2), 114-124.

PEROUTKOVÁ, J., PECHÁČOVÁ M., ŠALAKOVÁ A., KEJMAROVÁ M. (2011): Růst bakterií mléčného kvašení v mléce fortifikovaném bioaktivními látkami. *Mlékařské listy*, č. 126, 10 – 14.

SAMARŽIJA, D., ZAMBERLIN Š., POGAČIĆ T. (2012): Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo*, 62(2), 77-95.

SAMKOVÁ, E, a CEMPÍRKOVÁ R. (2012): Ziskávání mléka. 48 – 60, In: *Mléko: produkce a kvalita*. Samková E., Cempírková E., Hanuš O., Hasoňová L., Hlaváček J., Jelen P., Jeřábková J., Kopáček J., Lužová T., Navrátilová P., Seydlová R., Špička J., Šustová K., Vorlová L., Vyleťelová M., vědecká monografie. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 122-127 s. ISBN 978-80-7394-383-7.

SAMKOVÁ, E., DANIEL R., HASOŇOVÁ L., SMETANA P. (2011): Problematika prodeje syrového kravského mléka z pohledu spotřebitelů. *Mlékařské listy* (127). 10–14.

SAMKOVÁ, E., ŠUSTEROVÁ K., KUČTÍK J., KALHOTKA L., JŮZL M., FALTA D. (2010): *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VII. Sborník referátů ze semináře s mezinárodní účastí*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7375-402-0.

SMETANA, J., BOŠTIKOVÁ V., BOŠTIK P., VACKOVÁ M., HANOVCOVÁ I., CHLÍBEK R. (2011): Epidemiologie klíšťové meningoencefalitidy a možnosti prevence. *Postgraduální medicína*, č. 03.

SLÁDKOVÁ, P., ŠUSTOVÁ K., BURDYCHOVÁ R. (2006): Vliv porušení chladírenského řetězce na mikrobiologickou kvalitu pasterovaného mléka. *Sborník Mendelovy Zemědělské a Lesnické Univerzity v Brně*, 22(55).

SMITH, K. L. a HOGAN J. (2002): Coliform mastitis. *Veterinary research*, 9(16): 507-516. DOI: 10. 1051/vetres:2003022.

ŠILHÁNKOVÁ, L. (2002): *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. Vyd. Akademie věd České republiky, 363 ss., ISBN 80-200-1024-6.

ŠPANOVÁ, A., RITTICH B., KŠICOVÁ K., DRÁB V. (2009): Identifikace bakterií mléčného kvašení (význam v mlékárenském průmyslu) pomocí polymerasové řetězové reakce. *Mlékařské listy*, 19(116), 12–16.

VASUT, R. G. a ROBECI M. D. (2009): Food contamination with psychrophilic bacteria. *Sanitary Veterinary for Food Safety*, 42(9), 325-330.

VEGRICHT, J. (2000): Strojní dojení. 63 – 109, In: *Mléko, dojení, dojírny*. Doležel O., Hlásný J., Jílek F., Hanuš O., Vegricht J., Pytloun J., Matouš E., Kvapilík J., Praha: Agrospoj.

VRŠKOVÁ, V. (2011): Spotřební chování při nákupu mléka. *Bakalářská práce*. Mendelova univerzita v Brně, Provozně ekonomická fakulta, 77 ss.

VYLETĚLOVÁ, M. (2008): Bakterie v mléce a biogenní aminy. *Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozitivních vlivů mléka a mléčných výrobků*, 17-21.

WAREING, P., STUART F., FERNANDES R. (2011): *The Working Companion for Food Microbiologists*, 437 ss. ISBN: 978-1-905224-84-5.

WEISS, P. W. (2005): The Storage of Breast Milk. *International Children Medical Research Association*, 26 ss.

ZAHARI, M., TATINJ S.R., HAMAMA A., FOUSSHII S. (1995): Effect of storage temperature on the keeping quality of commercially pasteurized milk. *Actes Inst. Agron. Veto (Maroc)*, Vol. 16 (1): 5 – 10.

## Seznam legislativních předpisů

ČSN EN ISO 4833 - 1, 2 (560083), Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C

ČSN 57 0529, Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování.

ČSN ISO 21807 (560627), Mikrobiologie potravin a krmiv - stanovení vodní aktivity

ČSN ISO 8261 (560111), Mléko a mléčné výrobky. Příprava analytických vzorků a ředění pro mikrobiologické zkoušení

Nařízení komise (ES) č. 2073/2005, o mikrobiologických kritériích pro potraviny, v platném znění

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin, v platném znění

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004, o hygieně potravin, v platném znění

Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu, v platném znění

Vyhláška č. 113/2005 Sb., o způsobu označování potravin a tabákových výrobků, v platném znění

Vyhláška č. 128/2009 Sb., o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty, v platném znění

Vyhláška č. 211/2004 Sb., o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků, ve znění pozdějších předpisů, v platném znění

Vyhláška č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, v platném znění

Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), v platném znění

## Seznam internetových zdrojů

ANONYM1: Quality and testing. Food and agriculture organization of the United Nations. [cit. 2016-02-12]. Dostupné z: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-and-milk-products/quality-and-testing/en/#.Vr2XFFK2oXg>

DUBEN, J. (2014): Klíšťová encefalitida z mléka?. *Státní veterinární správa*. [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/svs/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2014\\_klistova-encefalitida-z-mleka.html](http://eagri.cz/public/web/svs/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2014_klistova-encefalitida-z-mleka.html)

*Food science* (2014): *Spoilage Microorganisms in Milk*. Kanada: University of Guelph, 2014 [cit. 2015-11-23]. Dostupné z: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/spoilage-microorganisms-milk>

LIŠKA, K (2006): Základní body programu prevence a tlumení mastitid. Genoservis CBS. [cit. 2016-02-12]. Dostupné z: <http://cbsas.cz/cz/poradenstvi/clanky/mastitidy-u-skotu/382-zakladni-body-programu-prevence-a-tlumeni-mastitid>

STEM/MARK (2008): Mýty o mléce. Průzkum agentury STEM/MARK pro společnost Tetra Pak. [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.zsdckomen.cz/mytyoml.pdf>

SZPI, (2015): Prevence onemocnění z potravin: Listeriόza. Státní zemědělská a potravinářská inspekce. [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/prevence-onemocneni-z-potravin-listerioza.aspx>

VFU, (2010): Automaty na mléko se šíří Českem. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. [cit. 2016-04-15]. Dostupné z: <http://www.svet-potravin.cz/clanek.aspx?id=2002>

VORLOVÁ, L. (2010): Automaty na mléko v ČR. Veterinářství. [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://vetweb.cz/automaty-na-mleko-v-cr/>