

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

KATEDRA POTRAVINÁŘSKÝCH BIOTECHNOLOGIÍ A KVALITY
ZEMĚDĚLSKÝCH PRODUKTŮ

Studijní program: Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Detekce mikroorganismů v pasterizovaném mléce pomocí
hmotnostní spektrometrie**

(Detection of microorganisms in pasteurized milk by mass spectrometry)

Autor diplomové práce: Bc. Martina Szabová

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

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

České Budějovice

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina SZABOVÁ**
Osobní číslo: **Z16671**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Zootechnika**
Název tématu: **Detekce mikroorganismů v pasterizovaném mléce pomocí hmotnostní spektrometrie**
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:

Mléko a výrobky z něj vyrobené mohou obsahovat různé mikroorganismy a být potenciálním zdrojem alimentárních patogenů. Ačkoliv je většina mikroorganismů z mléka eliminována pasterizací, některé mikroorganismy jsou k záhřevu odolné. Tyto mikroorganismy mohou vést ke kažení pasterizovaného mléka, popř. mohou vzácněji vést k rozvoji alimentárních onemocnění.

Cílem práce je vypracovat literární přehled dané problematiky a pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF analyzovat pasterizované mléko odebírané z mléčných automatů na přítomnost bakterií způsobujících kažení a na přítomnost podmíněně patogenních a patogenních bakterií.

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: 45 - 60 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- Bylund, G.: Dairy processing handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden, 2003, 436 pp., ISBN-10:9163134276
- Sarkar, S. Microbiological Considerations: Pasteurized Milk. International Journal of Dairy Science. 2015, 10, 206-218.
- Lejeune, J.T., Rajala-Schultz, P.J.: Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat. Clinical Infectious Diseases, 48 (1), 2009, 93-100.
- Murphy, S.C., Martin, N.H., David M. Barbano, D.M., Wiedmann, M.. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? International Journal of Dairy Science. 2016, 99, 10128-10149.
- Samková, E. Mléko: produkce a kvalita: Milk: production and quality : vědecká monografie. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. 2012, 240 s., ISBN 9788073943837.
- 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 kvality zemědělských produktů

Datum zadání diplomové práce: 17. března 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 21. dubna 2018


prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc., dr. h. c. D.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Bubenčská 1608, 370 05 České Budějovice


Ing. Pavel Smetana, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 17. března 2017

PROHLÁŠENÍ

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

V Českých Budějovicích, 14. dubna 2018

.....

Martina Szabová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí práce MVDr. Lucii Hasoňové Ph. D. za odborné vedení a cenné rady při psaní diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat celému vedení a personálu ve Státním zdravotnickém ústavu v Praze. Jmenovitě vedoucí Centra epidemiologie a mikrobiologie MUDr. Barboře Mackové a vedoucímu Oddělení bakteriální rezistence na antibiotika a Sbírký kultur Mgr. Vladislavovi Jakubů za zpřístupnění přístroje MALDI-TOF, ochotu a toleranci. V neposlední řadě patří mé díky i firmě BIO-RAD, konkrétně Mgr. Vendule Markové, za ochotu a poskytnutí referenčních agarových pūd. Díky patří i celému týmu laboratoře Biomolekulárního rozpoznávání AV ČR za pochopení a podporu během studia.

Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo stanovit celkové počty mikroorganismů a detekovat jednotlivé mikroorganismy pomocí hmotnostní spektrometrie.

V období od června do prosince roku 2017 bylo celkem vyšetřeno 35 vzorků pasterizovaného mléka ze dvou mléčných automatů (Hodkovice, Suchdol). Pro porovnání byly vzorky rozděleny na odběr v teplejších (červen – září) a chladnějších (říjen – prosinec) obdobích roku. V každém vzorku mléka byl stanoven celkový počet mikroorganismů a byla provedena detekce mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Celkové počty mikroorganismů se ve vyšetřovaném pasterizovaném mléce pohybovaly od 3,27 log KTJ/ml do 7,35 log KTJ/ml. Pomocí hmotnostní spektrometrie se ve vzorcích identifikovalo 210 mikroorganismů patřících do 20 čeledí gram pozitivních i gram negativních bakterií a jednoho zástupce eukaryotních mikroorganismů. Nejčastěji se identifikovatelní zástupci řadili do čeledi *Enterobacteriaceae*.

Klíčová slova: pasterizované mléko, celkové počty mikroorganismů, MALDI-TOF, kontaminace mléka

Abstract

The aim of the study was to evaluate the total viable count and detects each microorganism by the use of mass spectroscopy.

In the period of June to December 2017 35 samples of pasteurized milk from two vending machines (Hodkovice, Suchdol) were tested. For comparison samples were divided to warmer season (June-Septemeber) and colder season (October-December) sampling. The total amount of microorganism was determined in each sample of milk and total viable count was estimated by the use of mass spectroscopy MALDI-TOF.

The total viable count in the tested pasterized milk were from 3,27 log KTJ/ml up to 7,35 log KTJ/ml. The mass spectroscopy detected 210 microorganisms belonging to 20 families of gram-positive and gram-negative bacteria and one species of eukaryot organism. The most often identified species belong the *Enterobacteriaceae* family.

Key words: pasterized milk, total viable count, MALDI-TOF, milk contamination

OBSAH

1.	Úvod	9
2.	Literární rešerše	10
2.1.	Kvalita syrového mléka před zpracováním	10
2.2.	Enzymatická činnost mléka	11
2.2.1.	Mikrobiální proteázy	12
2.2.2.	Mikrobiální lipázy	13
2.3.	Pasterizace	14
2.4.	Mikrobiální kvalita pasterizovaného mléka	16
2.5.	Kontaminace po pasterizaci	18
2.6.	Skladovatelnost pasterizovaného mléka	21
2.7.	Maldi Biotyper, princip metody	22
3.	Materiál a metodika	26
3.1.	Cíl práce	26
3.2.	Materiál	26
3.3.	Metodika	28
3.3.1.	Stanovení celkového počtu mikroorganismů	28
3.3.2.	Vyšetření izolátů pomocí MALDI-TOF	30
4.	Výsledky a diskuze	32
4.1.	Celkový počet mikroorganismů	32
4.2.	Detekce mikroorganismů pomocí MALDI-TOF	35
4.2.1.	Detekované gramnegativní bakterie	36
4.2.1.1.	<i>Escherichia coli</i> (<i>Shigella</i> spp.)	38
4.2.1.2.	<i>Pseudomonas</i> spp.	39
4.2.1.3.	<i>Aeromonas</i> spp.	40
4.2.1.4.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	40
4.2.2.	Detekované grampozitivní bakterie	41
4.2.2.1.	<i>Bacillus</i> spp.	43
4.2.2.2.	<i>Streptococcus</i> spp.	43
4.2.2.3.	<i>Microbacterium</i> spp., <i>Micrococcus luteus</i>	44
4.2.3.	Nejčteněji detekované bakteriální rody/druhy	44
5.	Závěr	46
6.	Bibliografie	48
6.1.	Seznam legislativních předpisů	55

1. Úvod

Mikrobiologická analýza má při výrobě potravin zcela nezastupitelnou roli. Význam mikroorganismů nespočívá pouze v otázce bezpečnosti potravin a ochrany konzumentů před možným vznikem alimentárního onemocnění, významná je také jejich úloha při výrobě a zpracování potravin, zejména fermentovaných výrobků, či naopak podíl na jejich kažení. Spolu se zvyšujícím se tlakem na produkci bezpečných a kvalitních potravin, vzrůstá i potřeba jednoduchých, rychlých a co nejvíce specifických metod detekce mikroorganismů, určených jako vhodná alternativa ke klasickému kultivačnímu vyšetření.

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) je dnes již standardně využíván ve zdravotnictví k diagnostice mikroorganismů na úrovni rodu i druhu. Vyniká především svou rychlostí, schopností vyhodnocení velkého počtu vzorků během jednoho vstupu, nenáročností na přípravu vzorku a personální obsluhu. Také cena jedné analýzy je oproti ostatním metodám zanedbatelná, pomineme-li vyšší pořizovací náklady. Detekce mikroorganismů v potravinách pomocí MALDI-TOF, by mohla napomoci k přesnějšímu určení kontaminující mikroflóry. Na rozdíl od molekulárních metod detekuje pouze aktuální životaschopné mikroorganismy.

2. Literární rešerše

2.1. Kvalita syrového mléka před zpracováním

Dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 se jako „syrové mléko“ označuje mléko, které nebylo zahřáto na více než 40 °C nebo ošetřeno způsobem s rovnocenným účinkem. Syrové mléko obsahuje velmi různorodé bakteriální populace, z nichž některé jsou bakterie prospěšné pro zpracování a některé se podílejí na znehodnocení mléka (QUIGLEY et al., 2013). Prodej tohoto mléka ze dvora nebo z mléčných automatů představuje jen zlomek z celkového prodeje. Vzhledem k riziku možného přenosu alimentárních infekcí nelze tepelně neošetřené mléko doporučit k přímé spotřebě (ČURDA and ŠTĚTINA, 2014; ZEINHOM and ABDEL-LATEF 2014).

Kvalita syrového mléka se hodnotí pomocí počtu somatických buněk a celkového počtu mikroorganismů (CPM). Do skupiny CPM patří všechny mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní MO schopné růst za stanovených podmínek při teplotě 30 °C (CEMPÍRKOVÁ et al., 2012; HANUŠ et al., 2012). Podle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 je hygienický limit pro CPM $\leq 1 \times 10^5$ KTJ/ml a pro somatické buňky $\leq 4 \times 10^5$. Přítomnost vyššího počtu somatických buněk a mikroorganismů (MO) je spojena se zvýšenou aktivitou enzymů, které poškozují složky mléka, potenciálně vedou k defektům mléka a mohou vést k negativnímu ovlivnění konečného produktu (CEMPÍRKOVÁ et al., 2012; SARKAR, 2015).

V České republice (ČR) se ještě kvalita syrového mléka řídí normou ČSN 57 0529, ve které se kromě výše uvedených hodnot sledují další doplňkové znaky nad rámec požadavků Evropské unie (EU) (HANUŠ et al., 2012).

Při hodnocení mikrobiální kvality mléka jsou vedle CPM sledovány následující skupiny MO:

- Koliformní bakterie jsou skupina aerobních a fakultativně anaerobních, gramnegativních tyčinek, netvořící spóry. Jsou schopné fermentovat laktózu za vzniku plynu a kyselin během 48 hodin při 32 – 35 °C (HERVERT et al., 2016; MARTIN et al., 2018). Dnes má tato skupina více než 20 bakteriálních rodů (MASIELLO et al., 2016). Koliformní bakterie slouží jako indikátor fekálního znečištění. Při tepelném ošetření by měly být inaktivovány.
- Termorezistentní MO mohou přežít pasterizační proces (např. termorezistentní stafylokoky).
- Sporotvorné anaerobní bakterie ve formě spór přežívají pasterizační záhřev (např. *Bacillus* spp. nebo *Paenibacillus* spp.).
- Psychrotrofní MO jsou většinou termolabilní gramnegativní koky, které jsou při pasterizaci inaktivovány. Mohou se pomalu množit i při teplotách pod 10 °C. Pasterací jsou usmrceny, ale produkují termorezistentní proteázy a lipázy, které zhoršují technologické vlastnosti mléka (BURDOVÁ et al., 2002; GÖRNER and VALÍK, 2004; ŠTĚTINA 2009; CEMPÍRKOVÁ et. al., 2012; ZIYAINA et al., 2018).

2.2. Enzymatická činnost mléka

Mléko obsahuje široké spektrum enzymů. Řada z nich se podílí na přirozeném antibakteriálním systému mléka, některé však mohou katalyzovat biochemické reakce, které vedou ke vzniku senzorických vad a znehodnocení mléka (FROMM and BOOR, 2004; ŠTĚTINA, 2009; ALOTHMAN et al., 2018). Enzymy vytvořené mikrobiální činností mohou být produkovány bakteriemi přidanými k fermentaci, mohou pocházet ze somatických buněk nebo jsou produkovány bakteriemi, které kontaminují mléko (CHEN et al., 2003; ŠUSTOVÁ and SAMKOVÁ, 2012). Mikrobiální enzymy pocházející z kontaminující mikroflóry jsou především termorezistentní proteázy a lipázy psychrotrofních MO (BURDOVÁ et al., 2002; CHEN et al., 2003; ŠTĚTINA, 2009). Proteolýza způsobená těmito MO vede ke koagulaci mléka, nečisté a hořké chuti (BURDOVÁ et al., 2002; SCHMIDT et al., 2012). Zjišťování přítomnosti a aktivity enzymů lze tedy využít k zjištění hygieny získávání mléka, ke kontrole provedení tepelného ošetření mléka,

či k hodnocení nebezpečí rozkladu jednotlivých složek mléka působením enzymů (ŠUSTOVÁ and SAMKOVÁ, 2012).

Schopnost enzymů ovlivňovat kvalitu zpracovaných mléčných výrobků závisí na několika faktorech, včetně hladiny enzymu, specificity enzymu, tepelné stability, teploty zpracování a skladování, pH, vlhkosti a přítomnosti inhibitorů a aktivátorů. Potenciální účinek se bude lišit v závislosti na enzymu, produktu a podmínkách (SARKAR, 2015). Závěry ZIYAINA et al. (2018) ukazují, že mikrobiální růst je ve vzájemné korelaci s produkcí sekundárních metabolitů proteolýzy a lipolýzy od mikrobiální hladiny 5,0 log KTJ/ml.

Rody *Pseudomonas* a v menší míře *Bacillus* byly intenzivně studovány kvůli jejich produkci proteáz a lipáz v mléce. Rod *Bacillus* může syntetizovat velké množství extracelulárních enzymů (např. proteázy a lipázy). Maximální produkce se běžně vyskytuje v pozdně exponenciálních a časných stacionárních fázích růstu před sporulací (CHEN et al., 2003). DOGAN and BOOR (2003) izolovali 338 izolátů *Pseudomonas* spp., které představovaly 42 unikátních ribotypů. 51 % z nich produkovaly proteázu, 47 % lecitinázu a 67 % lipázu. *Pseudomonas fluorescens* produkoval všechny tři enzymy, naopak *Pseudomonas putida* v 87,5 % případů neprodukoval žádný enzym. RAJMOHAN et al. (2002) hodnotili proteolytickou a lipolytickou aktivitu 37 izolátů *P. fluorescens* z pasterizovaného mléka. Uvedli, že všechny izoláty byly pozitivní na proteolytickou i lipolytickou aktivitu. Některé kmeny *Pseudomonas* spp. jsou schopny produkovat enzymy už při koncentraci 10^4 KTJ/ml (MARTIN et al., 2018).

2.2.1. Mikrobiální proteázy

Mikrobiální proteázy jsou produkovány zejména rody *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Bacillus*, *Alcaligenes* a jiné (ŠUSTOVÁ and SAMKOVÁ, 2012). Většina proteáz z psychrotrofních bakterií přednostně působí na kasein oproti syrovátkovým proteinům (CHEN et al., 2003). Z kaseinových bílkovin je mikrobiálními proteázami nejrychleji štěpen k-kasein, rychle také ubývá β -kasein, oproti tomu ztráty α ₁-kaseinu jsou minimální (ŠUSTOVÁ and SAMKOVÁ, 2012).

Optimální teplota produkce mikrobiálních proteáz je okolo 20 °C (ZIYAINA et al., 2018), ale 70 – 90 % psychrotrofních MO je schopno produkovat proteázu i při 4 °C. Proteolýzu lze prokázat při počtu MO < 10⁶ v 1 ml mléka (ŠUSTOVÁ and SAMKOVÁ, 2012).

Existují tři mechanismy, díky kterým teplo způsobuje ztrátu aktivity proteáz:

- teplo, které vede ke konformačnímu rozložení proteáz (denaturace)
- teplo zvyšující samoošetření proteáz (autoproteolýza)
- teplo, které může vést k nevratné neenzymatické kovalentní modifikaci (např. deamidace) (CHEN et al., 2003)

Většina druhů *Pseudomonas* spp. produkuje pouze jeden typ proteázy, typickou neutrální zinkovou metaloproteázu s optimálním pH 6,5 – 8 (CHEN et al., 2003). Bylo prokázáno, že si *P. fluorescens* LY 13 zachovává více než 50 % proteázové aktivity i po pasterizaci (BURDOVÁ et al., 2002).

Proteázy rodu *Bacillus* přeměňují vegetativní buňku na spóry během několika hodin (CHEN et al., 2003). CHEN et al. (2003) zaznamenali klíčení spór, přežití a dokonce růst *B. licheniformis* a *B. stearothermophilus* v zahuštěném mléce mezi pasterizátorem a sušicí věží při výrobě sušených a plnotučných prášků. Růst *B. stearothermophilus* za těchto podmínek odráží skutečnost, že jeho spóry jsou jedny z nejvíce tepelně rezistentních bakteriálních spór.

CHEN et al. (2003) izolovali i proteázy rodu *Pseudomonas*. Syrové mléko si zachovalo 55 až 65 % počáteční aktivity po tepelném zpracování při 77 °C po dobu 17 sekund a 20 až 40 % účinnosti po tepelném zpracování při 140 °C po dobu 5 sekund v pufrech při pH 7.

2.2.2. Mikrobiální lipázy

Lipázy jsou poměrně málo specifické enzymy. Hydrolyzují triacylglycerol na di- či monoacylglycerol a mastné kyseliny, přičemž pro tvorbu smyslových vad jsou důležité C4 a C10 kyseliny, zvláště pak kyselina máselná (ŠUSTOVÁ and SAMKOVÁ, 2012). Volné mastné kyseliny mohou způsobit žluknutí a tzv. mýdlovou příchut' (DOGAN and BOOR, 2003). Mnoho MO může produkovat více typů extracelulárních lipáz, které hydrolyzují různé mastné kyseliny.

Podmínky jako teplota, pH, zdroje dusíku a lipidů, koncentrace anorganických solí a dostupnost kyslíku ovlivňují hladinu produkovaných lipáz. Polysacharidy, jako je glykogen, hyaluronát, laminarin, pektin B a arabská guma, mohou také zvýšit produkci extracelulárních lipáz (CHEN et al., 2003). Některé mikrobiální lipázy jsou důležité při výrobě některých sýrů, kterým dávají specifickou chuť a vůni (YILMAZ et al., 2005).

Mikrobiální lipázy produkují bakterie *Pseudomonas* spp., *Flavobacter* spp., *Proteus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., plísně a kvasinky. Jejich největší aktivita je při 20 °C, ale zůstává zachována i při nižších teplotách (ŠUSTOVÁ and SAMKOVÁ, 2012). Hydrolýza lipidů z reziduálních hladin lipáz zbývající po tepelném zpracování snižuje trvanlivost mléka. Po 22 dnech po pasterizaci při skladování v 8 °C může lipázová aktivita zůstat na 60 % (ZIYAINA et al., 2018).

Lipázy produkované *Pseudomonas* spp. jsou relativně tepelně stabilní. CHEN et al. (2003) zkoumali lipolytickou aktivitu rodu *Pseudomonas*. Lipázy izolované ze syrového mléka si zachovaly 55 – 100 % aktivitu po tepelném zpracování při 63 °C po dobu 30 minut a 75 – 100 % aktivitu po tepelném zpracování při 100 °C po dobu 30 sekund v odstředěném mléce. Většina lipáz rodu *Bacillus* vykazuje nejvyšší katalytickou aktivitu při teplotách v rozmezí od 60 do 75 °C, což je 30 °C nad nejvyšší aktivitou pro lipázy rodu *Pseudomonas* (30 – 45 °C).

MASIELLO et al. (2016) uvedli, že 10 izolátů *Buttiauxella* spp. získaných z pasterizovaného mléka bylo negativních na přítomnost lipolýzy, zatímco všechny izoláty *Serratia* spp. (n = 17) ze stejné studie byly pozitivní.

2.3. Pasterizace

Tepelné zpracování potravin redukuje počet MO. Kritéria výběru způsobu pasterizace by měla vycházet z počáteční bakteriální koncentrace a typu přítomných bakterií (DUMALISILE et al., 2005; SARKAR, 2015). Pasterizace se provádí kvůli zajištění zdravotní nezávadnosti mléka a zvýšení trvanlivosti suroviny (ŠTĚTINA, 2009).

Dle platné legislativy (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006 a Vyhlášky č. 397/2016 Sb.) se tepelné ošetření mléka dosahuje několika způsoby:

- Pasterizace nízkou teplotou po dlouhou dobu – tepelné ošetření mléka a mléčných výrobků zahřátím mléka na teplotu nejméně 63 °C po dobu nejméně 30 minut.
- Pasterizace vysokou teplotou po krátkou dobu (HTST = high temperature/short time) – tepelné ošetření mléka a mléčných výrobků zahřátím mléka na teplotu nejméně 71,7 °C po dobu nejméně 15 sekund.
- Jakoukoli jinou kombinací času a teploty vedoucí k rovnocennému účinku.
- Vysokotepelné ošetření (UHT = ultra high temperature) – zahrnuje souvislý přítok tepla za vysoké teploty po krátkou dobu (nejméně 135 °C v kombinaci s přiměřenou dobou zdržení), aby v ošetřeném výrobku nebyly žádné živé mikroorganismy ani spóry schopné růstu v prostředí aseptické uzavřené nádoby při pokojové teplotě.
- Sterilizace – tepelné ošetření mléka a mléčných výrobků jejich nepřímým ohřevem v hermeticky uzavřených obalech na teplotu nad 100 °C po dobu zajišťující splnění požadavku na mikrobiologickou nezávadnost podle nařízení, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu (Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004) bez porušení závěru
- Vysoká pasterace (mléko s prodlouženou trvanlivostí) – tepelné ošetření mléka a mléčných výrobků zahřátím mléka na teplotu nejméně 85 °C (nyní není legislativně ošetřeno, vyhláška č. 77/2003 byla zrušena)

Zpracování mléka metodou UHT může být provázeno nežádoucími sensorickými změnami, tj. vařená či karamelizovaná příchuť (SCHMIDT et al., 2012). Proto byla zavedena nová výrobní technika pro pasterizaci mléka, tj. mléko s prodlouženou trvanlivostí, které chutná jako čerstvé mléko, ale je možné ho skladovat až 4 týdny (KAUFMANN et al., 2010). Mléko s prodlouženou trvanlivostí nahrazuje běžné pasterizované mléko, kvůli rostoucí poptávce po mléčných výrobcích s prodlouženou trvanlivostí. Technologie produkující toto mléko zahrnuje tepelné zpracování s vysokým hydrostatickým tlakem, impulsním elektrickým polem, bactofugací nebo mikrofiltrací. Nejčastěji používanou technikou je tepelné zpracování,

po němž následuje mikrofiltrace. Vysoký hydrostatický tlak a impulsní elektrické pole se v současné době při komerční výrobě mléka s prodlouženou trvanlivostí nepoužívají (SCHMIDT et al., 2012; DOLL et al., 2017). Mikrofiltrace odstraní 99,1 – 99,9 % spór (SARKAR, 2015).

Pasterizací by se mělo dosáhnout snížení počtu MO pod 1000 KTJ/ml a inaktivace mléčné lipázy pod 1 % její původní aktivity (ŠTĚTINA, 2009). Efektivní proces pasterizace by měl odstranit většinu patogenních bakterií, nicméně některé termorezistentní bakterie mohou pasterizaci přežít (FERNANE et al., 2016). Mezi termorezistentní rody patří například *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Microbacterium*, a *Enterococcus* (CEMPÍRKOVÁ et al., 2012). GÖRNER and VALÍK (2004) uvádějí jako zdroje kontaminace termorezistentních bakterií vodu a nedostatečně vyčištěné strojní zařízení.

SARKAR (2015) tvrdí, že pokud se mléko pasterizuje při nižších teplotách (76 – 79 °C), mohou být pozorovány výrazně nižší počty bakterií i po delším skladování při 6 °C. Tento jev způsobuje dobíhající, přirozeně působící antimikrobiální aktivita laktoperoxidázového systému. Zahřátí mléka v teplotním rozmezí 72,9 – 85,2 °C nevykazovalo žádnou odchylku smrtícího účinku na různé izolované bakteriální rody. Avšak spóry, které vytvářejí některé bakterie, klíčily lépe v pasterizovaném mléce a objevily se jako klíčové při zkrácení doby použitelnosti. Optimální teplota pro tvorbu spór bylo 65 – 75 °C. Zvýšená pasterizační teplota 80 – 90 °C vedla ke kratší době použitelnosti, kvůli stimulaci růstu spór a poklesu efektivity antimikrobiálních látek. Mléko zpracované při teplotě 76 °C vykazovalo nejnižší bakteriální růst a nejdelší dobu použitelnosti.

2.4. Mikrobiální kvalita pasterizovaného mléka

Mikrobiologickou kvalitu pasterizovaného mléka ovlivňuje řada faktorů. Mezi ně patří doba skladování syrového mléka před zpracováním, zvolené tepelné zpracování a koncentrace tepelně odolných mikroorganismů, podmínky skladování po pasterizaci a biofilmová mikroflóra, což se zdá být hlavním zdrojem kontaminace mléka po pasterizaci (FERNANE et al., 2016). Syrové mléko může obsahovat bakteriální spóry odolné vůči pasterizačním teplotám (např. *Bacillus cereus*). Naopak pasterizace tyto spóry může zaktivovat ke klíčení (SARKAR, 2015).

Sporotvorné bakterie, týkající se mlékárenského průmyslu lze rozdělit do dvou skupin:

- Aerobní bakterie tvořící spóry (např. *Bacillus cereus*, *Paenibacillus* spp., *Geobacillus stearothermophilus*)
- Anaerobní bakterie tvořící spóry (např. *Clostridium tyrobutyricum*)

Aerobní bakterie tvořící spóry mohou sloužit jako ukazatele kvality sušeného mléka a mohou omezit trvanlivost pasterizovaného mléka. Anaerobní bakterie, jako je *Clostridium tyrobutyricum*, jsou charakteristické produkcí plynu a způsobují vady sýrů (ORTUZAR et al., 2018). Tyto spóry mohou pomocí enzymů snížit kvalitu pasterizovaného mléka (ZIYAINA et al., 2018). Spóry *Paenibacillus* spp., *Viridibacillus* spp., a *Bacillus weihenstephanesis* jsou schopné klíčit i při chladničkových teplotách, tím představují jeden z faktorů pro omezenou dobu trvanlivosti (SARKAR, 2015; ORTUZAR et al., 2018). PORCELLATO et al. (2018) pozorovali, že bakterie patřící do řádů *Lactobacillales*, *Pseudomonadales*, *Clostridiales* a *Bacillales* byly hojněji zastoupeny bezprostředně po pasterizaci oproti mléku syrovému.

V syrovém mléce tvoří až 98,1 % celkové mikroflóry psychrotrofní MO. Termofilní a termodynamické bakterie zastupují 1,4 % a psychrofilní 0,5 % celkové mikroflóry. Naopak u pasterizovaného mléka se poměr mění. Psychrotrofní MO zastupují jen 53 %, termofilní s termodynamickými 39,5 % a psychrofilní 7,5 % celkové mikroflóry. Pasterizace ve skutečnosti zaktivuje klíčení spór a růst termofilních a termodynamických MO (SARKAR, 2015).

SCHMIDT et al. (2012) pozorovali mikrobiologické zatížení mléka ošetřené vysokou pasterizací a mikrofiltrací. Vzorke syrového mléka s hodnotami 4,8 (šarže A), 6,4 (šarže B) a 5,0 (šarže C) log KTJ/ml byly díky mikrofiltraci sníženy o 5 – 6 log na počet méně než 1 log KTJ/ml. Následná pasterizace vedla k dalšímu poklesu počtu buněk pro šarži A, ale mírně zvýšila počty pro šarži B a C, nejspíše kvůli procesům klíčení spór a rekontaminaci.

Dále SCHMIDT et al. (2012) pozorovali, že vzorky pasterizovaného mléka, které byly skladovány v chladírenských teplotách (n = 125) vykazovaly různorodé CPM v rozmezí od < 1 až 8,0 log KTJ/ml. Více než 50 % všech vzorků mělo vynikající mikrobiální kvalitu < 3 log KTJ/ml, ale 8 % vzorků vykazovalo

CPM > 6 log KTJ/ml. Dominantní populaci tvořily grampozitivní *Microbacterium* spp. izolované z 64,8 % vzorků. Sporující *Bacillus* spp., *Brevibacillus* spp., *Lysinibacillus* spp. a *Paenibacillus* spp. tvořily 20,8 % populace. Naproti tomu v mléce inkubovaném při teplotě 30 °C dominovaly bakterie tvořící spóry, které byly detekovány v 82,4 % vzorků.

ELWELL and BARBANO (2006) uvedli, že ve třech jimi pozorovaných šaržích byl CPM v syrovém mléce snížen mikrofiltrací z 2,4; 3,6 a 1,475 log KTJ/ml na 0,240; 0,918 a 0,240 log KTJ/ml. Po pasterizaci se hodnoty snížily na 0,005; 0,008 a 0,005 log KTJ/ml, což dokazuje, že kombinace pasterizace a mikrofiltrace snížila průměrný CPM o 5,6 log KTJ/ml.

2.5. Kontaminace po pasterizaci

Mikrobiální kažení čerstvého mléka způsobují grampozitivní MO, které přežily pasterizační teplotu nebo gramnegativní MO, které se do mléka dostaly až po pasterizaci (FROMM and BOOR, 2004). Nicméně i selhání pasterizace a přítomnost vysokých počtů gramnegativních bakterií v syrovém mléce mohou být také odpovědné za přítomnost gramnegativních bakterií v pasterizovaném mléce (MARTIN et al., 2018). Přítomnost vysokého počtu gramnegativních MO po pasterizaci může „maskovat“ přítomnost menších počtů termorezistentních grampozitivních bakterií, jako je *Bacillus* spp. a *Microbacterium* spp. (FROMM and BOOR, 2004).

Bakterie postpasterizační kontaminace se rozdělují na čtyři skupiny (**Tabulka 1**). *Pseudomonas* spp. je nejčastěji hlášený MO odpovědný za postpasterizační kontaminaci. Je schopný růstu i při nízkých teplotách (RANIERI and BOOR, 2009; MARTIN et al., 2018).

Tabulka 1 Rozdělení mikroorganismů postpasterizační kontaminace

Skupina mikroorganismů	Příklady rodů/druhů
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Pseudomonas fragi</i>
	<i>Pseudomonas lundensis</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>
Koliformní bakterie	<i>Enterobacter</i> spp.
	<i>Klebsiella</i> spp.
	<i>Citrobacter</i> spp.
	<i>Hafnia</i> spp.
Non- <i>Pseudomonas</i> , nekoliformní gramnegativní bakterie	<i>Serratia</i> spp.
	<i>Aeromonas</i> spp.
	<i>Flavobacterium</i> spp.
	<i>Acinetobacter</i> spp.
Grampozitivní bakterie tvořící spóry	nekoliformní <i>Enterobacteriaceae</i>
	skupina <i>Bacillus cereus</i>
	<i>Paenibacillus</i> spp.

upraveno dle Martin et al. (2018)

Navzdory dlouhodobému používání koliformních bakterií jako hygienických ukazatelů v mlékárenském průmyslu, nedávný výzkum v USA naznačuje, že koliformní bakterie představují méně než 50 % bakteriálních kontaminantů, které se podílejí na kontaminaci pasterizovaného mléka (RANIERI and BOOR, 2009).

V celé Evropě se jako indikátory hygienického zacházení s mlékem sledují bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (EB). Dle Nařízení komise (EU) č. 365/2010 hladina EB v pasterizovaném mléce na konci výrobního procesu nesmí překročit limit 10 KTJ/ml. Tato skupina organismů se skládá z gramnegativních, tepelně labilních tyčinek. Většina tvoří katalázu, nikoli oxidázu. Čeď EB také zahrnuje zmíněné koliformní rody bakterií (HERVERT et al., 2016). Ačkoliv sledování hladiny EB poskytuje v porovnání s koliformními MO obsáhlejší rozsah o hygienických podmínkách, do této skupiny nepatří několik důležitých postpasteurizačních kontaminantů (např. *Pseudomonas spp.*) (RANIERI and BOOR, 2009).

Ke kontaminaci mléka po pasterizaci může dojít během přepravy, skladování i zpracování v mlékárně (PORCELLATO et al., 2018). Je důležité zjistit, zda jde o kontaminaci přechodnou nebo trvalou (MARTIN et al. 2018).

Přetrvávající kontaminace nastává, když jsou MO zaneseny do zařízení a v něm přetrvávají i po čištění a sanitaci. Přetrvávající kontaminace mohou být v podobě biofilmu (MARTIN et al., 2018). Biofilm je společenství mikrobiálních buněk přichycených k povrchu nebo k okolním buňkám. Volně plovoucí buňky se přichycují na povrch pomocí adhezínů. Po přichycení mění své chování a fenotyp. Produkují velké množství lepivého polysacharidu, ze kterého se vytváří hlenová matrice, která drží buňky pohromadě a funguje jako voštinové lešení, v němž se buňky množí a tvoří se mikrokolonie a spleť kanálků. Na určitý impulz se buňky z biofilmu odlučují, přecházejí do planktonického stavu, odplouvají a kolonizují další části povrchu (SCHINDLER, 2014). Biofilm může dosahovat osídlení až 10^8 KTJ na cm^2 . Biofilmy jsou obtížně eradikovány za použití běžných režimů čištění a dezinfekce kvůli jejich rezistenci a kvůli tomu, že dezinfekční prostředky nepronikají do biofilmové matrice. Jako účinná dezinfekce na inaktivování biofilmu se osvědčil chlor a ozon (SARKAR 2015; FERNANE et al., 2016).

Tvorba biofilmu na kontaktních plochách a izolace *B. cereus*, *Pseudomonas spp.* a termofilních streptokoků z povrchů postpasterizačního vybavení mlékárenské jednotky naznačují, že povrchy zařízení mohou působit jako zásobníky pro rekontaminaci mléka, čímž se snižuje účinnost pasterizačních a sanitárních úprav (FROMM and BOOR, 2004; SARKAR, 2015; FERNANE et al., 2016; MARTIN et al., 2018; PORCELLATO et al., 2018; ZIYAINA et al., 2018).

Přechodné kontaminace vznikají při nedodržení hygienických doporučení pracovníků nebo kvůli biologickým aerosolům. Biologické aerosoly jsou suspenze mikroskopických pevných nebo kapalných částic ve vzduchu, které nesou bakterie, houby nebo jiné MO (MARTIN et al. 2018).

Studie v USA naznačují, že téměř 50 % pasterizovaného mléka vykazuje známky postpasterizační kontaminace psychrotrofními organismy (MARTIN et al. 2018).

2.6. Skladovatelnost pasterizovaného mléka

Pasterizované mléko má dobu skladovatelnosti od 2 do 20 dnů. Závisí to na hygienických podmínkách při dojení, kvalitě syrového mléka, době skladování syrového mléka, zvolené tepelné úpravě, koncentraci tepelně odolných MO a neporušení nepřerušeni chladírenského procesu (FROMM and BOOR, 2004; SARKAR, 2015; ZIYAINA et al., 2018). Jedny z nejkritičtějších faktorů, které zkracují trvanlivost pasterizovaného mléka, jsou teplota a doba skladování syrového mléka, protože syrové mléko má při pokojové teplotě použitelnost jen několik hodin (ZIYAINA et al., 2018).

Dle vyhlášky č. 397/2016 Sb. se mléko a mléčné výrobky skladují, přepravují a uvádějí na trh při teplotě od 2 °C do 8 °C s výjimkou mléka, smetany a mléčných výrobků ošetřených metodou UHT nebo sterilací.

Kromě teploty a doby skladování jsou důležitými faktory v syrovém mléce skutečné počty psychrotrofních MO a rychlost ochlazování (BURDOVÁ et al., 2002). Pokud CPM dosáhne hodnotu 6 – 7 log KTJ/ml značí to konec doby použitelnosti. Nicméně, i nižší hodnoty mohou způsobit smyslové změny, které mohou spotřebitelé vnímat jako znehodnocení mléka (ZIYAINA et al., 2018).

Dlouhá doba skladování syrového mléka před pasterizací má za následek zvýšení počtu psychrotrofních, lipolytických a proteolytických bakterií, které produkují enzymy a způsobují změny mléka (BURDOVÁ et al., 2002; ZIYAINA et al., 2018).

Bylo prokázáno, že skladování při teplotě 10 °C ve srovnání se skladovací teplotou 4 °C se snižuje trvanlivost pasterizovaného mléka téměř o dvě třetiny (BURDOVÁ et al., 2002). SARKAR (2015) tvrdí, že není zaznamenaný významný vliv v době použitelnosti (0 - 6 dnů při skladovací teplotě 4,5 °C) nebo v době skladování pasterizovaného mléka (0 – 20 dní při 4,5 °C), pokud mikrobiologická kvalita pasterizovaného mléka odpovídá počátečnímu stavu < 1000 bakteriální populace a < 100 ml⁻¹ koliformních bakterií.

Dle PORCELLATO et al. (2018) teplota a doba skladování významně ovlivňuje počty KTJ *B. cereus*. Při skladovací teplotě 4 °C vzorky mléka vykazovaly velmi nízké nebo nedetekovatelné počty *B. cereus*. Naopak, skladování při 8 °C mělo

za následek navýšení počtu KTJ *B. cereus* hlavně ke konci doby použitelnosti v porovnání se skladováním při 4 °C.

Dle SARKARA (2015) má chlazené pasterizované mléko skladovatelnost až 20 dnů při skladovací teplotě 6,1 °C. S nárůstem teploty o 4 – 10 °C se snížila doba trvanlivosti díky proteolytické a lipolytické aktivitě psychrotrofních MO. Během skladování v chladničce se jako nejdůležitější organismy, které zkracovaly dobu skladovatelnosti pasterizovaného mléka, objevovaly psychrotrofní kmeny. Mezofilní kmeny sice při nízkých teplotách nerostou, ale kolonizují s jinými bakteriemi v biofilmech. Při skladování mléka byl zaznamenán minimální růst bakterií při teplotě 4 – 7 °C, ale 15krát vyšší aktivita při navýšení teploty na 15 °C.

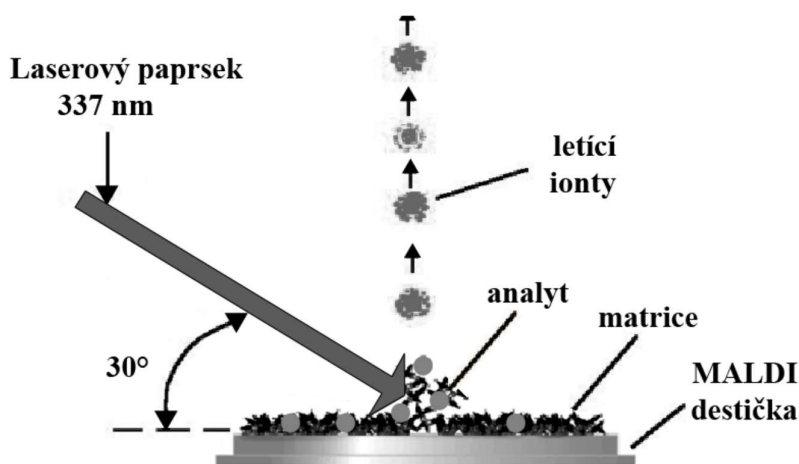
Dle RANIERI and BOORR (2009) mléko, které bylo znehodnoceno aerobními sporotvornými bakteriemi neprojevovalo známky kažení déle než 14 dní. Pasterizované mléko obsahující bakterie rodu *Pseudomonas* mělo kratší dobu použitelnosti než to, které obsahovalo jiné bakterie, jako *Flavobacterium* spp. a *Acinetobacter* spp. (CHEN et al., 2003). MARTIN et al. (2012) v průzkumu mléka během 10 let v New Yorku zjistil, že vzorky s postpasterizačními kontaminanty, konkrétně s koliformními bakteriemi, vykazovaly po 14 dnech výrazně vyšší CPM než vzorky bez kontaminace koliformními bakteriemi.

Odstředěné mléko má vzhledem k vyšší proteázové aktivitě významně kratší dobu skladovatelnosti v porovnání s mlékem plnotučným (SARKAR, 2015).

2.7. **Maldi Biotyper, princip metody**

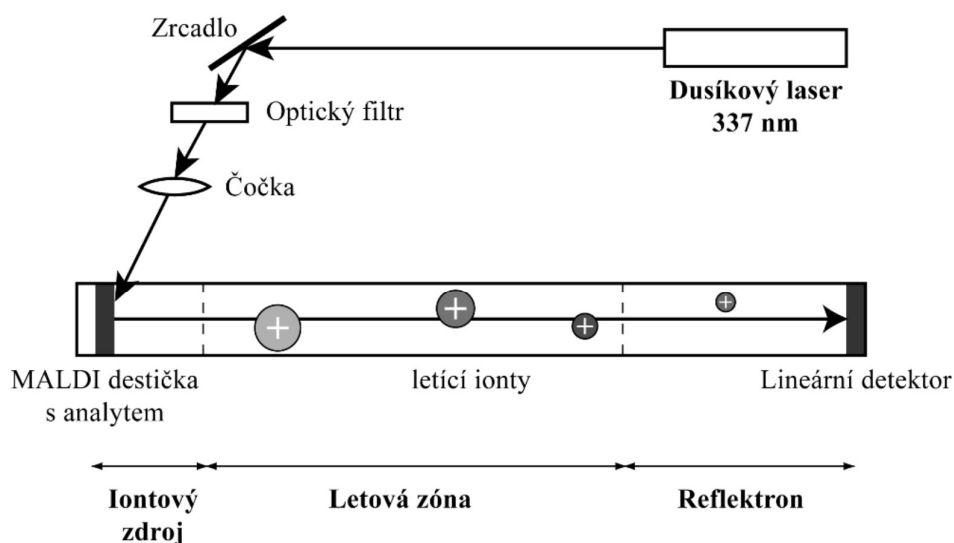
Rychlou a velmi přesnou identifikaci a typizaci mikroorganismů poskytuje hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) (BURSOVÁ et al., 2014). Pro detekci MO pomocí MALDI-TOF MS jsou potřeba vypěstovat kolonie na agarové půdě. Takto narostlé MO jsou díky MALDI-TOF MS přesně identifikovány během několika minut bez nutnosti hlubších znalostí o MO. Uživatelé ani nemusí vědět, zda se jedná o bakterie nebo kvasinky. Pokrok v hmotnostní spektrometrii a bioinformatice je revoluční identifikace bakterií a hub v klinické mikrobiologii (PATEL, 2013).

Jedná se o šetrnou ionizační metodu, kdy biomolekuly (proteiny buněčných extraktů) nejsou po ataku laseru štěpeny, ale pouze ionizovány pomocí matrice (**Obrázek 1**). Nejčastěji se využívají dusíkové UV lasery, v menší míře infračervené (IR) lasery. Ozáření o vlnové délce 337 nm trvá 4 ns. Matrice zajistí kontakt analyzované molekuly s laserem tak, aby biomolekula nebyla atakována přímo a štěpena nežádoucím způsobem. Matrice dále zprostředkovává přenos energie, kdy excitované molekuly matrice za vysokého tlaku přenosem protonu ionizují molekuly analytu (biomolekuly) (BURSOVÁ et al., 2014).



Obrázek 1 Schéma ionizace (Bursová 2014)

Ionty, které přešly do plynné fáze, postupují přes silné elektrické pole, ve kterém jsou urychleny a zaostřeny. Vstoupí do vakuové trubice hmotnostního analyzátoru doby letu (TOF, Time of Flight), kde se pohybují rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Měří se doba letu částice, lehčí či více nabité ionty dorazí k detektoru dříve než těžší nebo méně nabité (**Obrázek 2**). Detektor je propojen s počítačem a pomocí softwaru jsou data zpracována (BURSOVÁ et al., 2014). K identifikaci mikroba, bakterie nebo houby je potřeba pouze $10^5 - 10^6$ buněk (SCHINDLER, 2014).



Obrázek 2 Schéma přístroje MALDI - TOF MS (Bursová 2014)

Matrice vyextrahuje z mikroorganismů jednotlivé proteiny, převážně ribosomálního původu. Ty jsou přítomny ve všech fázích růstu buňky a jsou ve vzorku obsaženy ve vysokých koncentracích. Ribosomální proteiny představují asi 20 % veškerých buněčných bílkovin a asi 3 % celkové hmoty (BURSOVÁ et al., 2014).

V průběhu měření laser odpaří v rámci tzv. „měkkého“ ionizačního procesu matrici a uvolní pozitivně nabitě proteiny. Proteinové ionty postupují přes silné elektrické pole, ve kterém jsou elektrostaticky urychleny a proletí trubicí k detektoru rychlostí, která je úměrná jejich hmotnosti a náboji. Lehčí ionty se pohybují rychleji než těžké. Měří se celková doba letu, která uplyne mezi pulzačním zrychlením (aplikace laseru) po dopad iontů na detektor (NYČ and BUBENÍČEK, 2015).

Výsledkem je hmotové spektrum, které je druhově specifické pro jednotlivé mikroorganismy a představuje de facto jejich tzv. fingerprint. Hmotnostní spektrum testovaného izolátu se automaticky porovnává s databází referenčních spekter. Aby se určila souvislost spektra naměřeného vzorku se spektrem v databázi, je vytvořen seznam nejvíce příbuzných organismů, z nichž každý má číselné hodnocení (procento nebo skóre) podle úrovně důvěry v identifikaci. V závislosti na výši hodnoty je organismus identifikován u rodiny, rodu nebo druhu (PATEL, 2013). Naměřené spektrum je srovnáno s profily uloženými v referenční databázi

s následným vyhodnocením (NYČ and BUBENÍČEK, 2015). Srovnání shody spekter určuje numerická hodnota tzv. skóre. Skóre 0 – 1,699 značí nespolehlivou identifikaci, skóre 1,700 – 1,999 značí identifikaci pravděpodobného rodu, 2,000 – 2,299 značí bezpečnou identifikaci a rodu a pravděpodobnou identifikaci druhu, 2,300 – 3,000 značí vysokou pravděpodobnost identifikace druhu.

Aktuální databáze jsou obecně nejlepší pro identifikaci běžných aerobních gramnegativních tyčinek a grampozitivních koků. Můžou chybět některé MO, jako například některé anaeroby, houby nebo mykobakterie. Vzhledem k měnící se nomenklatuře a průběžnému popisu nových druhů a vznikajících MO je nezbytná aktualizace databází pro zajištění funkčnosti a aktuálnosti databáze (PATEL, 2013).

Komerční systémy MALDI – TOF MS jsou k dispozici od dvou výrobců. Bruker, který je používán celosvětově a bioMérieux, který je používán hlavně ve Francii (PATEL, 2013).

Příčinou nezdaru identifikace může být směsná bakteriální kultura, nepřítomnost typových kmenů v databázi nebo genetická heterogenita uvnitř rodového komplexu. Podobné případy nastávají u pneumokoků a streptokoků, problémy může rovněž činit velmi úzká genetická příbuznost rodů *Escherichia* a *Shigella*. Uživatelům by tato omezení měla být dobře známa, je třeba s nimi v diagnostickém procesu počítat a k identifikaci raději volit alternativní metodu (NYČ and BUBENÍČEK, 2015).

3. Materiál a metodika

3.1. Cíl práce

Cílem práce bylo posoudit celkové počty mezofilních MO v pasterizovaném mléce a pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF analyzovat pasterizované mléko, odebírané z mléčných automatů na přítomnost bakterií způsobujících kažení a na přítomnost podmíněně patogenních a patogenních bakterií.

3.2. Materiál

Vzorky pasterizovaného kravského mléka byly odebírány ze dvou automatů na mléko (Praha Suchdol a Hodkovice) v období od začátku června 2017 do konce prosince 2017. Na automatech bylo uvedeno, že mléko bylo ošetřeno šetrnou pasterizací. Odběry byly pro porovnání rozděleny na odběry v teplejších (červen – září) a chladnějších (říjen – prosinec) obdobích roku. Z mlékomatů bylo celkem uskutečněno 35 odběrů pasterizovaného mléka (18 odběrů z mlékomatu v Hodkovicích a 17 odběrů z mlékomatu v Suchdole). Vzorky byly odebírány do skleněných sterilních lahví (0,5 l), uloženy do chladicího boxu a přepraveny do laboratoře, kde byly ihned zpracovány.

Každý vzorek byl za účelem stanovení celkového počtu mikroorganismů naočkován dle norem ČSN EN ISO 4833-1, 2.

Každý vzorek mléka byl dále kultivován na krevním agaru (KA) (Oxoid) a na UriSelect agaru (URI) (Oxoid) při 37 °C po dobu 24 hodin (**Obrázek 3 a 4**) pro následnou detekci mikroorganismů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight).

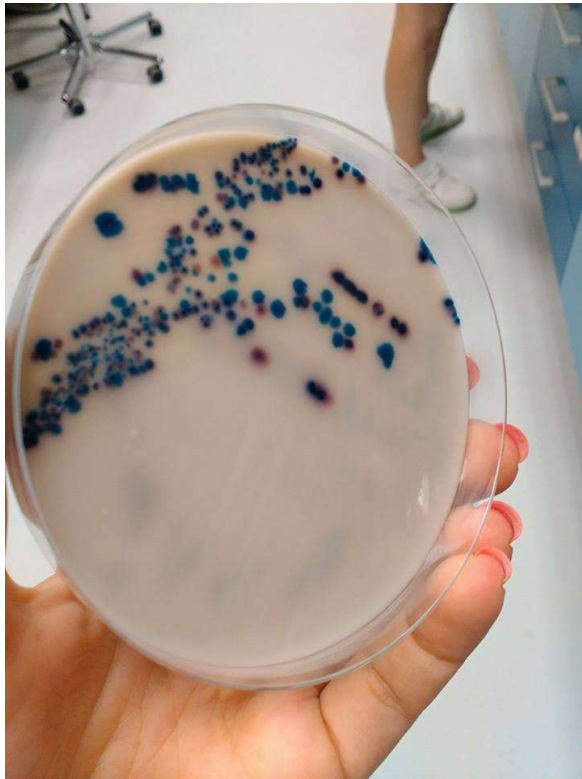
URI umožňuje detekci specifických enzymů, což je zárukou diferenciací druhů nebo skupin organismů s minimální potřebou potvrzovacích testů (URISELECT™4, 2013).

Vyhodnocení zbarvení (**Obrázek 4**) kolonií po 18 – 24 hodinové inkubaci při 35 – 37 °C:

- β -galaktosidáza: růžové kolonie signalizují možný výskyt *Escherichie coli*
- β -glukosidáza: tyrkysově modré kolonie signalizují nález grampozitivních koků, hlavně enterokoků
- β -galaktosidáza a β -glukosidáza společně: modrofialové kolonie pravděpodobně patří do skupiny KESC (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* nebo *Citrobacter spp.*)
- Tryptofan deamináza (TDA): oranžovohnědé kolonie s hnědavou aureolou kolem ukazuje na mikroorganismus skupiny PMP (*Proteus-Providencia-Morganella*) (URISELECT™4, 2013)



Obrázek 3 Nárůst kolonií na krevním agaru (foto: Szabová)



Obrázek 4 Nárůst kolonií na UriSelect agaru (foto: Szabová)

3.3. Metodika

3.3.1. Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Příprava vzorků pro mikrobiologické vyšetření

Ředění a příprava vzorků pro mikrobiologické vyšetření je upraveno v ČSN ISO 8261. Kultivace probíhala na Plate Count Agarech (PCA), které byly v laboratoři připraveny dle následujícího postupu: ve 150 ml dH₂O bylo rozpuštěno 0,75 g peptonu (Fluka Analytical), 0,375 g yeast extractu (Sigma-Aldrich) a 2,25 g agaru (Sigma-Aldrich). Zvláště byla připravena 20 % glukóza, protože pokud se glukóza autoklávovala s agarem, zkaramelizovala a připalovala se. Agary a 20 % glukóza se daly vyautoklávat na 15 minut při teplotě 121 °C. Po znovurozehrání agaru se přidalo 0,75 ml 20 % glukózy.

Stanovení CPM

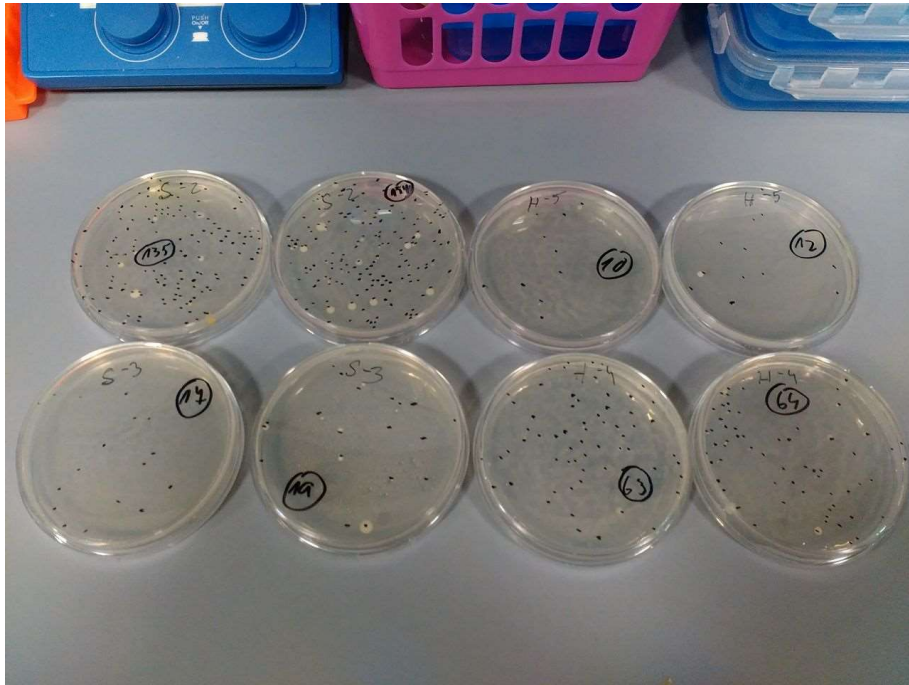
Stanovení CPM bylo provedeno dle ČSN EN ISO 4833 - 1, 2. Z každého vzorku bylo připraveno desítkové ředění. Inokulum bylo přelito kultivační půdou. Po přelití bylo inokulum promícháno, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení mikroorganismů v kultivační půdě. Na vodorovné a chladné podložce se kultivační 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 (**Obrázek 5**). K výpočtu byl použit vzorec, který je napsán níže. Jako měrná jednotka byla využita KTJ/ml a následující převod na logaritmus pomocí programu Microsoft Excel (2013).

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

- $\sum C$ - součet všech kolonií spočítaných na vybraných plotnách
- n_1 - počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění
- n_2 - počet ploten používaných pro výpočet z druhého ředění
- n_3 - počet ploten používaných pro výpočet z třetího ředění
- d - faktor prvního pro výpočet použitého ředění



Obrázek 5 Kultivační plotny použitelné pro výpočet celkového počtu mikroorganismů se stanoveným rozpětím 15 – 300 kolonií (foto: Szabová)

3.3.2. Vyšetření izolátů pomocí MALDI-TOF

Identifikace MO byla provedena pomocí přístroje MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Německo). Analýza byla provedena pomocí MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method a MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method.

Pro vyšetření na MALDI-TOF je nutné naočkovat čistou kulturu. Z naočkovaných vzorků na KA a URI byla provedena izolace kolonií podle fenotypu na nový KA. Poté byly kolonie přeneseny pomocí aplikátoru (výrobce doporučuje bambusové párátko) na pozici terčíku z oceli (**Obrázek 6**).



Obrázek 6 Ocelová destička pro MALDI-TOF Biotyper (foto: Szabová)

Izolát se převrství 1 μl matrice, která se připraví pomocí 2,5 mg kyseliny skořicové HCCA (Bruker) a 250 μl organického rozpouštědla. Zásobní roztok organického rozpouštědla je složen z 500 μl acetonitrilu (J. T. Baker), 475 μl QH₂O (Fisher Scientific) a 25 μl kyseliny trifluoroctové (Sigma-Aldrich). Vzorek se nechá vysušit na vzduchu při laboratorní teplotě. Po vykrystalizování matrice na vzduchu, je možno přistoupit k analýze. Destička s kapacitou 96 pozic je s připraveným zaschlým vzorkem vložena do hmotnostního spektrometru, kde je pod vakuem vzorek ozářen dusíkovým laserem.

4. Výsledky a diskuze

4.1. Celkový počet mikroorganismů

Vzorky pasterizovaného mléka byly odebrány ze dvou mléčných automatů v období od konce června 2017 do konce prosince 2017. Odběry byly pro porovnání rozděleny na odběry v teplejších (červen – září) a chladnějších (říjen – prosinec) obdobích roku. CPM se v teplejším období roku pohybovaly v rozpětí od 4,07 ($1,2 \times 10^4$) do 7,35 ($2,2 \times 10^7$) log KTJ/ml v Hodkovicích a od 3,27 ($1,9 \times 10^3$) do 5,36 ($2,3 \times 10^5$) log KTJ/ml v Suchdole (**Tabulka 2**). V chladnějším období roku se CPM pohybovaly od 4,26 ($1,8 \times 10^4$) do 5,83 ($6,7 \times 10^5$) log KTJ/ml v Hodkovicích a od 3,57 ($3,8 \times 10^3$) do 5,18 ($1,5 \times 10^5$) v Suchdole (**Tabulka 3**). Průměrný CPM v Hodkovicích za chladnější období byl 4,85 log KTJ/ml, za teplejší 5,44 log KTJ/ml. V Suchdole byl průměrný CPM za chladnější období 4,08 log KTJ/ml, za teplejší 4,38 log KTJ/ml.

Syrové mléko před zpracováním by podle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 nemělo překročit hodnotu 5 log KTJ/ml. Maximální CPM v pasterizovaném mléce není legislativně regulován, ale hodnoty od 6 log KTJ/ml jsou obecně považovány za konec doby použitelnosti (SCHMIDT et al., 2012; DOLL et al., 2017; ZIYAINA et al., 2018). Tento limit byl za sledované období překročen u tří vzorků, které byly odebrány v teplejším období roku (červenec, září) z mlékomatu v Hodkovicích. U jednoho vzorku dokonce hodnoty CPM dosahovaly $2,2 \times 10^7$ KTJ/ml (**Tabulka 2**).

PORCELLATO et al. (2018) uvedli, že syrové mléko, které ve výzkumu analyzovali, mělo rozmezí CPM 3,61 – 5,5 log KTJ/ml. Po pasterizaci hodnota nepřekročila 4 log KTJ/ml. Všechny vzorky mléka odebrané v mlékomatu v Hodkovicích překračovaly hodnotu CPM 4 log KTJ/ml. Proti tomu šest vzorků (35 %) suchdolského mléka, dva v teplejším a čtyři v chladnějším období roku, mělo hodnotu CPM pod 4 log KTJ/ml (**Tabulka 2, 3**). Zjištěné vysoké hodnoty CPM, zejména v mléce z hodkovického mlékomatu, by mohly být vysvětleny nižší účinností pasterizačního procesu. Např. FERNANE et al. (2016) ve své studii uvedli, že pasterizace byla neúčinná u 55 % vzorků.

Dalším možným vysvětlením vysokých hodnot CPM může být postpasterizační kontaminace, která má na hodnoty CPM negativní vliv (FROMM and BOOR, 2004). Vzhledem k tomu, že po odběru mléka nenastal zřetelný proplach dávkovače mléka, mohly být vyšší CPM způsobeny zbytky mléka, které zůstaly v dávkovači před samotným odběrem.

Tabulka 2 Celkové počty mikroorganismů (log; KTJ/ml) v pasterizovaném mléce ze dvou mléčných automatů v období červen – září 2017

Datum odběru	Hodkovice		Suchdol	
	log KTJ/ml	KTJ/ml	log KTJ/ml	KTJ/ml
27.06.	4,89	7,9x10 ⁴	n	n
12.07.	6,37	2,4x10 ⁶	3,27	1,9x10 ³
30.07.	5,88	7,5x10 ⁵	5,03	1,1x10 ⁵
09.08.	5,11	1,3x10 ⁵	4,68	4,8x10 ⁴
18.08.	4,93	8,6x10 ⁴	4,09	1,2x10 ⁴
24.08.	4,37	2,4x10 ⁴	5,36	2,3x10 ⁵
31.08.	4,07	1,2x10 ⁴	4,35	2,2x10 ⁴
08.09.	7,35	2,2x10 ⁷	4,52	3,3x10 ⁴
15.09.	6,05	1,1x10 ⁶	3,76	5,8x10 ³

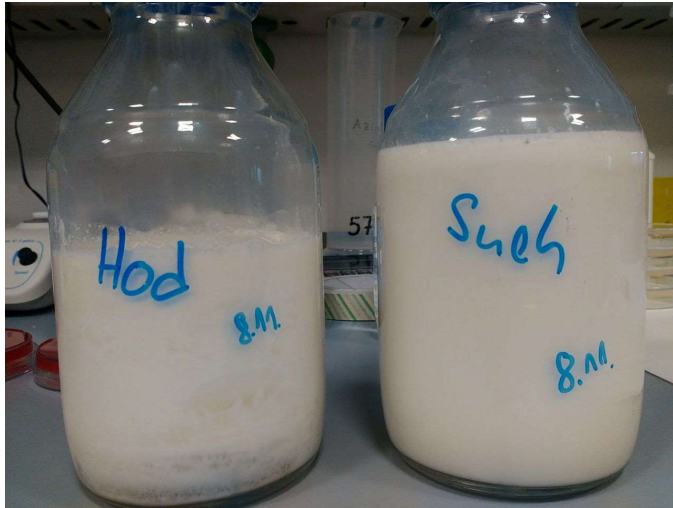
Vysvětlivky: KTJ = kolonie tvořící jednotky; n = odběr neuskutečněn

Tabulka 3 Celkové počty mikroorganismů (log; KTJ/ml) v pasterizovaném mléce ze dvou mléčných automatů v období říjen – prosinec 2017

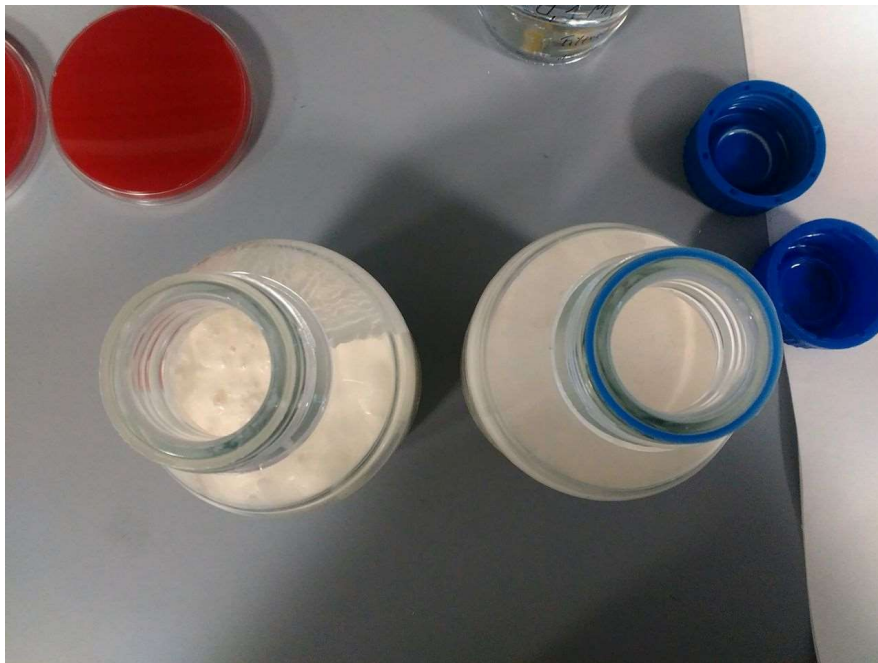
Datum odběru	Hodkovice		Suchdol	
	log KTJ/ml	KTJ/ml	log KTJ/ml	KTJ/ml
04.10.	5,50	3,1x10 ⁵	5,18	1,5x10 ⁵
12.10.	5,50	3,1x10 ⁵	3,80	6,2x10 ³
18.10.	5,83	6,7x10 ⁵	4,17	1,4x10 ⁴
26.10.	5,00	1,0x10 ⁵	3,57	3,8x10 ³
08.11.	4,26	1,8x10 ⁴	3,66	4,6x10 ³
16.11.	4,65	4,5x10 ⁴	4,02	1,1x10 ⁴
23.11.	4,29	1,9x10 ⁴	3,87	7,4x10 ³
01.12.	4,38	2,3x10 ⁴	4,43	1,8x10 ⁴
14.12.	4,28	1,8x10 ⁴	4,11	1,2x10 ⁴

Vysvětlivky: KTJ – kolonie tvořící jednotky

V pokusu bylo pozorováno a opakovaně zjištěno, že mléko z mlékomatu v Hodkovicích mělo po pětidenním skladování v chladničce výrazně změněné sensorické vlastnosti (žlutá barva, nakyslý zápach, změna konzistence), naopak mléko ze suchdolského mlékomatu po stejné době nejevilo známky kažení (**Obrázek 7 a 8**).



Obrázek 7 Mléko z 8. listopadu 2017 po pětidenním skladování při 6 °C. Vlevo Hodkovice, vpravo Suchdol (foto: Szabová)



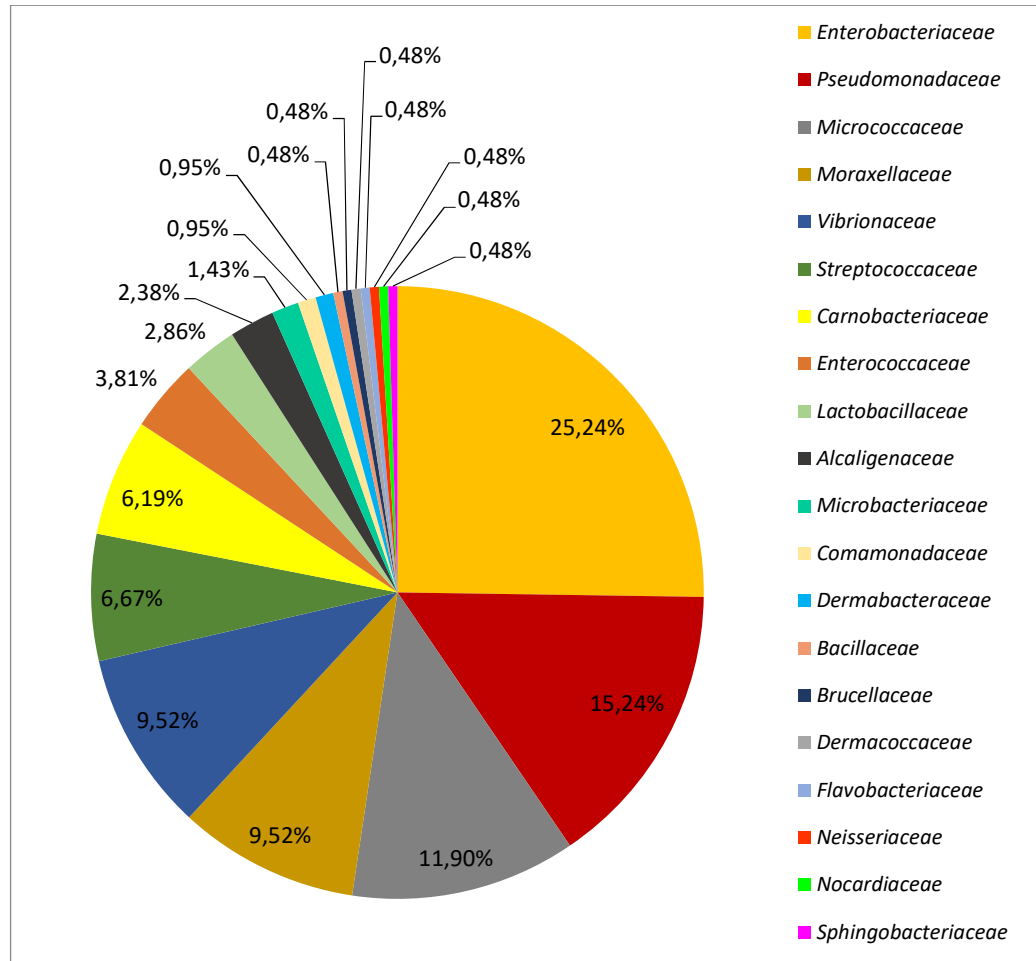
Obrázek 8 Mléko z 8. listopadu 2017 po pětidenním skladování při 6 °C. Vlevo Hodkovice, vpravo Suchdol (foto: Szabová)

4.2. Detekce mikroorganismů pomocí MALDI-TOF

Spektrum MO, detekovaných pomocí přístroje MALDI-TOF v pasterovaném mléce ze dvou mléčných automatů, bylo velmi široké. Některé z detekovaných MO se běžně vyskytují ve vnějším prostředí nebo osidlují např. kůži savců včetně člověka, jiné mohou být indikátory fekálního znečištění a některé se řadí mezi oportunní patogeny (SCHINDLER, 2014).

Součástí celkové bakteriální mikrobioty sledované v období od konce června 2017 do konce prosince 2017 bylo 210 MO patřících do čeledí *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Brucellaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Nocardiaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Dermabacteraceae*, a *Dermacoccaceae*. Nejčastěji byly ve vzorcích popsáni zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (25 %) (**Graf 1**). Z uvedeného celkového počtu MO bylo 44 % (92 MO) detekováno v mléce z mlékomatu v Hodkovicích, 56 % (118 MO) v mlékomatu v Suchdole. Z výsledků je patrné, že ačkoliv mléko z mlékomatu v Suchdole mělo nižší průměrné CPM (4,23 log KTJ/ml), než mléko z mlékomatu v Hodkovicích (5,15 log KTJ/ml), spektrum bakteriálních zástupců bylo v suchdolském mléce mnohem širší. Kromě širokého spektra bakteriálních zástupců (**Tabulka 4, 5**), byl v mléce ze suchdolského mlékomatu izolován též zástupce eukaryotních mikroorganismů, *Candida inconspicua*.

Graf 1 Četnost detekce (%) bakteriálních čeledí pomocí MALDI-TOF v pasterizovaném mléce ze dvou mléčných automatů (Hodkovice, Suchdol)



4.2.1. Detekované gramnegativní bakterie

Z celkových 210 identifikovaných MO patřilo 136 (64,8 %) MO do skupiny gramnegativních bakterií (**Tabulka 4**). Gramnegativní bakterie byly v porovnání s grampozitivními (35,2 %) detekovány častěji. Ve vzorcích mléka z obou mlékomatů byly zjištěny bakteriální rody čeledi *Enterobacteriaceae*. Konkrétně, v Hodkovicích byly určeny rody: *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Yersinia*, *Lelliottia* a *Serratia*. V Suchdole byly detekovány rody: *Buttiauxella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Pantoea*, *Raoultella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Escherichia* a *Kluyvera*. Uvedení zástupci patří do skupiny koliformních bakterií a jejich přítomnost naznačuje nehygienické zacházení s mlékem po pasterizaci (BURDOVÁ et al., 2002; GÖRNER and VALÍK, 2004; ŠTĚTINA 2009; CEMPÍRKOVÁ et al., 2012; ZIYAINA et al., 2018).

Tabulka 4: Gramnegativní bakterie detekované přístrojem MALDI-TOF v pasterizovaném mléce ze dvou mléčných automatů (Hodkovice, Suchdol)

Čeď	Rod	Druh	Přítomnost mikroorganismu		Nejvyšší dosažené skóre prokazatelnosti	
			Hodkovice	Suchdol	Hodkovice	Suchdol
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
	<i>Serratia</i>	<i>Serratia marcescens</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Serratia liquefaciens</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Enterobacter asburiae</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Enterobacter ludwigii</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
	<i>Yersinia</i>	<i>Yersinia</i> spp.	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter gillenii</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
	<i>Buttiauxella</i>	<i>Buttiauxella</i> spp.	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia alvei</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
	<i>Lelliottia</i>	<i>Lelliottia amnigena</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
	<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella</i> spp.	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Raoultella ornithinolytica</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
<i>Raoultella terrigena</i>		n	✓	n/a	+++ / ++	
<i>Kluyvera</i>	<i>Kluyvera intermedia</i>	n	✓	n/a	+++ / ++	
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Pseudomonas koreensis</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Pseudomonas putida</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>		n	✓	n/a	+	
Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas terrigena</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Comamonas testosteroni</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	✓	n	+++ / ++	n/a
		<i>Acinetobacter baumannii</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Acinetobacter guillouiae</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Acinetobacter johnsonii</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Acinetobacter junii</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Acinetobacter pittii</i>	✓	-	+++ / ++	n/a
	<i>Acinetobacter ursingii</i>	n	✓	n/a	+++ / ++	
<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	✓	n	+++ / ++	n/a	
Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	n	✓	n/a	+
Vibrionaceae	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i> spp.	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Aeromonas veronni</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum maltophilia</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
Neisseriaceae	<i>Microvirgula</i>	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i>	n	✓	n/a	+++ / ++

Vysvětlivky: ✓ = přítomnost daného mikroorganismu; n = nepřítomnost daného mikroorganismu; +++/++ = pravděpodobná detekce na úrovni druhu; + = pravděpodobná detekce na úrovni rodu; n/a = výsledek nedetekován

4.2.1.1. *Escherichia coli* (*Shigella* spp.)

E. coli byla izolovaná pouze ze dvou vzorků pasterizovaného mléka a to v teplejší části roku (červenec, srpen) ze suchdolského mlékomatu. Tato bakterie patří mezi běžné komenzály tlustého střeva a je považována za hlavní ukazatel fekálního znečištění při výrobě potravin. Její přítomnost ve zpracovaných potravinách je výsledkem rekontaminace, neboť tato bakterie obvykle nepřežije procesy konzervace potravin. Mezi hlavní příčiny přítomnosti *E. coli* v potravinářských výrobcích patří nedodržování příslušných technologických režimů, nedodržení doporučených technologických norem a nedostatky v oblasti osobní hygieny (SCHINDLER 2014; ZEINHOM and ABDEL-LATEF, 2014). Většina kmenů *E. coli* nepředstavuje závažné zdravotní riziko, ale některé sérotypy mohou způsobit život ohrožující alimentární onemocnění. K těmto kmenům patří především shigatogenní (STEC) kmeny produkující shigatoxin 1 a 2 a dále v rámci nich podskupina enterohemoragických (EHEC) kmenů (např. sérotyp O157:H7). K nejzávažnějším dopadům infekce těmito kmeny patří hemolyticko-uremický syndrom (tzv. HUS) ohrožující především velmi malé děti (PICOZZI et al., 2005; HASOŇOVÁ 2012; SCHINDLER, 2014).

V České republice jsou sice EHEC kmeny přítomny, ale onemocnění je velmi vzácné (SCHINDLER, 2014). Jedním z možných zdrojů *E. coli* (EHEC) v mléce jsou mastitidy. Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně provedl hodnocení celkem 502 vzorků mastitidního mléka, v nichž bylo identifikováno 109 izolátů *E. coli*. Žádný z izolátů nepatřil mezi EHEC (quoted in HASOŇOVÁ, 2012).

Rod *Shigella* má téměř identický genom jako *E. coli* a fenotypem jsou si také podobné. Lze je považovat za méně aktivní escherichie (SCHINDLER, 2014). Databáze MALDI-TOF nedokáže od sebe tyto rody odlišit.

4.2.1.2. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas byl nejčetněji se vyskytujícím rodem, který se ve vzorcích mléka vyskytoval v průběhu celé studie (**Tabulka 7**). Přítomnost zástupců tohoto psychrotrofního rodu může vést k negativním sensorickým změnám pasterizovaného mléka v důsledku produkce enzymů, jež degradují hlavní složky mléka (GRAM et al., 2002; CHEN et al., 2003; MARTIN et al., 2018). V suchdolském mléku byla přítomnost *Pseudomonas* spp. prokázána ve 100 % odebraných vzorků, v hodkovickém mléku v 50 % vzorků. PORCELLATO et al. (2018) ve svém výzkumu sledovali vliv teploty na mikrobiologické zatížení mléka. Bakterie patřící do řádu *Pseudomonadales* se častěji vyskytovaly v zimních měsících. *Pseudomonas* spp. představoval 26 % celkové mikroflóry. Dle DUMALISILE et al. (2005) a MARTIN et al. (2018) přítomnost *Pseudomonas* spp. značí špatné zacházení s pasterizovaným mlékem, protože tento rod není schopen přežít pasterizační záhřev. Lze tedy předpokládat, že se i v naší studii dostali zástupci tohoto rodu do mléka až po pasterizaci.

DOGAN and BOOR (2003) sledovali degradaci mléčných složek související s přítomností kontaminující *Pseudomonas* spp. Většina izolátů byla identifikována jako *P. putida* a *P. fluorescens*. V naší studii byly identifikovány druhy *P. aeruginosa*, *P. koreensis*, *P. putida*, a *P. stutzeri*.

Četnost rodu *Pseudomonas* v syrovém a pasterizovaném mléku je doložena dvěma staršími studii. V jedné studii z roku 1975 se prokázalo, že 70 – 90 % psychrotrofů izolovaných ze vzorků syrového mléka skladovaných po dobu 1 týdne při 4 °C bylo právě z rodu *Pseudomonas*. Ve druhé z roku 1992 bylo 87 % psychrotrofních bakterií izolovaných z pasterizovaného mléka skladovaných při 4 °C *Pseudomonas* spp. (quoted in CHEN et al., 2003).

4.2.1.3. *Aeromonas spp.*

Rod *Aeromonas* spp. patřil mezi jedny z nejčastěji identifikovaných po celou dobu studie (**Tabulka 6**).

KIROV et al. (1993) konstatovali, že výskyt *Aeromonas* spp. v mléce by mohl u vnímavých osob způsobit gastroenteritidu. Uvedení autoři detekovali aeromonády v syrovém mléce v 60 % vzorků (43 ze 72 vzorků). Po pasterizaci stále 4 % vzorků obsahovaly významné kmeny aeromonád, z nichž některé produkovaly exotoxiny a byly schopné adherovat k epiteliálním buňkám.

FREITAS et al. (1993) detekovali *Aeromonas* spp. ve 28,6 % vzorků pasterizovaného mléka a ve 32 % vzorků bílých sýrů v Brazílii, přičemž nejčastěji se jednalo o druhy *A. caviae*, *A. hydrophila* a *A. schubertii*. V naší studii byl identifikován pouze druh *A. veronii*.

Přítomnost *Aeromonas* spp. byla potvrzena v syrovém mléce a mléčných výrobcích (EL-SHORBAGY and AL GANZOURY, 2002; AHMED et al., 2014). Vzhledem k tomu, že pasterizační proces je pro *Aeromonas* spp. likvidační, lze jeho průkaz v naší studii vysvětlit postpasterizační kontaminací. Zájem o tento rod vyvolává především skutečnost, že zástupci jsou schopni růstu při chladničkových teplotách a produkovat termostabilní enzymy (AHMED et al., 2014).

4.2.1.4. *Yersinia enterocolitica*

Yersinia spp. patřila mezi čteněji se vyskytující rody (**Tabulka 6**). Ve čtyřech vzorcích hodkovického mléka byl v chladnější části roku identifikován druh *Y. enterocolitica*, který je schopen růstu v širokém teplotním rozmezí (od -2 do 42 °C), s optimem 28 – 29 °C (BARI et al. 2011 a HASONOVÁ 2012). JIČÍNSKÁ and HAVLOVÁ (1995) potvrzují, že *Y. enterocolitica* se častěji v mléce vyskytuje v chladnějších měsících.

HAMAMA et al. (1992) ve své studii zaměřené na výskyt *Y. enterocolitica* v syrovém a pasterizovaném mléce, ve vzorcích pasterizovaného mléka tuto bakterii neprokázali.

Za rok 2013 Evropský úřad pro bezpečnost potravin hlásil celkem 6471 případů yersiniózy, což z ní činí třetí nejčastěji hlášenou zoonózu v Evropské unii. Dominantně prokazovaným druhem byla *Y. enterocolitica* (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2015).

DIVYA and VARADAJ (2013) uvádějí, že *Yersinia* spp. nepřežívá pasterizační záhřev. Podle LONGENBERGER et al. (2014) je příčinou přítomnosti zástupců tohoto rodu v pasterizovaném mléku postapasterizační kontaminace, selhání pasterizace nebo přidání syrového mléka k již zpasterizovanému. BURSOVÁ et al. (2017) potvrdili, že pasterizované kravské i kozí mléko představuje vhodné prostředí pro růst a množení *Y. enterocolitica* bez ohledu na teplotu skladování. V případě kontaminace pasterizovaného mléka se yersinie mohou množit na množství považované za infekční dávku během několika hodin nebo dnů, a to v závislosti na počtu přítomných bakterií a teplotě skladování.

4.2.2. Detekované grampozitivní bakterie

Z celkových 210 identifikovaných MO patřilo 74 (35,24 %) MO do skupiny grampozitivních bakterií (**Tabulka 5**). Z bakterií mléčného kvašení, které jsou běžnou součástí mléčné mikroflóry (ČURDA and ŠTĚTINA, 2014) byly ve vyšetřovaném pasterizovaném mléce detekovány *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* a *Leuconostoc lactis*. Zástupci čeledi *Lactobacillaceae* byli detekováni pouze v mléce ze suchdolského mlékomatu. PORCELLATO et al. (2018) uvedli, že bakterie patřící do řádu *Lactobacillales* se v mléce vyskytovaly pouze v zimních měsících. V naší studii byly bakterie tohoto řádu detekovány jak v chladnějším, tak v teplejším období roku.

Tabulka 5: Grampozitivní bakterie detekované přístrojem MALDI-TOF v pasterizovaném mléce ze dvou mléčných automatů (Hodkovice, Suchdol)

Čeleď	Rod	Druh	Přítomnost mikroorganismu		Nejvyšší dosažené skóre prokazatelnosti	
			Hodkovice	Suchdol	Hodkovice	Suchdol
Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria</i> spp.	n	✓	n/a	+
		<i>Kocuria kristinae</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
		<i>Staphylococcus equorum</i>	✓	n	+	n/a
		<i>Staphylococcus gallinarum</i>	✓	✓	+	+
		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	n	✓	n/a	+
		<i>Staphylococcus hominis</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
		<i>Staphylococcus chromogenes</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Staphylococcus sciuri</i>	n	✓	n/a	+
		<i>Staphylococcus succinus</i>	n	✓	n/a	+
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Lactococcus raffinolactis</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
		<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	✓	n	+
	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>	✓	✓	+	+
		<i>Streptococcus salivarius</i>	n	✓	n/a	+
		<i>Streptococcus suis</i>	n	✓	n/a	+
		<i>Streptococcus uberis</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	✓	✓	+++ / ++	+++ / ++
		<i>Enterococcus faecalis</i>	n	✓	n/a	+++ / ++
		<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> spp.	✓	n
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	n	✓	n/a	+
		<i>Lactobacillus paracasei</i>	n	✓	n/a	+
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	n	✓	n/a	-
	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	n	✓	n/a	+
Nocardiaceae	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium flavescens</i>	✓	n	+++ / ++	n/a
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	n	✓	+++ / ++	n/a
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium</i> spp.	✓	✓	-	+++ / ++
Dermabacteraceae	<i>Brachybacterium</i>	<i>Brachybacterium</i> spp.	n	✓	n/a	+
		<i>Brachybacterium nesterenkovi</i>	n	✓	n/a	+
Dermacoccaceae	<i>Dermacoccus</i>	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>	n	✓	n/a	+

Vysvětlivky: ✓ = přítomnost daného mikroorganismu, n = nepřítomnost daného mikroorganismu, +++/++ = pravděpodobná detekce na úrovni druhu, + = pravděpodobná detekce na úrovni rodu, - = nepravděpodobná detekce rodu, n/a = výsledek nedetekován

4.2.2.1. *Bacillus* spp.

Rod *Bacillus* spp. byl zachycen pouze jednou, a to v chladnější části roku (říjen) z mléka hodkovického mlékomatu. PORCELLATO et al. (2018) sledovali vliv teploty na mikrobiologické zatížení mléka. V jejich studii byl *Bacillus* spp. potvrzen v syrovém i pasterizovaném mléce během jarních a letních měsíců a představoval 28 % z celkové mikroflóry mléka. V brazilské studii byl *Bacillus* spp. detekován v pasterizovaných výrobcích a pasterizátoru (SALUSTIANO et al., 2009). Podobná studie ve Švédsku popisuje *B. cereus* v konečných pasterizovaných výrobcích a pasterizátoru jako důsledek postpasterizační kontaminace (ENORTH et al., 2001). BANYKÓ and VYLETĚLOVÁ (2009) kultivovali syrové mléko, pasterizované mléko a jogurty. Ve 42,5 % vzorků prokázali přítomnost *B. licheniformis* a v 15,5 % vzorků *B. cereus*.

Dle MARTIN et al. (2018) může *Bacillus* spp. přežít pasterizační proces ve formě spór nebo se do mléka může dostat až po pasterizaci jako kontaminant. HASOŇOVÁ (2012) poukazuje, že spóry by neměly přežít UHT zářev. Některé kmeny *B. cereus* jsou schopny se množit i za chladných podmínek a mohou produkovat toxiny (HASOŇOVÁ, 2012; SCHMIDT et al. 2012). Otrava vyvolaná těmito toxiny má většinou mírný průběh a dochází k samovolnému uzdravení, avšak v některých případech může způsobit vážné onemocnění s fatálními následky v důsledku selhání jater (ARNESEN et al., 2008).

4.2.2.2. *Streptococcus* spp.

Přítomnost bakterií *Streptococcus uberis* a *Streptococcus parauberis* v naší studii naznačuje, že by mléko mohlo být odebráno od dojnic trpících klinickou nebo subklinickou mastitidou, jak uvádí KHAN et al. (2003). Oba tyto zástupci jsou považováni za druhově specifické environmentální patogeny způsobující mastitidu skotu. Jsou schopni přežívat i na podestýlce, proto bývá záchyt jejich šíření složitý. Další identifikovaný zástupce byl *S. suis*, který je považován za bakterii způsobující zoonózu. Může způsobit infekci u člověka, který přišel do kontaktu s nakaženým zvířetem nebo infikovanou potravinou. *Streptococcus mitis*, který byl

v pasterizovaném mléce rovněž detekován, patří do skupiny viridujících streptokoků, který se běžně nachází v dutině ústní a na kůži. Může se uplatnit při kažení zubů, artritidě nebo infekční endokarditidě u lidí (HAENNI et al., 2018).

4.2.2.3. *Microbacterium* spp., *Micrococcus luteus*

V mléce z obou mlékomatů byl detekován *Micrococcus luteus* a *Microbacterium* spp. Tyto bakterie jsou schopné přežít pasterizační podmínky (72 °C/15 s) ve vegetativní formě. Na druhou stranu však nebývají schopné růstu při nižších chladírenských teplotách (MARTIN et al., 2018). Lze tedy předpokládat, že byly součástí mikroflóry syrového mléka.

4.2.3. Nejčastěji detekované bakteriální rody/druhy

Některé bakterie se ve vyšetřovaném mléce vyskytovaly pravidelně, některé spíše sporadicky (**Tabulka 6**). DOGAN and BOOR (2003) a HERVERT et al. (2016) poukazují na to, že většina postpasterizačních kontaminantů patří do skupiny gramnegativních nekoliformních MO, jako je *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. a *Acinetobacter* spp. RANIERI and BOOR (2009) uvedli, že 75 % MO, které ve své studii izolovali byly rovněž gramnegativní nekoliformní MO (konkrétně *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. a *Flavobacterium* spp.). RANIERI and BOOR, (2009) a MARTIN et al. (2018) se ve svých studiích shodují na tom, že *Pseudomonas* spp. je nejčastěji hlášený MO odpovědný za postpasterizační kontaminaci. V naší studii se nejčastěji vyskytoval rod *Pseudomonas*, a to v 74,3 %, dále rod *Aeromonas* v 57,1 % vzorků a rod *Acinetobacter* ve 48,6 % vzorků.

Naopak rody *Ochrobactrum*, *Kluyvera*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, *Microvirgula*, *Corynebacterium* a *Dermacoccus* se podařilo zachytit pouze jedenkrát.

Tabulka 6 Četnost detekce vybraných bakteriálních rodů/druhů pomocí MALDI-TOF v pasteurizovaném mléce z mlékomatu v Hodkovicích (n=18) a v Suchdole (n=17)

Rod/druh	Hodkovice (n = 18)		Suchdol (n = 17)		Celkem	
	n	%	n	%	n	%
<i>Pseudomonas</i> spp.	9	50,0	17	100,0	26	74,3
<i>Aeromonas</i> spp.	13	72,2	7	41,2	20	57,1
<i>Acinetobacter</i> spp.	4	22,2	13	76,5	17	48,6
<i>Staphylococcus</i> spp.	4	22,2	11	64,7	15	42,8
<i>Buttiauxella</i> spp.	11	61,1	2	11,8	13	37,1
<i>Carnobacterium</i> spp.	13	72,2	n	n	13	37,1
<i>Serratia</i> spp.	4	22,2	4	23,5	8	22,9
<i>Enterobacter</i> spp.	3	16,7	5	29,4	8	22,9
<i>Micrococcus luteus</i>	6	33,3	1	5,9	7	20,0
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	1	5,5	5	29,4	6	17,1
<i>Enterococcus</i> spp.	1	5,5	5	29,4	6	17,1
<i>Lactococcus</i> spp.	n	n	6	35,3	6	17,1
<i>Yersinia</i> spp.	4	22,2	1	5,9	5	14,3
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	11,1	3	17,6	5	14,3
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	5,5	4	23,5	5	14,3

Vysvětlivky: n = rod/druh neidentifikován

Rody *Streptococcus* spp. a *Lactobacillus* spp. nebyly zařazeny do tabulky nejčetnějších bakteriálních rodů z důvodu špatné prokazatelnosti. Rod *Streptococcus* spp. byl přístrojem MALDI-TOF detekován osmkrát, ale jen ve dvou případech (*S. uberis*) byl detekován na úroveň pravděpodobného druhu (+). Rod *Lactobacillus* spp. byl detekován pětkrát, ale přístroj ho také dokázal detekovat jen na úroveň pravděpodobného rodu (+). Ostatní četné MO dokázal přístroj ve většině případů detekovat na úroveň druhu (+++/+++).

5. Závěr

Předkládaná studie posuzovala celkové počty mezofilních mikroorganismů a detekovala jednotlivé mikroorganismy pomocí hmotnostní spektrometrie Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight v pasterizovaném mléce odebíraném ze dvou mléčných automatů (Hodkovice, Suchdol).

Ve sledovaném období od června do prosince 2017 bylo zjištěno, že:

- celkové počty mikroorganismů se v teplejším období roku (červen – září) pohybovaly v rozpětí od 4,07 ($1,2 \times 10^4$) do 7,35 ($2,2 \times 10^7$) log KTJ/ml v Hodkovicích a od 3,27 ($1,9 \times 10^3$) do 5,36 ($2,3 \times 10^5$) log KTJ/ml v Suchdole.
- v chladnějším období roku (říjen – prosinec) se celkové počty mikroorganismů pohybovaly od 4,26 ($1,8 \times 10^4$) do 5,83 ($6,7 \times 10^5$) log KTJ/ml v Hodkovicích a od 3,57 ($3,8 \times 10^3$) do 5,18 ($1,5 \times 10^5$) v Suchdole.
- průměrný celkový počet mikroorganismů v Hodkovicích za chladnější období byl 4,85 log KTJ/ml, za teplejší 5,44 log KTJ/ml. V Suchdole byl průměrný celkový počet mikroorganismů za chladnější období 4,08 log KTJ/ml, za teplejší 4,38 log KTJ/ml.
- mléko z mlékomatu v Hodkovicích mělo po pětidenním skladování při 6 °C výrazně horší sensorické vlastnosti (žlutá barva, nakyslý zápach, změna konzistence) v porovnání s mlékem ze suchdolského mlékomatu, které po stejné době nejevilo známky kažení.
- pomocí hmotnostního spektrometru bylo identifikováno celkem 210 mikroorganismů patřících do čeledí *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Comamonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Alcaligenaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Brucellaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Neisseriaceae*, *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Nocardiaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Microbacteriaceae*, *Dermabacteraceae*, a *Dermaococcaceae*.
- nejčastěji se ve vzorcích mléka vyskytoval rod *Pseudomonas* (74,3 % vzorků), *Aeromonas* (51,7 % vzorků) a *Acinetobacter* 48,6 % vzorků).

- některé vzorky pasterizovaného mléka obsahovaly bakterie, které by mohly způsobit alimentární infekci jako *Yersinia enterocolitica* a *Escherichia coli*.

Studie naznačila, že některé kontrolované vzorky pasterizovaného mléka z mléčných automatů nejsou vhodné k přímé spotřebě a přítomnost potenciálních patogenních bakterií by mohla představovat zdravotní riziko.

6. Bibliografie

AHMED, N. I., ABD EL AAL, S. F. A., AYOUB, M.A., EL SAYED, M.S. (2014): Enumeration and Characterization of *Aeromonas* spp. Isolated from Milk and Some Dairy Products in Sharkia Governorate Egypt. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 40. p. 52-64.

ALOTHMAN, M., LUSK, K. A., SILCOCK, P. J., BREMER, P. J. (2018): Relationship between total microbial numbers, volatile organic compound composition, and the sensory characteristics of whole fresh chilled pasteurized milk. *Food Packaging and Shelf Life*. 69(8). p. 69-75.

ARNESEN, L., FAGERLUND, A., GRANUM, P. (2008): From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(4). p. 579-606.

BANYKÓ, J. and VYLETĚLOVÁ, M. (2009): Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in Applied Microbiology*. 48(3). p. 318-323.

BARI, M. L., HOSSAIN, M. A., ISSHIKI, K., UKUKU, D. (2011): Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. *Journal of Pathogens*. 2011. p. 1-13.

BURDOVÁ, O., BARANOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., RÓZAŇSKA, H., ROLA, J. G. (2002): Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*. 46(2). p. 325-329.

BURSOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ, R., MYŠKOVÁ P. (2014) *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-676-6.

BURSOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L., HARUŠTIAKOVÁ, D., JANŠTOVÁ, B. (2017): Growth potential of *Yersinia enterocolitica* in pasteurised cow's and goat's milk stored at 8 °C and 24 °C. *Food Control*. 73. p. 1415-1419.

CEMPÍRKOVÁ, R., SAMKOVÁ, E., VYLETĚLOVÁ, M. (2012): Celkový počet mikroorganismů. p. 122-127 *Mléko: produkce a kvalita*. Samková E., Cempírková R., 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 v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-383-7.

CHEN, L., DANIEL, R. M., COOLBEAR, T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*. 13(4). p. 255-275.

ČURDA, L., and ŠTĚTINA, J. (2014): Mléko a mléčné výrobky. p. 118-146. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Dostálová J., Kadlec P., Bubník Z., Cuhra P., Čopíková J., Čurda L., Dobiáš J., Dostálek P., Fiala J., Gabrovská D., Hrušková M., Koberna M., Kocourek V., Málková H., Málková I., Melzoch K., Míková K., Opatová H., Petříková D., Pipek P., Pivoňka J., Příhoda J., Pudil F., Rajchl A., Réblová Z., Rychtera M., Sedláček J., Sluková M., Šárka E., Ševčík R., Štětina J., Tláskal P., Voldřich M., Winklerová D., monografie. 1. vyd. Ostrava: Key Publishing. ISBN 978-80-7418-208-2.

DIVYA, K. H. and VARADARAJ, M. C. (2013): Behavioral Pattern of Native Food Isolates of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia intermedia* under Simulated Time-Temperature Combinations of the Food Chain. *Food and Nutrition Sciences*. 4. p. 365-375.

DOGAN, B., and BOOR, K. J. (2003): Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1). p. 130-138.

DOLL, E. V., SCHERER, S., WENNING, M. (2017): Spoilage of Microfiltered and Pasteurized Extended Shelf Life Milk Is Mainly Induced by Psychrotolerant Spore-Forming Bacteria that often Originate from Recontamination. *Frontiers in Microbiology*. 8(135). p. 1-13.

DUMALISILE, P., WITTHUHN, R. C., BRITZ, T. J. (2005): Impact of different pasteurization temperatures on the survival of microbial contaminants isolated from pasteurized milk. *International Journal of Dairy Technology*. 58(2). p. 74-82.

EL-SHORBAGY, I. M., AL GANZOURY, H. H. (2002): Incidence of *Aeromonas* species in raw milk and yoghurt in Zagazig city. *Journal Egypt Veterinary Medicine Association*. 62(4). p. 229-233.

ELWELL, M.W. and BARBANO, D. M. (2006): Use of Microfiltration to Improve Fluid Milk Quality. *Journal of Dairy Science*. 89(1-2). p. 20-30.

ENEROTH, Å., SVENSSON, B., MOLIN, G., CHRISTIANSSON, A. (2001): Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *Journal of Dairy Research*. 68(2). p. 189-196.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. (2015). *The EFSA Journal*. 13(1). p. 165.

FERNANE, H., TOUIL, A. T., BEMBAREK, H., BENCHOHRA, M. (2016): Physicochemical Composition and Sanitary Quality of Pasteurized Milk Marketed in Western Algeria. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. 6(12). p. 63-68.

FREITAS, A. C., NUNES, M. P., MILHOMEM, A. M., RICCIARDI, I. D. (1993): Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection*. 56. p. 62-65.

FROMM, H.I. and BOOR, K. J. (2004): Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of Food Science*. 69(8). p. 207-214.

GÖRNER, F. a VALÍK, L. (2004): *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum. ISBN 978-80-96706-49-5.

GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J. B., CHRISTENSEN, A. B., GIVSKOV M. (2002): Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 78(1-2). p. 79-97.

HAMAMA, A., EL MARRAKCHI, A., EL OTHMANI, F. (1992): Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in milk and dairy products in Morocco. *International Journal of Food Microbiology*. 16. p. 69-77.

HAENNI, M., LUPO, A., ADEC, J. Y. (2018): Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiology Spectrum*. 6(2). p. 1-25.

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

HASOŇOVÁ, L. (2012): Potenciální zdravotní rizika konzumace mléka a mléčných výrobků. p. 204-219. *Mléko: produkce a kvalita*. Samková E., Cempírková R., Hanuš O., Hasoňová L., Hlaváček J., Jelen P., Jeřábková J., Kopáček J., Lužová T., Navrátilová P., Seydlová R., Špička J., Šustová K., Vorlová L., Vyletělová M., vědecká monografie 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-383-7.

HERVERT, C.J., ALLES, A. S., MARTIN, N. H., BOOR, K. J., WIEDMANN, M. (2016): Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. *Journal of Dairy Science*. 99(9). p. 7033-7042.

JIČÍNSKÁ, E. and HAVLOVÁ, J. (1995): *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. UZPI: Praha. ISBN 80-85120-47-X.

KAUFMANN, V., SCHERER, S., KULOZIK, U. (2010): Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von Konsummilch und ihre stofflichen Veränderungen. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 5(1). p. 59-64.

KHAN, I. U., HASSAN, A. A., ABDULMAWJOOD, A., LÄMMLER, C., WOLTER, W. ZSCHÖCK, M. (2003): Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *Journal of Veterinary Science*. 4(3). p. 213-223.

KIROV, S. M., HUI, D. S., HAYWARD, L. J., (1993): Milk as a Potential Source of *Aeromonas* Gastrointestinal Infection. *Journal of Food Protection*. 56(4). p. 306-312.

LONGENBERGER, A. H., GRONOSTAJ, M. P., YEE G. Y. (2014): *Yersinia enterocolitica* infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March–August, 2011. *Epidemiology and Infection*. 142(8). p. 1640-1650.

MARTIN, N.H., CAREY, N. R., MURPHY, S. C., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. (2012): A decade of improvement: New York State fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*. 95(12). p. 7384-7390.

MARTIN, N. H., BOOR, K. J., WIEDMANN, M. (2018): Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*. 101(1). p. 861-870.

MASIELLO, S. N., MARTIN, N. H., TRMČIĆ, A., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. (2016): Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*. 99(1). p. 130-140.

NYČ, O., BUBENÍČEK, K. (2015): MALDI TOF – Špičková technologie pro mikrobiologii 21. století. *Královéhradecký laboratorní BULLETIN informace pro lékaře a zdravotníky*. 3. p. 6.

ORTUZAR, J., MARTINEZ, B., BIANCHINI, A., STRATTON, J., RUPNOW, J., WANG, B. (2018): Quantifying changes in spore-forming bacteria contamination along the milk production chain from farm to packaged pasteurized milk using systematic review and meta-analysis. *Food Control*. 86. p. 319-331.

PATEL, R. (2013): Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*. 4(57). p. 564-572.

PICOZZI, C., FOSCHINO, R., HEUVELINK, A., BEUMER, R., (2005): Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. *Letters in Applied Microbiology*. 40(6). p. 491-496.

PORCELLATO, D., ASPHOLM, M., SKEIE, S. B., MONSHAUGEN, M., BRENDEHAUG, J., MELLEGÅRD, H. (2018): Microbial diversity of consumption milk during processing and storage. *International Journal of Food Microbiology*. 266(2). p. 21-30.

QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COTTER, P. D. (2013): The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*. 37(5). p. 664-698.

RAJMOHAN, S., DODD, C. E. R., WAITES, W. M., (2002): Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*. 93(2). p. 205-213.

RANIERI, M. L., and BOOR, K. J. (2009): Short communication: Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *Journal of Dairy Science*. 92(10). p. 4833-4840.

SALUSTIANO, V. C., ANDRADE, N. J., SOARES, N. F. F., LIMA, J. C., BERNARDES, P. C., LUIZ, L. M. P., FERNANDES, P. E. (2009): Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control*. 20(4). p. 439-442.

SARKAR, S. (2015): Microbiological Considerations: Pasteurized Milk. *International Journal of Dairy Science*. 10(5). p. 206-218.

SCHINDLER, J. (2014): *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. Sestra. ISBN 9788024747712.

SCHMIDT, V. S. J., KAUFMANN, V., KULOZIK, U., SCHERER, S., WENNING, M. (2012): Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*. 154(1-2). p. 1-9.

ŠTĚTINA, J. (2009): Technologie mléka a mlékárenských výrobků. p. 227-238. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M., Brányik T., Bubník Z., Čerovský M., Čopíková J., Čurda L., Damnerová K., Dobiáš J., Dostálek P., Dostálová J., Fiala J., Filip V., Hajšlová J., Hrušková M., Koberna M., Marek M., Miková K., Opatová H., Pazlarová J., Pipek P., Pivoňka J., Plocková M., Příhoda J., Rychtera M., Šárka E., Šmidrkal J., Štětina J., Valentová O., monografie. vyd. 1. Ostrava: Key Publishing. Monografie. ISBN 978-80-7418-051-4.

ŠUSTOVÁ, K. and SAMKOVÁ, E. (2012): Biokatalyzátory. p. 108-113. *Mléko: produkce a kvalita*. Samková E., Cempírková R., Hanuš O., Hasoňová L., Hlaváček J., Jelen P., Jeřábková J., Kopáček J., Lužová T., Navrátilová P., Seydlová R., Špička J., Šustová K., Vorlová L., Vyletělová M., vědecká monografie 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-383-7.

UriSelect™4 [online]. (2013): Francie: BioRad [cit. 2018-03-19]. Dostupné z: http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/cs/63726_2013_11_CZ.pdf

YILMAZ, G., AYAR, A., AKIN, N. (2005): The effect of microbial lipase on the lipolysis during the ripening of Tulum cheese. *Journal of Food Engineering*. 69(3). p. 269-274.

ZEINHOM, M. M. A. and ABDEL-LATEF, G. K. (2014): Public health risk of some milk borne pathogens. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(3). p. 209-215.

ZIYAINA, M., GOVINDAN, B. N., RASCO, B., COFFEY, T., SABLANI, S. S. (2018): Monitoring Shelf Life of Pasteurized Whole Milk Under Refrigerated Storage Conditions: Predictive Models for Quality Loss. *Journal of Food Science*. 83(2). p. 409-418.

6.1. 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 8261 (560111) Mléko a mléčné výrobky. Příprava analytických vzorků a ředění pro mikrobiologické zkoušení

Nařízení komise (ES) č. 1662/2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu

Nařízení komise (ES) č. 365/2010, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, pokud jde o *Enterobacteriaceae* v pasterizovaném mléce a v dalších pasterizovaných tekutých mléčných výrobcích a o *Listeria monocytogenes* v potravinářské soli

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

Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje

Zrušená vyhláška č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje