

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Mikrobiologická kvalita syrového kravského mléka na
českém trhu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Červíková Martina

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Vedoucí práce: Ing. Popelářová Eva, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikrobiologická kvalita syrového kravského mléka na českém trhu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Popelářové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Také děkuji své rodině za podporu a pomoc, kterou mi poskytovala.

Mikrobiologická kvalita syrového kravského mléka na českém trhu

Souhrn

Tato práce se zabývala mikrobiologickou kvalitou syrového mléka distribuovaného ke konzumentům pomocí přímého prodeje z farmy a prodejem z mléčných automatů. Během letního období roku 2017 bylo v průběhu 4 měsíců v pravidelných intervalech provedeno 10 odběrů syrového mléka z přímého prodeje z 2 farem a z 2 mléčných automatů.

U všech vzorků byla provedena stanovení počtu enterokoků, koliformních bakterií, celkového počtu mikroorganismů a sporotvorných bakterií.

Norma ČSN 57 0529 udávala limit pro obsah enterokoků a koliformních bakterií 10^3 KTJ/ml. Při rozborech mléka z mléčných automatů bylo při stanovení počtu enterokoků dosaženo hodnot do max. $2,92 \times 10^2$ KTJ/ml, u mléka z farmy z přímého prodeje byl nejvyšší počet enterokoků zaznamenán $3,72 \times 10^2$ KTJ/ml. Výsledné počty mikroorganismů splnily původní normu.

Počet koliformních bakterií byl v mléce z automatů nalezen v maximální hodnotě $8,95 \times 10^2$ KTJ/ml, pouze u farmy v 1 odběru překročil limit původní normu.

U stanovení celkového počtu mikroorganismů oba způsoby prodeje mléka splnily Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve stanoveném limitu 10^5 KTJ/ml. Maximální hodnota byla zjištěna $2,61 \times 10^4$ KTJ/ml.

Obsah sporotvorných bakterií splnil normu ČSN 57 0529, která požadovala negativní sporotvorné anaerobní bakterie v 0,1 ml mléka, kromě jednoho odběru.

Mezi mlékem z mléčných automatů a z farem z přímého prodeje nebyl nalezen statisticky významný rozdíl, mléka z automatů byla o něco mikrobiologicky kvalitnější, než mléka z farem. Celkově vzorky splňovaly normu ČSN 57 0529 a Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 Sb. Syrové mléko je mikrobiologicky nezávadné.

Klíčová slova: mikrobiologická kvalita, mléčný automat, přímý prodej, syrové mléko

Microbiological quality of raw cow's milk on czech market

Summary

This thesis aimed to analyze microbiological quality of raw milk distributed to consumers with first-hand sale from farms and milk machines. Total of ten raw milk samples were collected over four months during the summer of 2017 in periodic intervals. The samples were collected from two farms and two milk machines.

The total quantity of enterococcus, coliform bacteria, total bacteria count and spore-forming bacteria was measured in all those samples.

The czech norm CSN 57 0529 set limit for maximal content of enterococcus and coliform bacteria to 10^3 CFU/ml. Analysis of the raw milk from milk machines showed that maximum amount of enterococcus was max. $2,92 \times 10^2$ CFU/ml. Raw milk from farms had max. $3,72 \times 10^2$ CFU/ml. The results comply with the original norm.

The amount of coliform bacteria from the raw milk from milk machines was $8,95 \times 10^2$ CFU/ml. Only one sample from a farm exceeded the limit from the original norm.

In terms of total bacteria count, both ways of distributing raw milk fulfilled the Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council, in the set limit 10^5 CFU/ml. Maximal measured amount of microorganisms was $2,61 \times 10^4$ CFU/ml.

In terms of spore-forming bacteria, the norm CSN 57 0529 was fulfilled in all but one samples. The norm require negative anaerobic spore-forming bacteria in 0,1 ml of raw milk.

There was no statistically significant difference between farm milk and milk from milk machines. Milk from milk machines was slightly better in terms of microbiological quality than farm milk. All samples taken fulfilled both norm CSN 57 0529 and the Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council. Raw milk is microbiologically safe.

Keywords: first-hand sale, microbiological quality, milk machine, raw milk

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3	Literární rešerše.....	9
3.1	Mikrobiota syrového kravského mléka.....	9
3.1.1	Přirozené mikroorganismy v mléce	9
3.1.1.1	Bakterie mléčného kvašení.....	9
3.1.2	Patogenní mikroorganismy v mléce	10
3.1.2.1	Escherichia coli	10
3.1.2.2	Enterokoky	12
3.1.3	Sporotvorné bakterie	12
3.1.3.1	Bacillus sp.	13
3.1.3.2	Clostridium sp.	14
3.2	Kontaminace mléka	16
3.2.1	Primární kontaminace	16
3.2.2	Sekundární kontaminace	17
3.2.2.1	Zdroje sekundární kontaminace	17
3.3	Tepelné ošetření mléka	20
3.3.1	Pasterace	21
3.3.2	Sterilizace.....	22
3.4	Vliv teploty na mikrobiotu mléka	23
3.5	Hygiena získávání mléka	24
3.5.1	Správný postup dojení	25
3.6	Mléčné automaty	26
3.7	Použití systému HACCP v produkci mléka.....	29
4	Materiál a metody	32
4.1	Mléko z mléčného automatu	33
4.2	Mléko z farmy z přímého prodeje	33
4.3	Živné půdy	33
4.4	Postup práce	35
5	Výsledky.....	37
6	Diskuze.....	50
7	Závěr	56
8	Seznam literatury.....	57

1 Úvod

V dnešní době stále narůstá poptávka spotřebitelů po kvalitních potravinách. Zvyšuje se také obliba syrového mléka a tím i jeho spotřeba. Lidé jsou ochotni si připlatit za mléko z mléčného automatu nebo z přímého prodeje z farmy. Důvodem mohou být lepší sensorické vlastnosti a prakticky žádné průmyslové zpracování. Syrové mléko má však zvýšené riziko, že může obsahovat patogenní mikroorganismy, které se podílejí na kažení mléka. Je proto nutné dodržovat limity pro obsah mikroorganismů stanovené legislativou.

V roce 2003 prvovýrobci mléka v ČR zahájili tzv. přímý prodej ze dvora a o několik let později, v roce 2009, se začaly stále častěji objevovat i mléčné automaty na prodej syrového mléka. Jde o rozšíření distribuce, které je výhodné pro koncového zákazníka např. z důvodu zachování větší čerstvosti produktu. Toto mléko je nutné před konzumací převařit nebo jinak tepelně upravit.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Tato práce měla za cíl porovnat mikrobiologickou kvalitu syrového kravského mléka odebíraného z vybraných mléčných automatů a z přímého prodeje ze soukromých zemědělských farem.

Současně bylo cílem potvrdit hypotézu, že mléko splňovalo požadavky stanovené legislativou a bylo mikrobiologicky nezávadné.

V neposlední řadě tato práce mohla upozornit na případné rozdíly v hodnotách mikrobiologické kvality mléka jak z mléčných automatů, tak z farem.

3 Literární rešerše

3.1 Mikrobiota syrového kravského mléka

Mléko je bohatým zdrojem různých mikroorganismů už po nadojení. Počáteční mikrobiota přímo ovlivňuje mikrobiální znečištění během produkce, dojení a také manipulace. Už když je mléko nadojeno a opouští farmu, začíná jej silně ovlivňovat teplota skladování a čas, který uplynul od nadojení. Pokud je mléko uchováváno při 4 °C, tak takto nízká teplota za normálních podmínek zbrzdí další pomnožování mikroorganismů alespoň na 24 hodin (Heller 2004).

3.1.1 Přirozené mikroorganismy v mléce

Mléko obsahuje ať už přirozeně se vyskytující pozitivní bakterie mléčného kvašení, nebo patogenní mikroorganismy, do kterých řadíme koliformní bakterie a enterokoky.

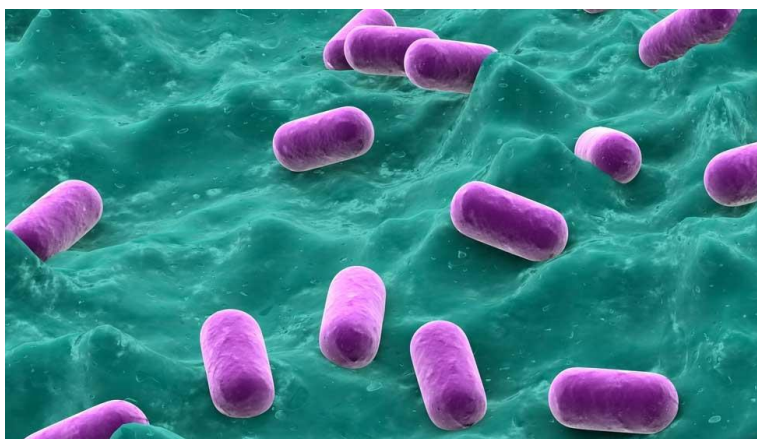
3.1.1.1 Bakterie mléčného kvašení

Na Obrázku 1 jsou znázorněné bakterie mléčného kvašení (BMK), které jsou anaerobní, grampozitivní, nesporulující, mezofilní, případně termofilní bakterie. Nacházejí se zejména ve střevech a zažívacím traktu, ale zároveň se vyskytují v ovoci, mase, víně, zelenině (například v zelí) a v neposlední řadě v mléce. Jsou mezi nimi zástupci patogenů i zástupci s antimikrobiálními účinky (bakteriocíny). Snášejí velmi dobře pH v úrovni kyselosti 3,8.

Bakterie mléčného kvašení získaly svůj název podle schopnosti vytvářet kyselinu mléčnou. Heterofermentativní bakterie přeměňují laktózu na ještě další látky, jako je ethanol, kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina mravenčí a oxid uhličitý. Homofermentativní bakterie zkvašují laktózu pouze na kyselinu mléčnou (Forsythe 2010).

Původ těchto bakterií v kravském mléce je buďto z trav primárním způsobem, nebo sekundárním způsobem z prostředí manipulace mléka. Jestliže je mléko dojeno za aseptických podmínek, může obsahovat velmi malé množství bakterií mléčného kvašení a ty se ani při vhodné teplotě pro růst nepomnoží. V této situaci by v mléce převažovaly sporotvorné bakterie a enterokoky, které jsou odolné vůči aseptickým látkám (Görner & Valík 2004).

BMK se pro svou schopnost fermentovat používají jako probiotika, což jsou látky vyrovnávající mikrobiální dysbalanci v zažívání. Aby měly znatelný účinek, je nutné zkonzumovat jejich množství v řádech miliard. Pouze některé kmeny jsou probiotické a jsou velmi citlivé na teplotu, při ochlazení na chladírenskou teplotu je jejich růst zastaven (Tamime 2009).



Obrázek 1: Bakterie mléčného kvašení

Zdroj: <https://journal.institut-isi.si/wp-content/uploads/2012/12/probiotic.jpg>

3.1.2 Patogenní mikroorganismy v mléce

Mezi hlavní patogeny mléka patří mnoho rodů bakterií, avšak *Escherichia coli* a enterokoky patří k těm významnějším. Jsou to indikátory fekálního znečištění a tvoří enterotoxiny. Mohou způsobit průjemy, křeče břicha a také závažnější onemocnění (Klaban 1999).

3.1.2.1 *Escherichia coli*

Patogenní bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*), zobrazená na Obrázku 2, je nesporulující, gramnegativní a fakultativně anaerobní bakterie pocházející z čeledi Enterobacteriaceae. Nejvýznamnějších 5 rodů se liší navzájem v průběhu nemoci, rozsahu virulence a v době inkubace.

Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) nejsou invazivní, toxiny jsou termolabilní i termostabilní. Způsobují průjemy jako při nakažení cholerou, ale méně závažné.

Enteropatogenní *E. coli* (EPEC) tvoří shluky buněk, které nahrazují hostitelské. Toxiny nejsou zcela jasné, ale způsobují průjemy u dětí a zvracení.

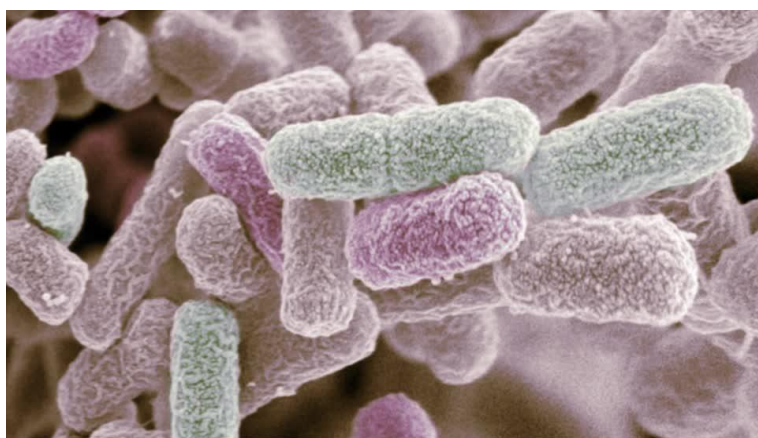
Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) napadá buňky střeva a přichycuje se k sousedním buňkám, takže se rozšiřují do délky a příznaky nemoci jsou podobné úplavici (Forsythe 2010).

Enterohemoragická *E. coli* (EHEC) je invazivní. Přiléhá těsně a nahrazuje hostitelské buňky. Produkuje verotoxin a shigatoxin. Způsobuje těžké krvavé průjmy, hemoragickou koliku a může se vyvinout v hemolyticko-uremický syndrom, který má příznaky jako jsou onemocnění ledvin, křeče, kóma, porucha funkce jater a perforace střeva (Weeks & Alcamo 2007).

Enteroagregativní *E. coli* (EAaggEC) tvoří shluky, ale neproniká buňkami. Tvoří termostabilní toxin, také hemolysin a verotoxin. Způsobuje průjmy a některé kmeny byly detekovány jako příčina hemolyticko-uremického syndromu (Forsythe 2010).

Některé sérotypy enteropatogenní *Escherichia coli*, obzvláště O157:H7, způsobují určité trávicí nemoci u lidí, které mohou vést až ke krvavému průjmu a hemolyticko-uremickému syndromu a jsou zodpovědné za 400 000 infekcí a 250 případů smrti ročně. *Escherichia coli* O157:H7 má neobvykle nízkou infekční dávku kolem 10 buněk a má potenciální virulenci v kombinaci se schopností napadnout střevní mukózu. Infekce způsobené *Escherichia coli* jsou obvykle výsledkem konzumace nevhodně připravovaných a kontaminovaných jídel.

Za hlavní zdroj *Escherichia coli* O157:H7 je považován skot. Bakterie se množí zejména v tlustém střevě a jsou nacházeny ve výkalech, kde se mohou bakterie rozmnožovat i několik měsíců (Marth & Steele 2001).



Obrázek 2: *Escherichia coli*

Zdroj:<http://footage.framepool.com/shotimg/qf/605832188-food-poisoning-escherichia-coli-bacteriology-nano-world.jpg>

3.1.2.2 Enterokoky

Enterokoky (*Enterococcus*) je rod bakterií mléčného kvašení pocházející z čeledi Enterobacteriaceae. Patří mezi grampozitivní koky vyskytující se v párech či krátkých řetězcích, jak lze vidět na Obrázku 3. Jsou fakultativně anaerobní, vzhledově podobní streptokokům, rezistentní vůči vysokému pH a koagulují mléko. Nacházejí se ve střevním traktu lidí i zvířat. Dva nejvýznamnější zástupci se liší biochemickými vlastnostmi – *Enterococcus faecalis*, který tvoří 90 % výskytů, je citlivý na ampicilin, *Enterococcus faecium* s nízkým výskytem kolem 10 %, fermentuje arabinózu a je rezistentní vůči ampicilinu (Fischetti et al. 2006).



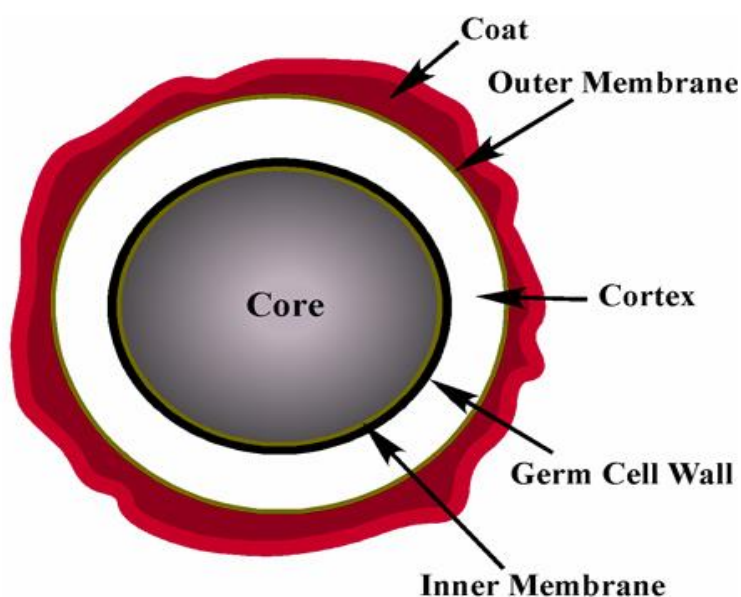
Obrázek 3: *Enterococcus* sp.

Zdroj: <https://www.publichealthontario.ca/en/BrowseByTopic/InfectiousDiseases/PublishingImages/VRE.png>

3.1.3 Sporotvorné bakterie

Spora bakterií vzniká při nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí. Bakterie je vytvářejí na konci exponenciální růstové fáze, protože jsou náročné na živiny v kultivačním médiu. Jelikož se spory nacházejí uvnitř buněk bakterií, jsou nazývány endosporami. Proces vytváření spor se nazývá sporulace nebo také sporogenezé a vyžaduje přítomnost kationtů pro aktivaci proteáz a peptidáz, protože tyto dva enzymy rozkládají bílkoviny uvnitř buňky v procesu sporulace. Je také zapotřebí přítomnosti iontů vápníku, které zajišťují termorezistenci.

Stavba spory je znázorněna na Obrázku 4. Obal spor je tvořen z vnější strany dovnitř několika vrstvami. Na povrchu se nachází exosporium, plášť a vnější membrána, pod ní kortex, sporová stěna, vnitřní membrána a jádro spory (Klaban 1999).



Obrázek 4: Stavba bakteriální spory

Zdroj: <https://micro.cornell.edu/sites/micro.cornell.edu/files/shared/images/endospore.jpg>

Mezi nejvýznamnější rody patří *Bacillus* sp. a *Clostridium* sp. Spory těchto bakterií jsou škodlivé v domácnosti i potravinářství. Spory jsou termorezistentní a odolávají vysokým teplotám, například při sterilizaci konzerv (Klaban 1999).

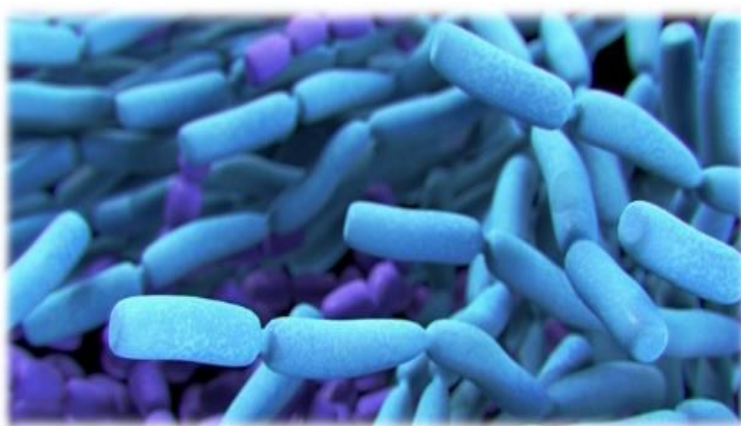
Většina patogenů v mléce je zničena pasterací, s výjimkou *Clostridium perfringens* a *Bacillus cereus*, které mohou přežít pasteraci z důvodu jejich schopnosti sporulovat. Ve většině případů nemoci způsobené *Bacillus cereus* nastávají po konzumaci vařené rýže častěji, než po konzumaci mléka (Heller 2004).

3.1.3.1 *Bacillus* sp.

Rod *Bacillus* sp. jsou grampozitivní, aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie s buňkami ve tvaru tyčinek a tvořící endospory, jak lze vidět na Obrázku 5. Vyskytují se hlavně v půdě a ve vodě, jejich spory se šíří i do vzduchu. Rozkládají různé organické zbytky rostlin a živočichů. Některé druhy produkují antibiotika, například bacitracin. *Bacillus cereus* je patogenem v potravinářství, neboť způsobuje otravy po konzumaci kontaminovaných potravin. Otrava nastává při požití od sta tisíc až do jednoho miliónu jedinců v kontaminované potravíně. V konzervářském průmyslu je významným patogenem *Bacillus stearothermophilus* způsobující plynuprosté kysnutí nekyselých konzerv (Klaban 1999).

Sporotvorné kontaminanty mléka zahrnují *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* a *Bacillus stearothermophilus*. *Bacillus cereus* je hlavním znehodnocujícím mikroorganismem pasterovaného mléka a mléčných produktů při chladírenských teplotách. Tato bakterie může být rovněž důvodem k obavám o bezpečnost potravin z důvodu produkce různých typů toxinů a tím je potenciálním původcem otrav z potravin (Quigley et al. 2013). Nemoci, které způsobuje *Bacillus cereus*, často ale nesouvisejí s konzumací kontaminovaného pasterizovaného mléka, protože růst *Bacillus cereus* vede většinou ke ztrátě chuti, rozkladu tuků a bílkovin a nežádoucímu vzhledu (Marth & Steele 2001).

V roce 2010 bylo v Evropské unii ze všech testovaných vzorků mléka 3,8 % pozitivních na přítomnost toxinu z rodu *Bacillus* (EFSA 2012).



Obrázek 5: *Bacillus* sp.

Zdroj: <https://wickhamlabs.co.uk/wp-content/uploads/2018/03/Bacillus.jpg>

3.1.3.2 Clostridium sp.

Clostridium sp. jsou grampozitivní tyčinky (viz Obrázek 6) rostoucí při teplotě 20 – 40 °C. Jsou převážně anaerobní a je pro ně typická tvorba spor. Klostridia jsou součástí střevního traktu lidí a zvířat, také se nacházejí v povrchových a odpadních vodách a v půdě. Některé druhy tvoří toxiny způsobující botulismus a tetanus, které jsou charakterově neurotoxiny, zatímco jiné druhy plynovou gangrénu a střevní infekce zapříčiněné cytotoxiny (Klaban 1999).

Pokud existuje možnost přítomnosti termofilních bakterií, je nezbytné také myslet na přítomnost sporotvorných bakterií. Tyto bakterie se mohou do mléka dostat ze siláže, půdy nebo podestýlky a prokazatelně jsou odolné vůči pasterizaci. Sporotvorné bakterie jako

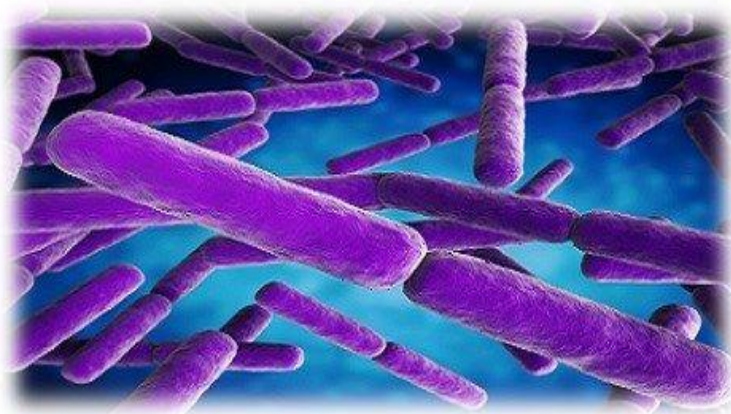
Clostridium sporogenes, *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum* mají schopnost přežít a růst při chladírenských teplotách a mohou využívat bílkoviny, sacharidy a laktát z mléka (Quigley et al. 2013).

C. sporogenes nepatří mezi druhy s tvorbou jedovatého toxinu. Vyskytuje se často v trávicím traktu lidí i zvířat a účastní se i různých hnilobných procesů v přírodě. Je striktně anaerobní a jeho název pochází od snadné schopnosti sporulovat. *C. butyricum* se negativně projevuje především v konzervářenském průmyslu, kde způsobuje kažení konzerv (Klaban 1999).

Klostridia bývají identifikována v mléce velmi často a mohou způsobovat pozdní duření sýrů. Tento negativní projev je zejména spojován s *C. tyrobutyricum* a vede ke ztrátě chuti a defektům ve struktuře sýrů (Quigley et al. 2013).

Clostridium perfringens se vyskytuje ve tvaru velkých, nepohyblivých tyčinek, které jsou grampozitivní a aerotolerantní, viz Obrázek 6. Vyskytuje se ubikvitárně. Hlavním toxinem způsobujícím hemolýzu je alfa-toxin, vlastností bílkovina s enzymem fosfolipázou. Pokud se v infikované potravine nachází 1 – 10 miliónů bakterií na gram potraviny, po konzumaci může dojít k alimentární intoxikaci. Bakterie ve střevním traktu začnou sporulovat a zároveň tvoří enterotoxin způsobující průjemy, křeče žaludku, kdy postižený většinou nezvrací. Příznaky mohou nastat za 8 – 24 hodin po konzumaci závadné potraviny, ale tento stav netrvá dlouho, do 24 hodin potíže odezní (Klaban 1999).

Přestože dnešní doba má moderní vybavení a umožňuje velmi dobré podmínky pro skladování mléka, může zde stále existovat šance, že *C. perfringens* se bude v mléce rozmnožovat z důvodu velké odolnosti jeho spor (Heller 2004).



Obrázek 6: *Clostridium* sp.

Zdroj: <https://wickhamlabs.co.uk/wpcontent/uploads/2017/12/Clostridiumsppe151246744875>

1.jpg

3.2 Kontaminace mléka

Syrové kravské mléko je bohaté na živiny a se svým neutrálním pH poskytuje vhodné podmínky pro růst mnoha bakterií, prospěšných i nežádoucích. Mikrobiota syrového mléka se skládá z mikroorganismů, které se do mléka dostaly rekontaminací a mohou pocházet z podestýlky, kravína, krmiva, povrchu struků a špiček nástrojů mlékařského vybavení. Z toho důvodu zde můžeme nalézt širokou škálu mikroorganismů, od bakterií až po plísně. Obecně se objevují ve vysokém počtu bakterie mléčného kvašení, jako jsou *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*, kromě těchto také ostatní grampozitivní bakterie, např. *Bacillus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* a *Micrococcus*. Gramnegativní bakterie z rodů *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, stejně jako několik druhů bakterií z čeledi Enterobacteriaceae zahrnující *Enterobacter*, *Klebsiella* a *Hafnia*, se v mléce vyskytují často. V neposlední řadě sem patří také kvasinky z rodů *Kluyveromyces*, *Pichia* a *Candida* (Neubeck von et al. 2015).

Příčiny kontaminace mohou být rozmanité. Stupeň kontaminace mléka ovlivňuje hygiena a zdravotní stav dojnice, dále hygiena stájí a dojíren, hygiena a technologie dojení a také hygiena obsluhujícího personálu. Vliv má také způsob i včasné odklizení chlévské mrvy, způsob získávání a ošetřování syrového mléka a kvalita vody (Cempírková 2004).

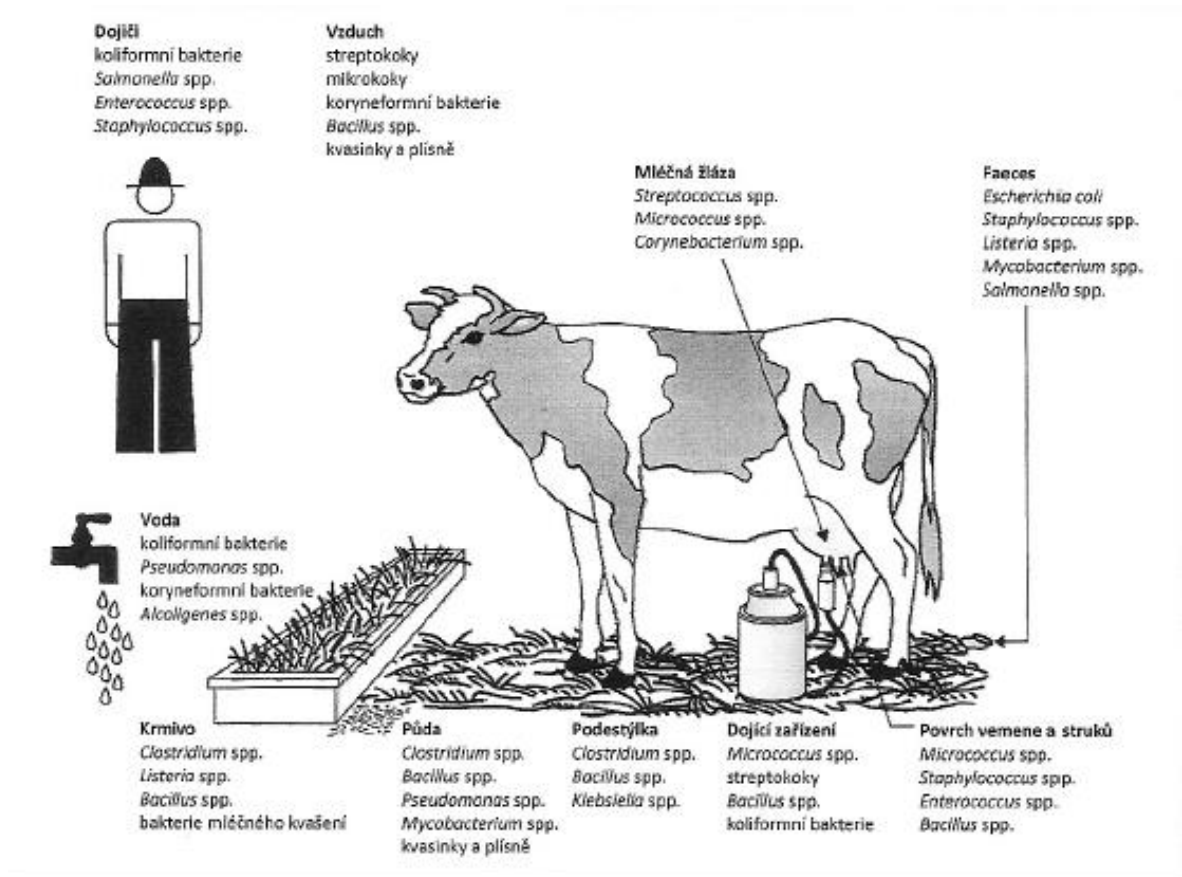
Kontaminaci lze rozdělit na primární a sekundární. Ve většině případů se jedná o kontaminaci sekundární, jenž pochází z vnějšího prostředí, více než o kontaminaci primární ze zdroje mléčné žlázy (Nero & de Carvalho 2018).

3.2.1 Primární kontaminace

Primární kontaminace mléka před dojením může být způsobena rozšířením bakterií buď strukovým kanálkem, nebo z krevního oběhu. Mikroorganismy z krve neprostupují do mléka často z důvodu fagocytů, které zabraňují pronikání kontaminujících mikroorganismů z vnějšího prostředí do krve a následně do mléka. Velmi často pronikají mikroorganismy do mléka strukovým kanálkem. Obsah mikroorganismů ve vemeni dojnic není vysoký, dosahuje do 10^2 KTJ/ml. Převládající saprofytickou mikrobiotou jsou mikrokoky, streptokoky a nejméně *Corynebacterium bovis*. Lze nalézt různorodou mikrobiotu ve stádě, jednotlivě v rámci vemene zdravých dojnic, ale i v rámci struků na jednom vemeni. Kontaminace primární nehraje velkou roli při určování jakosti mléka a jeho trvanlivosti, protože sekundární kontaminace hraje roli zásadnější (Navrátilová et al. 2012).

3.2.2 Sekundární kontaminace

Mikroorganismy, které způsobují sekundární kontaminaci, pocházejí z vnějšího prostředí, například při dojení nebo další manipulaci a zpracování mléka. Kontaminace sekundární mikrobiotou je početně vyšší a má důležitější technologický význam. Druhy mikroorganismů a jejich celkový počet je závislý na organizaci práce a dodržování hygieny nejen při dojení v dojírně, ale také ve chlévě (Roginski et al. 2002).



Obrázek 7: Zdroje mikrobiální kontaminace syrového mléka

Zdroj: Roginski et al. 2002

3.2.2.1 Zdroje sekundární kontaminace

Mezi zdroje sekundární kontaminace může patřit vemeno a povrch těla dojnice, krmivo, podestýlka, nádoby na dojení, chladicí technika, úschovné nádrže na mléko (tanky), dojící technika, potrubí na mléko, výkaly dojnic, voda užitková i pitná, vzduch a také člověk.

1) Mléčná žláza a povrch vemene a struků

Mléko nadojené přímo z mléčné žlázy zdravých dojnic bývá téměř sterilní, ale malé množství mikroorganismů se do něj může dostávat buď krevním oběhem, nebo mohou mikroorganismy prostupovat strukovým kanálkem z povrchu struků dovnitř mléčné žlázy. Celkově je množství mikroorganismů v mléčné žláze nízké, především grampozitivní koky – mikrokoky, stafylokoky a streptokoky, BMK, korynebakteria, dále i *Pseudomonas* sp. a kvasinky. Pokud se jedná o zánět mléčné žlázy (mastitida), tak má mléko změněné fyzikálně-chemické, sensorické vlastnosti a vysoký počet somatických buněk. Často je zvýšen počet patogenních bakterií, nejčastěji jsou původci zánětu *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus*, *E. coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa*. Patogeny obvykle pronikají do mléčné žlázy kanálkem struku, ale např. *Staphylococcus aureus* je schopen kolonizovat ústí struku až několik týdnů, aniž by vyvolal onemocnění.

Na povrchu mléčné žlázy a struků často bývá zastoupena běžně typická kožní mikrobiota, navíc s mikroorganismy pocházející z podestýlky, krmiva, půdy a výkalů. Obvykle může jít o mikroorganismy psychrotrofní, koliformní, sporotvorné a termorezistentní, které kontaminují mléko při dojení. Z patogenní mikrobioty se mohou vyskytovat listerie, kampylobakterie a salmonely. Složení mikrobioty a její počty kolísají v závislosti na způsobu ustájení dojnic. Základem získávání mikrobiálně čistého mléka by měla být správná toaleta vemene před samotným dojením a ošetření struků po skončení dojení (Roginski H et al. 2002).

2) Vzduch

Málo významným zdrojem kontaminace syrového kravského mléka je vzduch ve stáji. Stájové ovzduší může obsahovat nejčastěji korynebakterie, mikrokoky a spory *Bacillus* sp., ale také gramnegativní tyčinky a streptokoky. Mikrobiota v ovzduší pochází z podestýlky, prachu, suchých krmiv nebo sena. Zdrojem kontaminace mikroorganismy může být aerosol vznikající například při močení a defekaci dojnic. K další kontaminaci mléka může dojít při skopnutí strukových nástavců nebo při ručním dojení (Zejdová et al. 2014).

3) Voda

Voda slouží k širokému využití při produkci mléka - k omývání vemene, napájení zvířat a výplachům dojícího zařízení a tanků na uchovávání mléka. Její kvalita musí splňovat požadavky na pitnou vodu a být pravidelně kontrolována. Rizikové mohou být individuální

zdroje pitné vody, zejména pokud jsou kontaminovány fekálními bakteriemi nebo půdními saprofyty. V takovém případě se voda může stát kontaminovaným zdrojem psychrotrofních mikroorganismů (např. *Pseudomonas* sp.), koliformů, enterokoků a sporotvorných bakterií (*Bacillus* sp., *Clostridium* sp.). Zřídka se mohou ve vodě vyskytovat i střevní patogeny např. salmonely nebo *E. coli* (Navrátilová et al. 2012).

4) Krmivo

Krmivo může také mít značný vliv na složení mikrobioty mléka. Porosty z luk a pastvin jsou zdrojem žádoucích BMK, proto může být luční seno považováno za vhodné krmivo pro dojnice. Na rozdíl od krmné dávky složené z okopanin, nekvalitních siláží nebo zkaženého krmiva, které mikrobiální jakost mléka zhoršuje. Okopaniny znečištěné zeminou mohou být zdrojem sporulujících bakterií, znehodnocené a nekvalitní krmivo může často být kontaminováno koliformy. Značný vliv na mikrobiotu mléka mohou mít špatně připravené siláže, zejména pokud jsou znečištěné hlinou nebo nedostatečně zfermentované, protože mohou obsahovat spory *Clostridium* sp. Je zde možnost přenosu spor do mléka, a tak mohou zapříčinit různé vady u mléčných výrobků (zrající sýry, dětská výživa, atd.). Nedostatečně fermentované siláže mohou být i zdrojem bakterií *Listeria monocytogenes* (Ball et al. 2004; Ticháček et al. 2007).

5) Dojiči

Zvýšené riziko kontaminace mléka rukama pracovníků může představovat ruční dojení, oproti tomu strojní dojení přenos mikrobiální kontaminace může značně snižovat. Nelze ale tvrdit, že při strojním dojení je přenos mikroorganismů nemožný. Může nastat při očišťování vemene a při manipulaci s dojícím zařízením a nádobami. Hygiena dojičů může představovat nebezpečí přenosu patogenů, pokud je na nízké úrovni. Pracovníci mohou mít klinické příznaky onemocnění nebo mohou být přenašeči. Hlavní nebezpečí přenosu představují střevní patogeny – *Cryptosporidium* sp., *Campylobacter* sp. nebo *Salmonella* sp. Hnisavé projevy nemoci na kůži rukou mohou být důvodem kontaminace syrového mléka rodem *Staphylococcus aureus* (Navrátilová et al. 2012).

6) Dojící zařízení a tanky pro uchovávání mléka

Významným zdrojem kontaminace mohou být dojící zařízení a úchovné tanky. Jedná se zejména o špatně hygienicky dostupné části, jako jsou spoje potrubí, ventily, gumové

strukové násady, gumové hadice, záslepky aj. Převážně gumové části se rychle opotřebovávají a dochází u nich ke vzniku prasklin, ve kterých se usazují sražené části a zbytky mléka a množí se bakterie. Bakterie se také rychle rozmnožují ve vlhkém prostředí na povrchu dojícího zařízení nebo ve vodě. Mléčné usazeniny z bílkovin, tuků a minerálních látek uvnitř potrubí tvoří ideální ochrannou bariéru chránící mikrobiotu před sanitačními prostředky. Prudkým proudem mléka mohou být usazeniny strhávány a tím napomáhat k jeho celkové kontaminaci mikroorganismy.

Problém mohou představovat i mikrobiální biofilmy vytvořené na obtížně čistitelných místech dojícího zařízení. Takto mohou mléko kontaminovat zejména gramnegativní bakterie *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter sakazakii*, *Klebsiella* a grampozitivní bakterie rodů *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a stafylokoky. Správně provedená sanitace zahrnující dezinfekci a mechanické čištění je hlavním prostředkem k ovlivnění úrovně kontaminace mléka (Ticháček et al. 2007; Kunová et al. 2011).

3.3 Tepelné ošetření mléka

Podle Vyhlášky č. 289/2007 Sb. může chovatel prodávat syrové neošetřené mléko v tzv. přímém prodeji. Syrové mléko z přímého prodeje musí pocházet ze zdravého zvířete, ze zemědělství bez tuberkulózy a brucelózy. Nesmí vykazovat znaky nakažlivého onemocnění pro člověka. Dále mléko musí být získáno hygienickou cestou z hospodářství se splněnými požadavky na hygienu stanovenými zákonem. Přímý prodej syrového mléka musí být prováděn odděleně mimo stáje se zvířaty a označen viditelným popisem upozornění „Syrové mléko, před použitím tepelně opracovat nebo pasterovat“. Pokud syrové mléko není prodáno do 2 hodin po nadojení, musí se zchladit na teplotu 8 °C a zchlazené je možné prodávat do 24 hodin po nadojení, nebo musí být zchlazeno na 6 °C a zchlazené prodáváno do 48 hodin po nadojení (MZe 2007).

Mléko určené ke konzumaci musí vždy být tepelně ošetřeno pro dodržení zdravotní nezávadnosti. Prodej mléka ze dvora pravidelně kontroluje Státní veterinární správa. Existuje několik způsobů ošetřování mléka a použitím různých teplot se dosahuje odlišné délky trvanlivosti, senzorických a chemických vlastností (Gajdůšek 2003).

Obecně u potravin metody bránící mikrobiálnímu růstu zahrnují chlazení a zmrazení, snížení aktivity vody, okyselení, přidání konzervačních látek, přidání nebo odstranění plynů (kyslíku nebo oxidu uhličitého). Přímou inaktivaci lze provést také během blanšírování, vaření, smažení, ale u mléka zejména pomocí pasterace a sterilizace.

Balení, hygienické zpracování a skladování jsou obvyklé přístupy, jak zabránit opakované kontaminaci. Nicméně, z mnoha technik používaných k ochraně potravin, pouze sterilizace a pasterizace zajišťuje výraznou eliminaci nebo redukci nejodolnějších patogenů.

Tradičně potravinářský průmysl používá termální technologie ke sterilizaci a pasteraci potravin. V dnešním industrializovaném světě je dostatečná nabídka potravin a podmínky spotřebitele se staly zásadními, a proto systémy výroby potravin již nejsou řízeny nabídkou, ale poptávkou. Výsledkem moderních požadavků spotřebitelů jsou potraviny čerstvější, přírodní nebo minimálně zpracované, a proto stále vznikají a široce se vyvíjejí nové fyzikální metody bez využití přísad. Pro uspokojení těchto požadavků byly upraveny podmínky také pro tradiční techniky tepelné konzervace včetně pasterace a sterilizace (Sun 2012).

3.3.1 Pasterace

Pasterace je proces zahřátí mléka na teplotu pod 100 °C. Podle Směrnice Rady 92/46/EHS pasterované mléko musí být ošetřeno krátkodobě vysokou teplotou, min. 71,7 °C alespoň 15 sekund, nebo musí být použita metoda vyvolávající stejný účinek. Rovněž musí splňovat negativní fosfatázový test a pozitivní peroxidázový test (Rada evropských společenství 1992).

Při pasteraci mléka se používají nejčastěji tři typy záhřevu. Rozlišuje se pasterace dlouhodobá, šetrná a vysoká. Dlouhodobá pasterace probíhá při teplotě 63 – 65 °C po dobu 20 – 30 minut, šetrná při teplotě 71 – 74 °C po dobu 20 – 30 sekund a vysoká pasterace trvá několik sekund při 85 °C.

Při některém zpracování, např. pro výrobu čerstvých sýrů, se mléko ošetřuje termizací, což je šetrnější forma pasterace (záhřev na 15 sekund při teplotě 57 – 68 °C), po které mléko ještě stále vykazuje pozitivní fosfatázový test, a tedy tento proces tepelné úpravy nestačí pro účely prodeje (Šustová & Sýkora 2013).

Amylasy je inaktivována dlouhodobou pasterací mléka při teplotě 63 – 65 °C za 20 – 30 minut. Může být využita ke kontrole účinnosti dlouhodobé pasterace. Aktivita enzymu se používá ke stanovení průkazu mleziva nebo mléka od dojnic s mastitidou.

Jak již bylo řečeno, aktivita alkalické fosfatázy (ALP) se využívá k hodnocení účinnosti dlouhodobé či šetrné pasterace mléka, protože ALP je více odolná vůči záhřevu ve srovnání s podmínkami teploty a doby pasterace, které je nutné dodržet, aby došlo k usmrcení bakterií *Mycobacterium tuberculosis*. Alkalická fosfatáza nevydrží 30 minut záhřevu na teplotu 63 – 65 °C nebo teplotu 72 – 74 °C po dobu 30 až 90 sekund.

Pro ověření správnosti provedení vysoké pasterace se využívá stanovení aktivity laktoperoxidázy. Laktoperoxidáza je jeden z tepelně nejstabilnějších enzymů v mléce, je více rezistentní vůči záhřevu než alkalická fosfatáza. Při záhřevu mléka na 75 °C se inaktivuje po 30 minutách a při záhřevu na 80 °C po 30 sekundách (Navrátilová et al. 2012).

Mléko bylo jedním z prvních produktů, které byly pasterovány v širokém měřítku. Pojem „pasterace“ byl definován jako proces mírného tepelného zpracování, který významně snižuje nebo zabíjí počet patogenních mikroorganismů a mikroorganismů způsobujících kažení. Definice tradičního procesu pasterace spočívala pouze na tepelné zpracování a byla dosažena vystavením potravin teplotě po určitou dobu.

Na rozdíl od sterilizace, po pasteraci není potravina prostá všech mikroorganismů, protože toto tepelné zpracování není natolik silné, aby usmrtilo spory odolné vůči teplu, které mohou tento proces přežít a být přítomny. Proto je na místě provést další formy konzervace, jako je chlazení (např. mléko), modifikace atmosféry (např. vakuové balení), přidání antimikrobiálních konzervačních látek (např. chloridu sodného, dusitanu sodného, kyseliny askorbové, kyseliny sorbové, oxidu siřičitého atd.) nebo kombinace uvedených technik pro stabilizaci produktu během distribuce (Harding 1995; Sun 2012).

3.3.2 Sterilizace

Sterilizované mléko je mléko ošetřené teplotou nad 100 °C. Mléko UHT (Ultra High Temperature) musí být získáno metodou kontinuálního proudu krátkodobé vysoké teploty, min. 135 °C po dobu alespoň 1 sekundy. Tímto ošetřením se zničí všechny hnilobné mikroorganismy a jejich spory. Zároveň jsou jen minimálně změněny smyslové, chemické a fyzikální vlastnosti (Rada evropských společenství 1992).

Výroba komerčního sterilního potravinářského výrobku vždy nevyžaduje, aby všechny mikroorganismy v produktu byly zničeny. Existuje několik podmínek, při kterých v produktu mohou zůstat zbývající mikroorganismy. Je důležité pochopit, že celkový koncept komerční sterility nerozlišuje mezi patogenními a nepatogenními organismy. Očekává se, že proces dosažení sterility bude sloužit k odstranění mikrobiální kontaminace při běžném skladování a eliminuje případné nebezpečí pro spotřebitele. Dalším důležitým prvkem v koncepci obchodní sterility je, že jakmile je produkt vyroben, musí být uložen do obalu vhodného pro skladování a musí s ním být manipulováno tak, aby se předešlo případné rekontaminaci (Harding 1995; Sun 2012).

3.4 Vliv teploty na mikrobiotu mléka

Teplota má zásadní význam pro rozvoj mikrobioty v mléce. Chlazení mléka má přímý vliv na výslednou jakost a trvanlivost mléka. Pro redukci množení mikroorganismů musí být zchlazeno na teplotu podle normy ČSN 57 0529. Psychrotrofní a psychrofilní mikroorganismy se ale dokáží rozmnožovat i při chladírenských teplotách. Z důvodu zavedení výkonného chladicího zařízení a nedodržení vysoké úrovně sanitace při výrobě mléka může dojít ke změnám v mikrobiotě mléka, a proto tvoří psychrotrofní mikroorganismy až 75 % z celkové kontaminace při nehygienickém získávání mléka (Navrátilová et al. 2012).

Nejčastějším představitelem psychrotrofního mikroorganismu syrového mléka je rod *Pseudomonas*, jehož dominantním zástupcem je druh *Pseudomonas fluorescens*. Vzhledem k tomu, že tento rod je usmrcen pasteračním procesem, neznáčí jejich přítomnost v syrovém mléce velké riziko. Problém nemusí nastat při zpracování mléka jako samotné suroviny, ale hlavně z důvodu jejich schopnosti tvorby termostabilních enzymů. Pasterace dokonce může mít vhodný vliv pro tvorbu sporotvorných bakterií rodu *Bacillus*, které mohou představovat zdravotní nebezpečí nebo problémy při zpracování mléka také z důvodu tvorby lytických enzymů. Známým druhem, který roste při nízké skladovací teplotě je *Bacillus weihensiensis* (Vyletělová 2000).

Podle systému hodnocení kravského mléka dle normy ČSN 57 0529 založenou na stanovení počtu mikroorganismů, nestačí pouze mléko chladit, ale především neustále zvyšovat úroveň sanitace a hygieny při dojícím procesu. Další doprovodné kroky, jako je filtrace mléka před chlazením na spádových nebo tlakových filtrech, dokáží značně zlepšit mikrobiologickou jakost mléka s obsahem mechanických nečistot, jako jsou nečistoty z vemene, krmiva a steliva. Filtry je zapotřebí pravidelně měnit dle pokynů výrobce (Navrátilová et al. 2012).

Na chování dojnic má velký vliv tepelný stres. Vysokoprodukční dojnice vyžadují větší množství kvalitnějšího krmiva, z toho vyplývá jejich intenzivní metabolismus a zvýšený odvod tepla z těla. Každá dojnice má vymezené pásmo termoneutrality, které je na teplotní ose různě umístěné a má i rozdílný rozsah. Optimální teplotní zóna vysokoprodukčních dojnic se pohybuje mezi 8 – 16 °C. V rozsahu teploty prostředí 18 – 32 °C se může projevit nárůst teploty na nádoji mléka negativně. Působením vysokých teplot na dojnice a na jejich ustájení může být ovlivněna také kvalita mléka, zejména jeho mikrobiologické vlastnosti. Zvýšená teplota působí pokles mléčné užitkovosti, snížení tuku a zvýšení počtu somatických buněk

v mléce (PSB). Příčina vysokého PSB je dána zvláště subklinickými záněty mléčné žlázy (Dolejš et al. 2003; Ticháček et al. 2007).

3.5 Hygiena získávání mléka

Bakteriologická a hygienická kvalita syrového mléka je velmi důležitá pro výživovou hodnotu a zdravotní nezávadnost a ochranu zdraví lidí. Zvýšené počty bakterií mohou být způsobeny špatnou hygienou dojení a nehygienickým zacházením s mlékem po nadojení, včetně mastitid. Kontrola hygienické kvality mléka je zásadní na všech farmách s cílem dodržet hygienické standardy (Seydlová 2010).

Hygiena získávání mléka slouží k zabezpečení hygienické a zdravotní nezávadnosti produkovaného mléka, které je dále ošetřováno a zpracováváno na mléčné produkty. Zdravotní nezávadnost syrového mléka je definována jako mléko prosté patogenů a zdraví nebezpečných látek v koncentracích nad povolenou normu. Hygienická nezávadnost mléka je určena jako dodržení hodnot ukazatelů závislých na intravitálních (během života), jako je výživa a zdraví dojnice, a na ukazatelích externích vlivů, kam řadíme zoohygienu, stav hygieny dojnice, hygienu dojícího zařízení, úroveň hygieny při dojení a uchovávání a ošetřování mléka po nadojení. Významným ukazatelem je také biologická hodnota mléka shrnující faktory příznivé pro organismus produkující sledovanou potravinu či surovinu. Konkrétně je hygiena mléka vždy souhrnem faktorů závislých na čtyřech hlavních stanoveních – na druhu a obsahu mikroorganismů, na počtu somatických buněk, na přítomnosti inhibičních a cizorodých látek a sensorických znacích (smyslové znaky jakosti, zejména aroma a chuti) (Ryšánek & Babák 2005).

Jedním ze zásadních bodů pro dosažení vysoké mikrobiologické kvality mléka je toaleta mléčné žlázy. Suchá mléčná žláza je menším zdrojem kontaminace než mléčná žláza, která je relativně čistá, ale vlhká. Toaleta mléčné žlázy by měla zahrnovat pouze čistotu základny vemene a struků vytvářejících kontaktní plochy při dojení. Používání jednorázových utěrek může zlepšit mikrobiologickou čistotu mléka až o 30 % (Ježková 2008).

Nezbytnou podmínkou k produkci mléka je dojení očištěných a suchých struků. Dojení mokrých struků může být jedním z důvodů vysokého počtu somatických buněk v mléce. Dezinfekce struků u produkčních dojnic představuje důležitý hygienický krok, protože ihned po dojení existuje zvýšené riziko, že patogeny vniknou do vemene strukovým kanálkem. Na konci struku se shromažďují zbytky mléka, které zvyšují riziko vniknutí patogenních

mikroorganismů. Riziko nových infekcí se snižuje ponořením struků do desinfekčního roztoku (Krátký 2007).

Správně prováděná mokrá toaleta mléčné žlázy může být riziková a časově náročná. Často používané ostříkání vemene studenou vodou z vysokotlakové pistole je neakceptovatelné z důvodu rozprašování infekčního aerosolu na dojírňě. Také při mokré toaletě dochází k odstraňování nečistot z kůže a srsti zvířete, a jestliže není součástí toalety při dojení dokonalé umytí celého smáčeného povrchu a následné osušení kůže, dochází ke stékání nečistot k otevřenému struku. Proto jako nejvhodnější se jeví suchá toaleta mléčné žlázy a dezinfekce před dojením s použitím individuálních utěrek (Zelinková 2007).

Nejúčinnějším způsobem snížení obsahu spor v mléce až o 96 % je kombinace očištění mléčné žlázy syntetickou utěrkou navlhčenou vodou nebo čisticím prostředkem a následné osušení papírovou utěrkou. Nejméně vhodnou technikou je používání tenkých vlhčených papírových utěrek, které se snadno trhají. Pro zabránění přenosu spor z dojnice na další dojnici, musí být každá utěrka používána zvlášť pro každou z nich. Utěrky na opakované použití je nutné prát při teplotě alespoň 90 °C (Krátký 2007).

3.5.1 Správný postup dojení

Základem správného postupu dojení by mělo být odstříknutí prvních stříků mléka do nádoby s černým dnem pro posouzení případných změn mléka, dezinfekce struků před samotným dojením, očištění mléčné žlázy a dezinfekce struků po dojení. Odstříknutí prvních stříků na podlahu je nepřijatelné a může kontaminovat prostředí dojírny patogeny a způsobit rozšíření infekce vzduchem (Ježková 2008).

Při dojení je nutné respektovat fyziologické pochody spouštění mléka. Z toho důvodu by od kontaktu s vememem do nasazení dojícího zařízení mělo být dosaženo do 1 až 3 minut. Význam použití dezinfekce po dojení je vydezinfikovat struk ihned po skončení dojení a také neprodyšně uzavřít strukový svěrač pomocí bariérových prostředků, který se jinak sám uzavírá zhruba až po 15 minutách po skončení dojení. Pro zachování funkce bariéry je nezbytné ponořit celý struk do aplikační nádoby ihned po dojení (Zelinková 2007).

Důležitým krokem vedoucím k produkci kvalitního mléka je schopnost managementu výrobce motivovat a kontrolovat své zaměstnance, aby dodržovali předepsané postupy, které redukuje výskyt patogenní mikrobioty z prostředí a eliminují její přenos během dojení.

Avšak ani nejlepší způsob čištění neodstraní všechny patogenní mikroorganismy, proto je důležité neustále dodržovat hygienická opatření ve všech oblastech výroby mléka (Krátký 2007).

Technologie ustájení může mít významný vliv na kvalitu mléka z hlediska obsahu počtu mikroorganismů a PSB, zejména z pohledu znečištění struků, které mohou být zdrojem traumatizace mléčné žlázy. Nepříznivě také může působit i mikroklima prostředí, např. průvan ve stáji, vysoká relativní vlhkost atd.

Technologie dojení může mít negativní vliv na jakost a zdravotní nezávadnost mléka, protože působí jako vektor přenosu různých patogenních mikroorganismů způsobujících mastitidy. Může způsobovat zranění mléčné žlázy, zvyšovat kontaminaci mléka a při nesprávné sanitaci může být zdrojem výskytu inhibičních látek (Ježková 2008).

3.6 Mléčné automaty

Vyhláškou č. 289/2007 vydanou v roce 2007 byla povolena možnost prodeje syrového mléka prostřednictvím mléčných automatů (MA). K tomuto roku byl také schválen vznik prvního MA na území ČR (MZe 2007; Hlaváček 2010).

K největšímu rozvoji MA ale došlo v roce 2010 z důvodu snížení výkupní ceny mléka v roce 2009, která činila v průměru 6,14 Kč za 1 litr mléka (SZIF 2016).

Syrové kravské mléko je zpracováváno na farmách na různé speciality obvykle regionálního charakteru pro oblast, kde se zemědělská produkce nachází. Zpracováváno je nejen kravské mléko, ale i mléka dalších zvířat (např. kozí a ovčí), která upřednostňují náročnější konzumenti (Mezera & Mejstříková 2011).

Pro prodej syrového mléka přímo v místě zemědělské produkce ke spotřebiteli je také využíváno mléčných automatů. V případě, že je mléčný automat umístěn přímo na farmě, je syrové mléko zahrnuto do prodeje „ze dvora“. Státní veterinární správou (SVS) bylo evidováno ke konci roku 2018 celkem 580 subjektů nabízejících k prodeji syrové mléko buď formou přímého prodeje ze dvora, nebo prostřednictvím 177 mléčných automatů (SVS 2018).

Avšak mléčné automaty mohou být umístěny i mimo farmu. Aby byla zajištěna zdravotní nezávadnost při prodeji mléka, je určeno, že provozovatelem mléčného automatu je výhradně a přímo producent mléka (Mezera & Mejstříková 2011).

Nejvíce přímých prodejů mléka z farem se uskutečňuje v kraji Vysočina a nejvyšší počet prodejních automatů mléka byl v roce 2018 umístěn v Jihomoravském kraji. Nárůst počtu mléčných automatů je trendem současné doby. Oproti roku 2011 počet mléčných

automatů v roce 2018 vzrostl v 8 krajích z celkových 14, jak je znázorněno na Obrázku 8 (Samková et al. 2011; SVS 2018).

Konzumace takového mléka, jež je zařazována do tzv. „naturální spotřeby“ vzrostla z 5 litrů/obyvatele/rok (údaje za rok 2008) meziročně na cca 7,5 l/obyv./rok (Kopáček 2010).

Celková spotřeba mléka a mléčných výrobků v hodnotě mléka za rok 2017 dosahovala do 240 l/obyv./rok. Z celkové spotřeby mléka byla určena spotřeba konzumního mléka blížíící se k 60 l/obyv./rok (ČSÚ 2016).



Obrázek 8: Rozmístění mléčných automatů v jednotlivých krajích České republiky v roce 2011 a ke konci roku 2018

Zdroj: (Samková et al. 2011; SVS 2018)

Prodej mléka z mléčných automatů je stále aktuální, což může souviset především se zvýšeným zájmem spotřebitelů o nákup syrového mléka. Pro svůj obsah snadno dostupných živin a vysokou relativní aktivitu vody představuje syrové mléko vhodné prostředí i pro rozvoj patogenních mikroorganismů (Claeys et al. 2013; Vranješ et al. 2015).

Častými zástupci kontaminace syrového mléka mohou být *Campylobacter* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* sp. (EFSA 2015a).

Zásady správné manipulace se syrovým mlékem jsou pro zachování zdravotní nezávadnosti esenciální, zvláště pak dodržování teplot chladírenského řetězce a tepelná úprava mléka před konzumací (EFSA 2015b).

EFSA vydala oznámení o narůstající spotřebě syrového mléka v celé EU, jelikož lidé věří v jeho příznivé zdravotní účinky. Zároveň ale upozorňuje na možná rizika, která plynou z konzumace syrového mléka, zejména pro tzv. rizikové skupiny obyvatel, do nichž patří děti, novorozenci, těhotné ženy a senioři, lidé s imunodeficiencí a chronickým onemocněním typu cukrovka, onemocnění jater nebo ledvin. Těmto skupinám lidí může stačit konzumace pouze minimálního množství mléka s obsahem patogenů a může dojít k rozvoji onemocnění (Palánová et al. 2016).

Vědecký panel EFSA pro biologická rizika BIOHAZ zaznamenal na základě dat ostatních států o nahlášených alimentárních onemocněních z let 2007 až 2013, že 27 epidemií souviselo s konzumací syrového mléka. 21 z nich bylo zapříčiněno nákazou bakteriemi rodu *Campylobacter* sp., jedna z nich byla způsobena bakteriemi z rodu *Salmonella* sp., dvě onemocnění způsobil toxigenní shiga-like toxin produkovaný bakterií *Escherichia coli* a tři byly zapříčiněny virem klíšťové encefalitidy. Za většinu epidemií odpovídaly bakterie pocházející z kravského mléka, avšak některé byly způsobeny mlékem kozím. Dle předsedy BIOHAZ je nutné zdokonalit komunikaci ke spotřebitelům a upozornit je na nebezpečí spojená s konzumací syrového mléka (EFSA 2015a).

Z kontrol prováděných SVS ČR vyplývá, že mléčné automaty hygienickým a veterinárním požadavkům legislativy vyhovují, protože jejich provozovatelé si uvědomují riziko ztráty spotřebitelů z důvodu zanedbání svých povinností (Hlaváček 2010).

Spotřebitel, kterého nelze ovlivnit přímo legislativou představuje nejslabší článek řetězce, jelikož si často nepřipouští nebo neuvědomuje rizika, která mohou nastat (Hasoňová et al. 2016).

Na některých mléčných automatech provozovatelé upozorňují spotřebitele, že by neměl zakoupené syrové mléko uchovávat při teplotě nad 8 °C více než 1 hodinu. Konzument je tak informován, že udržení nízké teploty je pro syrové mléko zásadní. Neporušení chladírenského řetězce totiž hraje (zvláště v horkých letních dnech) velmi důležitou roli pro zamezení rozvoje kontaminující mikrobioty (Vorlová 2010).

Nejvíce problematické mohou být teploty skladování přesahující 10 °C. S ohledem na doplňování automatů se může doba skladování mléka prodloužit u konzumenta až na čtyři dny (Vorlová 2010; Chramostová et al. 2014).

3.7 Použití systému HACCP v produkci mléka

Bezpečnost potravin je komplexním systémem pro ochranu spotřebitele proti možným nebezpečím a rizikům z potravin. Systém je založen na dokumentu Bílá kniha o bezpečnosti potravin z roku 2000. Hlavními nástroji pro dosažení bezpečnosti potravin jsou Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) systém, správná zemědělská praxe (Good Agricultural Practice GAP), správná hygienická praxe (Good Hygiene Practice GHP) a správná výrobní praxe (Good Manufacturing Practice GMP). HACCP je určen k systematické identifikaci a kontrole rizik z potravin, která mohou být mikrobiologická, fyzikální nebo chemická, a tak mohou ohrozit přípravu bezpečných potravin. Systém HACCP zahrnuje identifikaci možných chyb a plánuje jejich prevenci. V podstatě slouží ke kontrole jednotlivých složek potravin a kontrole dodávek do potravinářských podniků a co se s nimi děje poté.

Nejproblematictější krokem v implementaci HACCP systému jsou často specifikace kritických kontrolních bodů. Kritický bod je krok, ve kterém může být použita kontrola a je zásadní pro prevenci rizika nebo pro jeho snížení na akceptovatelnou úroveň. Jsou navrženy a popsány nejběžnější kontrolní body ve sběru mléka z farem (Kouřimská et al. 2006).

Historie systému HACCP sahá do sedmdesátých let do USA, kdy byl využíván pro přípravu jídel pro kosmonauty z důvodu vyloučení rizika nebezpečí z potravin. Do České republiky se systém dostal v roce 1995 a využíval se hlavně v průmyslu potravin živočišného původu, kam je řazen i mlékárenský průmysl. Od roku 1997 byl systém zaveden do povinné legislativy ČR zákonem o potravinách č. 110/1997 Sb. Existují 2 modely systému HACCP ve světě. První je „americká škola“, pro kterou platí, že většina pracovníků nemá kvalifikaci a odborné znalosti provozu, a proto se používá maximální počet kontrolních bodů v systému. Pro druhou „skandinávskou školu“ je zavedeno maximální omezení kontrolních bodů na minimum a všechno ostatní je zajištěno pracovníky s dostatečnou kvalifikací. V České republice je situace podobná spíše skandinávskému systému z důvodu dobré kvalifikace pracovníků (MZe 1997; Červenka et al. 2005).

V rámci správné hygienické a výrobní praxe by měl být použit systém HACCP u všech výrobců potravin. Podle vyhlášky č. 161/2004 zákona o potravinách, která pojednává o stanovení kritických kontrolních bodů, by měly být od počátku roku 2005 určeny kontrolní body u všech výrobců i provozovatelů potravinářských firem, včetně mlékárenských. Velkovýrobci a zpracovatelé mléka již většinou systém HACCP zaveden mají, situace je jiná u malovýrobců a farmářů, kteří z velké části systém HACCP ještě nepoužívají.

Dle průzkumu bylo zjištěno, že tento systém zná jen 57 % dotázaných farmářů a malozpracovatelů (Kouřimská et al. 2006).

Základními charakteristikami systému HACCP jsou zejména hledání zdrojů nebezpečí na celé cestě od suroviny až ke konzumaci spotřebitelem a identifikace kritických bodů v technologickém procesu výroby. Hlavním účelem analýzy je snížení rizika nebezpečí při výrobě na minimum a zdravotně nezávadné balení výrobků. Základní pojmy v HACCP systému jsou následující.

Kritický kontrolní bod (CCP), jímž je označen technologický úsek s největším rizikem kontaminace nebo zdravotní nezávadnosti potravin a jehož cílem je zamezit či minimalizovat toto nebezpečí. Nebezpečí je určeno jako fyzikální, chemický nebo biologický prvek, jenž může působit na potravinu a způsobit zdravotní závadnost. Analýza nebezpečí je hodnocení a shromažďování informací o různých nebezpečích ohrožující zdravotní nezávadnost potravin a určení, za jakých podmínek může být přítomno v potravine, pro to, aby potravina byla nezávadná. Ovládací opatření je činnost sloužící k prevenci nebo snížení na přípustnou úroveň nebo vyloučení nebezpečí, které by mohlo ohrozit zdravotní nezávadnost potravin. Monitoringem je míněno měření a pozorování stanovených znaků daným postupem pro posouzení, jestli je CCP správně ošetřen. Nápravné opatření je činnost odstraňující nebo snižující nebezpečí a dopad následků vykonávaná ihned po zjištění překročení limitu kritické meze, čímž je hodnota kritéria neodpovídající hodnotě požadované v daném CCP (Červenka et al. 2005).

Zavádění systému HACCP je určeno 7 závaznými principy, do nichž se řadí analýza nebezpečí, určení CCP, stanovení kritických mezí, tvorba monitorovacího systému, nápravných opatření, ověřovacích postupů a vytvoření dokumentace (Voldřich et al. 2000; Metaal 2004).

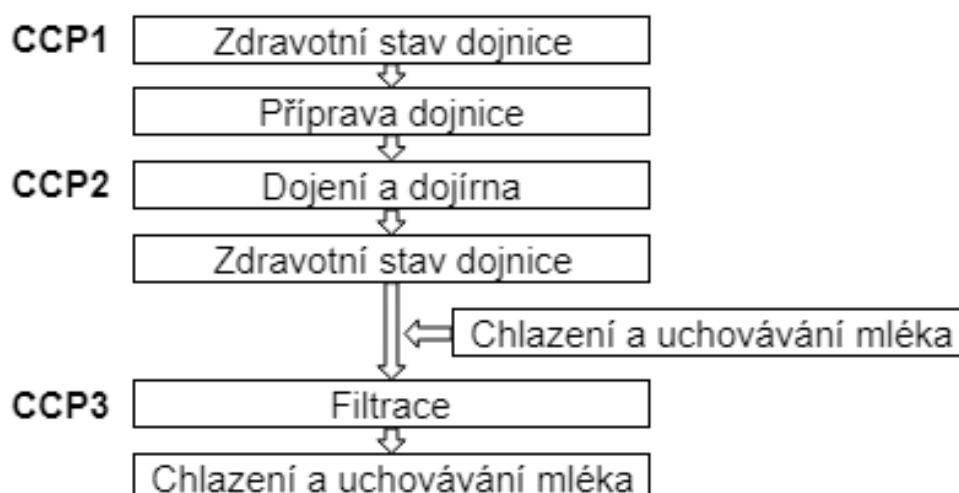
Zpracování a zavedení systému je přibližně následující – popis výrobku a technologie výroby (navržení diagramu výroby), vykonání analýzy nebezpečí, stanovení CCP, určení znaků a kritických mezí v CCP, stanovení způsobů, frekvence a metodiky monitoringu, stanovení nápravných opatření, určení ověřovacích postupů a zavedení dokumentace. Plán systému HACCP si může podnik vypracovat sám nebo ho lze objednat u akreditované organizace. Přílohou plánu systému HACCP by měla být provozní dokumentace, podnikové normy, sanitační řád, pracovní náplň zaměstnanců, opatření DDD (desinsekce, deratizace a desinfekce), havarijní řád a další (Voldřich et al. 2004).

Provozovatel mlékárenského podniku nese primární odpovědnost za bezpečnost svých výrobků. Kritické kontrolní body v systému HACCP jsou důležitou součástí správné zemědělské praxe. Bezpečnost mléka a výrobků z něj musí být zabezpečena v celém průběhu, od prvovýroby, zpracování až po distribuci mléka. Odpovědnost výrobců je nutné zajistit procesy ze systému HACCP a použitím správné hygienické praxe. V prvovýrobě se zmiňované postupy a zásady mohou dočasně nahradit vhodnými doporučeními pro správnou hygienickou praxi (Kopáček et al. 2004; Kurki 2004; Jedlička 2005).

Systém HACCP lze úspěšněji implementovat, pokud je určen tým zodpovědný za systém HACCP a jeho vedení. Při získávání mléka jsou nejčastěji monitorovány aspekty jako je mikrobiologická jakost, PSB, CO₂, pH, čas a teplota (Henekine 2003).

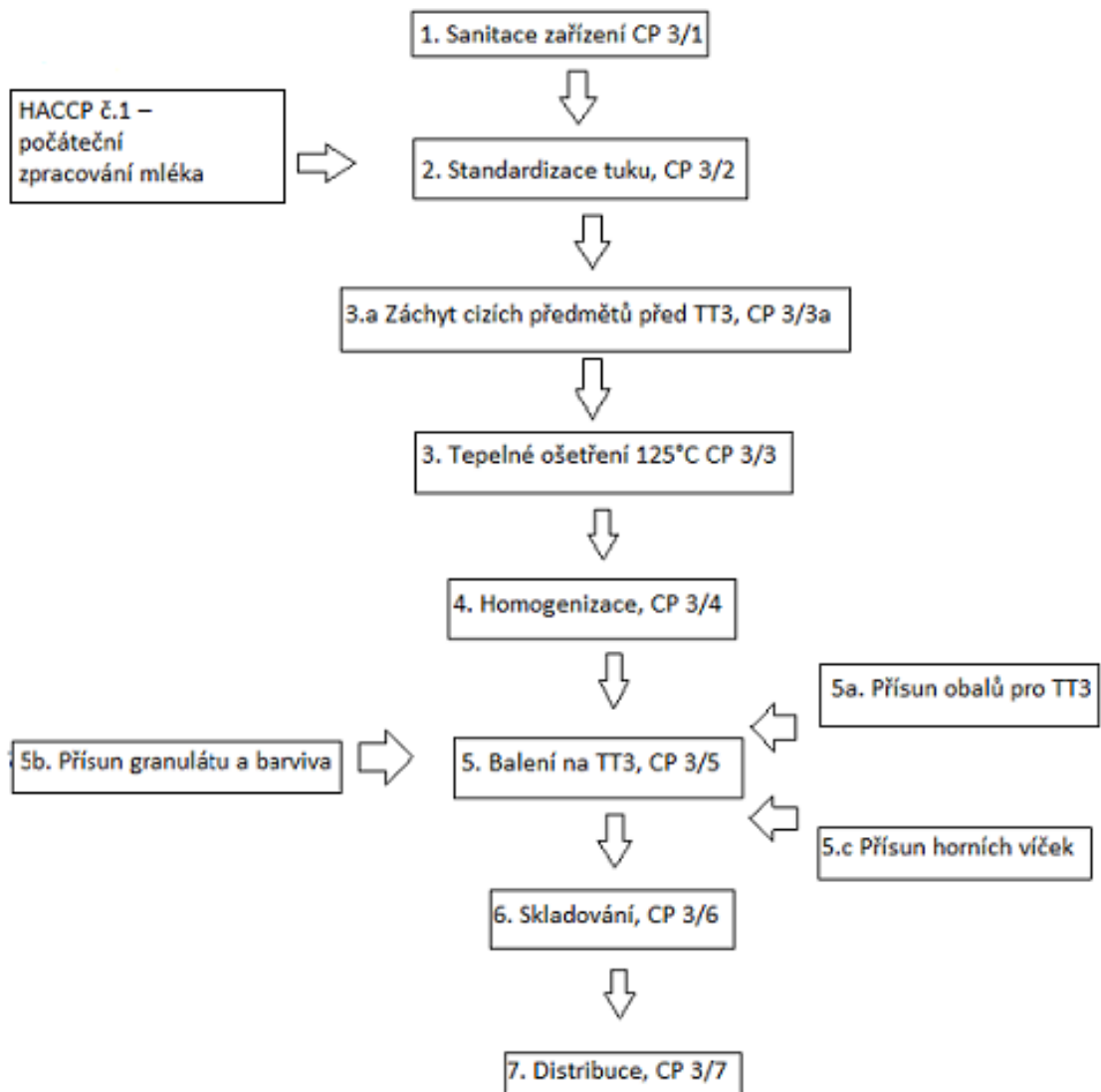
Sestavení kritických kontrolních bodů bývá nejsložitější částí sestavení HACCP plánu. Počet kroků závisí na velikosti provozu, na malých farmách mohou například stačit pouze 3 CCP uvedené na Obrázku 9, u větších provozů jich může být větší počet, jak je zobrazeno na Obrázku 10.

Při sestavování plánu HACCP pro malé farmy mohou být kritickými body například: CCP1 Zdravotní stav dojnice, CCP2 Prostředí chovu, CCP3 Příprava dojnice, CCP4 Dojení, CCP5 Dojírna, CCP6 Chlazení a uskladnění mléka. Pro každý kritický bod se určuje podrobná analýza rizik, přesná specifikace kritického bodu včetně kritických mezí a sledování znaku, dále monitoring a vykonávaná nápravná opatření při překročení kritérií (Voldřich et al. 2000, 2004; Červenka et al. 2005).



Obrázek 9: Proudový diagram produkce mléka v prvovýrobě na farmě

Zdroj: vlastní zpracování



Obrázek 10: Proudový diagram produkce mléka ve velkovýrobě

Zdroj: Madeta a.s.

4 Materiál a metody

Jednotlivé vzorky syrového mléka byly odebírány z mléčných automatů a z přímého prodeje z farem. Vzorky mléka byly odebrány do sterilních sklenic jak z automatu na mléko, tak z přímého prodeje z farmy a bez prodlení zchlazeny v chladicím boxu, aby nedošlo ke kontaminaci.

V odebraných vzorcích syrového mléka bylo provedeno stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM), koliformních bakterií, enterokoků a sporotvorných bakterií. Všechny stanovení byly provedeny pomocí deskové metody přelivem. Výsledky byly vyjádřeny v KTJ/ml (kolonie tvořící jednotky na mililitr).

4.1 Mléko z mléčného automatu

Syrové mléko z mléčných automatů bylo odebíráno ze dvou různých míst. Po nadojení je mléko zchlazeno na teplotu 4 °C a bez tepelného či jiného ošetření je dopraveno do mléčných automatů, kde je skladováno v chlazených zásobních nádobách.

Spotřebitel je upozorněn nápisem umístěným na mléčném automatu, že mléko je syrové a že je nutné ho před konzumací tepelně upravit. To, že se jedná o mléko syrové, není důvodem k obavám o zdravotní závadnost. Pouze je zde nutné pamatovat na vyšší možnost rizika kontaminace mikroorganismy.

Mléko z automatu je možné zakoupit do skleněných nebo plastových lahví, jejichž nákup je možný v druhé části mléčného automatu. Toto umožňuje zmenšit riziko kontaminace mléka z nečisté lahve, a tím prodloužit trvanlivost mléka. Je zde také možnost načerpání mléka do vlastních přinesených lahví, samozřejmě zde za čistotu si zodpovídá zákazník sám.

Transport syrového mléka do mléčných automatů se uskutečňuje ve speciálně upravených vozidlech pro převoz chlazených zádobníků. Po nadojení má mléko tělesnou teplotu dojnice, poté se zchladí na teplotu 4 °C, a tato teplota je udržována během transportu do automatu až do doby stáčení zákazníkem.

4.2 Mléko z farmy z přímého prodeje

Vzorky syrového mléka byly odebírány ze dvou různých farem z přímého prodeje. Po nadojení se zchladily na teplotu 4 °C a byly odebrány do sterilních vzorkovnic. I v přímém prodeji z farmy platí, že pokud je prodáváno syrové mléko, výrobce na tuto skutečnost musí zákazníka upozornit informací o nutnosti tepelného ošetření před konzumací.

4.3 Živné půdy

Fyziologický roztok s peptonem

Pepton	1,0 g
Chlorid sodný	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Odvážené přesné množství složek bylo rozpuštěno v destilované vodě, rozplněno do Erlenmeyerových baněk a do zkumavek. Následovala sterilace při teplotě 120 °C 15 minut.

APHA (Standard Plate Count Agar) CM463 Oxoid

Kvasnicový extrakt	2,5 g
Pankreaticky zpracovaný kasein (trypton)	5,0 g
Glukóza	1,0 g
Agar	15,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pro přípravu živné půdy bylo potřeba 23,5 g směsi. Půda byla připravena rozpuštěním směsi v 1 litru destilované vody a sterilována v autoklávu za zvýšeného tlaku. Před použitím byla půda vždy vytemperována na teplotu kolem 50 °C.

Slanetz – Bartley medium CM0377 Oxoid

Tryptóza	20,0 g
Agar	10,0 g
Kvasničný extrakt	5,0 g
Hydrogen fosforečnan draselný dihydrát	4,0 g
Glukóza	2,0 g
Azid sodný	0,4 g
Tetrazolium chlorid	0,1 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pro přípravu média bylo použito 42 g směsi. Toto médium nevyžaduje sterilaci, bylo pouze rozeřáno do úplného rozpuštění. Před použitím bylo pěstební prostředí vytemperováno na teplotu kolem 50 °C.

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBL) Oxoid

Pepton	7,0 g
Chlorid sodný	5,0 g
Kvasničný extrakt	3,0 g
Žlučové soli č. 3	1,5 g
Neutrální červeně	0,03 g
Krystalová violet	0,002 g
Glukóza	10,0 g
Agar	12,0 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pěstební prostředí bylo připraveno rozpuštěním 38,5 g směsi na 1000 ml destilované vody. Směs byla za stálého míchání přivedena k varu. Suspenze byla udržována při varu, než se všechny obsah rozpustil, minimálně však 2 minuty. Po rozpuštění a rozehrání stejně jako u média Slanetz – Bartley nebyla provedena sterilizace v autoklávu. Před použitím bylo médium vytemperováno na teplotu kolem 50 °C.

4.4 Postup práce

Vzorky mléka byly odebírány během léta roku 2017 po dobu 3 měsíců v pravidelných intervalech. Vzorky z farem byly odebírány do sterilních skleněných lahví o objemu 200 ml, z mléčných automatů do lahví o objemu 500 ml a ihned po odběru uloženy do chladicího boxu s teplotou nepřesahující 6 °C. Všechny vzorky byly zpracovány do 2 hodin od odběru.

Bylo provedeno 10 odběrů po 4 vzorcích, dva vzorky z přímého prodeje z farmy (MF) a dva vzorky z mléčných automatů (MA). U každého vzorku bylo provedeno stanovení enterokoků, stanovení koliformních bakterií, stanovení celkového počtu mikroorganismů a stanovení sporotvorných bakterií.

Prvním ze sledovaných stanovení bylo stanovení enterokoků. Jako kultivační prostředí bylo použito selektivně – diagnostické Slanetz – Bartley médium. Stanovení enterokoků bylo provedeno pomocí deskové metody ve dvou opakováních. Principem metody je zaočkování předem naředěného vzorku na Petriho misky přelivem. Desítkové ředění bylo uzpůsobeno dle předpokládané míry znečištění. Očkování na Petriho misky probíhalo odpipetováním 1 ml

vybraného ředění, následované přelitím vytemperovaným agarem na 50 °C krouživým promícháváním. U daného ředění byla uskutečněna vždy dvě opakování. Petriho misky s tuhým živným médiem byly kultivovány dnem vzhůru v termostatu při 37 °C po dobu 48 hodin. Narostlé kolonie po kultivaci byly sečteny a přepočteny na 1 ml vzorku. Všechny postupy byly prováděny asepticky za použití sterilního nádobí.

Dalším stanovením bylo stanovení koliformních bakterií. Pro kultivaci byla použita živná půda Violet Red Bile Glucose Agar (VRBL). Postup byl obdobný jako u předchozího stanovení, avšak u stanovení koliformů se po zatuhnutí půda přelávala ještě druhou vrstvou. Petriho misky se kultivovaly při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byla použita neselektivní živná půda Standard Plate Count Agar APHA. Stanovení CPM bylo provedeno obdobně jako u stanovení enterokoků, pomocí deskové metody ve dvou opakováních. Kultivace v termostatu probíhala při teplotě 30 °C po dobu 3 dnů.

Stanovení počtu sporotvorných bakterií probíhalo metodicky obdobně. Bylo použito pěstební prostředí Standard Plate Count Agar APHA. Postup byl podobný jako u stanovení CPM, avšak zde byla použita pasterace k potlačení vegetativních forem mikroorganismů. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C 3 dny.

Po uplynutí doby kultivace byly spočítány všechny narostlé kolonie a množství byla přepočtena na KTJ/ml pomocí níže uvedeného vzorce:

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0,1 * n_2) * d$$

N – celkový počet KTJ v 1 ml mléka

ΣC – součet kolonií ze všech ploten

n_1 – počet Petriho misek vybraných pro první ředění

n_2 - počet Petriho misek vybraných pro druhé ředění

d – faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitého ředění

K vyhodnocení výsledků byl použit statistický program STATISTICA 12 (StatSoft) se statistickými metodami na hladině významnosti $\alpha < 0,05$.

5 Výsledky

V průběhu léta byly odebrány 4 vzorky syrového kravského mléka ze 2 automatů na mléko a ze 2 farem z přímého prodeje. Od každého vzorku bylo uskutečněno 10 opakování odběrů.

Odběr vzorků z mléčných automatů (MA)

Výsledky mikrobiologického rozboru z mléčných automatů jsou zaznamenány v Tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1: Automat na mléko - první odběrové místo (MA1) v KTJ/ml

ODBĚR	STANOVENÍ			
	Enterokoky	Koliformní bakterie	CPM	Spory
1	$< 10^1$	$2,00 \times 10^1$	$3,60 \times 10^3$	$< 10^1$
2	$1,02 \times 10^2$	$9,00 \times 10^1$	$1,07 \times 10^4$	$< 10^1$
3	$1,09 \times 10^2$	$9,00 \times 10^1$	$1,35 \times 10^4$	$< 10^1$
4	$5,10 \times 10^1$	$7,50 \times 10^1$	$1,34 \times 10^4$	$4,90 \times 10^1$
5	$1,05 \times 10^2$	$1,80 \times 10^2$	$2,61 \times 10^4$	$< 10^1$
6	$1,05 \times 10^2$	$1,25 \times 10^2$	$1,19 \times 10^4$	$< 10^1$
7	$2,92 \times 10^2$	$8,95 \times 10^2$	$1,06 \times 10^4$	$< 10^1$
8	$1,09 \times 10^2$	$1,60 \times 10^2$	$1,63 \times 10^4$	$< 10^1$
9	$1,46 \times 10^2$	$1,75 \times 10^2$	$1,25 \times 10^4$	$< 10^1$
10	$1,03 \times 10^2$	$1,30 \times 10^2$	$2,32 \times 10^4$	$< 10^1$

Oba automaty by splňovaly normu ČSN 570529 pro stanovení enterokoků a koliformních bakterií, která uváděla max. povolený limit 10^3 KTJ/ml. Tato norma byla zrušena a nebyla nahrazena.

U enterokoků došlo v průběhu roku k nárůstu jejich počtu, v případě obou automatů byly nejvyšší hodnoty naměřeny při sedmém odběru. Průměrný počet enterokoků z MA1 byl $1,12 \times 10^2$ KTJ/ml a z MA2 se hodnoty průměrně pohybovaly kolem $1,15 \times 10^2$ KTJ/ml. Hodnoty z obou automatů byly velmi podobné.

Podobná situace nastala i pro počty koliformů, jejichž hodnoty byly na začátku léta nižší a v průběhu dalších odběrů stoupaly. Průměrný počet koliformních bakterií byl

u MA1 $1,94 \times 10^2$ KTJ/ml a u MA2 byl počet bakterií $1,71 \times 10^2$ KTJ/ml. Rozdíl hodnot nebyl velký.

Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) bylo porovnáno s Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, které nařizuje max. povolený limit pro syrové kravské mléko $\leq 10^5$ KTJ/ml. Všechny odběry ve stanovení CPM normu splnily. Nejnižší CPM bylo shodně u obou automatů při prvním odběru. Průměrný CPM byl u MA1 $1,42 \times 10^4$ KTJ/ml, pro MA2 byla průměrná hodnota CPM $1,39 \times 10^4$ KTJ/ml. Hodnoty průměrných počtů CPM byly téměř totožné.

Norma ČSN 570529 (zrušena bez náhrady) pro spory požadovala negativní sporotvorné anaerobní bakterie v 0,1 ml mléka. Kromě čtvrtých odběrů, kdy byla uvedená norma překročena, bylo při stanovení počtu spor ve všech odběrech dosaženo hodnot $< 10^1$ KTJ/ml.

V průběhu roku nebyly mezi počty enterokoků, koliformů, CPM ani spor statisticky významné rozdíly.

Tabulka 2: Automat na mléko - druhé odběrové místo (MA2) v KTJ/ml

ODBĚR	STANOVENÍ			
	Enterokoky	Koliformní bakterie	CPM	Spory
1	$5,00 \times 10^1$	$2,50 \times 10^1$	$3,60 \times 10^3$	$< 10^1$
2	$1,03 \times 10^2$	$1,50 \times 10^2$	$1,31 \times 10^4$	$< 10^1$
3	$9,18 \times 10^1$	$8,50 \times 10^1$	$1,25 \times 10^4$	$< 10^1$
4	$5,40 \times 10^1$	$2,50 \times 10^1$	$2,06 \times 10^4$	$5,10 \times 10^1$
5	$1,01 \times 10^2$	$1,30 \times 10^2$	$1,81 \times 10^4$	$< 10^1$
6	$1,13 \times 10^2$	$1,70 \times 10^2$	$1,66 \times 10^4$	$< 10^1$
7	$2,77 \times 10^2$	$5,80 \times 10^2$	$9,10 \times 10^3$	$< 10^1$
8	$8,90 \times 10^1$	$1,15 \times 10^2$	$1,24 \times 10^4$	$< 10^1$
9	$1,52 \times 10^2$	$2,15 \times 10^2$	$1,42 \times 10^4$	$< 10^1$
10	$1,19 \times 10^2$	$2,20 \times 10^2$	$1,83 \times 10^4$	$< 10^1$

Odběr vzorků z farem

Celkové naměřené hodnoty počtu mikroorganismů z obou farem jsou uvedeny v Tabulkách 3 a 4.

Podobně výsledky mikrobiologických rozborů mléka z farem ukazovaly na tendenci stoupaní počtu mikroorganismů v průběhu roku ve vzorcích mléka. Ve všech stanoveních vzájemně mezi farmami nebyly v průměru statisticky významné rozdíly.

Tabulka 3: Mléko z farmy - první odběrové místo (MF1) v KTJ/ml

ODBĚR	STANOVENÍ			
	Enterokoky	Koliformní bakterie	CPM	Spory
1	$3,00 \times 10^1$	$2,50 \times 10^1$	$2,30 \times 10^3$	$< 10^1$
2	$1,28 \times 10^2$	$6,50 \times 10^1$	$1,49 \times 10^4$	$< 10^1$
3	$1,01 \times 10^2$	$1,15 \times 10^2$	$1,48 \times 10^4$	$< 10^1$
4	$6,50 \times 10^1$	$5,00 \times 10^1$	$1,78 \times 10^4$	$8,90 \times 10^1$
5	$1,28 \times 10^2$	$2,05 \times 10^2$	$1,94 \times 10^4$	$< 10^1$
6	$1,08 \times 10^2$	$1,85 \times 10^2$	$1,40 \times 10^4$	$< 10^1$
7	$3,32 \times 10^2$	$1,31 \times 10^3$	$1,49 \times 10^4$	$< 10^1$
8	$1,00 \times 10^2$	$1,75 \times 10^2$	$1,36 \times 10^4$	$< 10^1$
9	$1,59 \times 10^2$	$2,25 \times 10^2$	$1,50 \times 10^4$	$< 10^1$
10	$1,41 \times 10^2$	$2,00 \times 10^2$	$1,95 \times 10^4$	$< 10^1$

U stanovení enterokoků byly počty ve vzorcích mléka z farem nejnižší v prvním odběru. Nejvyšší hodnota byla dosažena při sedmém odběru, a to $3,72 \times 10^2$ KTJ/ml. Průměrná hodnota enterokoků byla u MF1 zjištěna na $1,29 \times 10^2$ KTJ/ml a u MF2 $1,28 \times 10^2$ KTJ/ml. Rozdíl mezi hodnotami průměrů byl statisticky nevýznamný.

Koliformní bakterie se pohybovaly v nejnižších počtech v průběhu prvních čtyř odběrů. Maximálně dosahovaly hodnot vzorky z obou farem při sedmém odběru $1,31 \times 10^3$ KTJ/ml, $9,3 \times 10^2$ KTJ/ml. Průměrné počty koliformů dosahovaly z MF1 $2,56 \times 10^2$ KTJ/ml a z MF2 hodnot $2,07 \times 10^2$ KTJ/ml. Statistický rozdíl nebyl významný.

Maximální limit pro CPM $\leq 10^5$ KTJ/ml byl dodržen ve všech odběrech, hodnoty CPM se od prvního odběru, kdy byly hodnoty nejnižší, postupně zvyšovaly. Ostatní odběry se pohybovaly ve velmi podobných počtech, s mírně stoupající tendencí.

Průměrný počet CPM byl $1,45 \times 10^4$ KTJ/ml. Mezi výsledky nebyl statisticky významný rozdíl.

Při všech odběrech byly kromě čtvrtého odběru zjištěny hodnoty sporotvorných bakterií $< 10^1$ KTJ/ml. Ostatní výsledky byly velmi podobné, bez statisticky významného rozdílu. Stejně jako v případě automatů, i zde by platila, nyní již zrušená, norma ČSN 570529 pro spory. Průměrné hodnoty spor u obou farem byly vyhodnoceny na hranici normy, $1,02 \times 10^1$ KTJ/ml a $1,08 \times 10^1$ KTJ/ml.

Tabulka 4: Mléko z farmy - druhé odběrové místo (MF2) v KTJ/ml

ODBĚR	STANOVENÍ			
	Enterokoky	Koliformní bakterie	CPM	Spory
1	$5,00 \times 10^1$	$1,50 \times 10^1$	$2,70 \times 10^3$	$< 10^1$
2	$1,20 \times 10^2$	$1,05 \times 10^2$	$1,50 \times 10^4$	$< 10^1$
3	$9,50 \times 10^1$	$9,00 \times 10^1$	$1,31 \times 10^4$	$< 10^1$
4	$5,10 \times 10^1$	$5,00 \times 10^1$	$1,72 \times 10^4$	$7,20 \times 10^1$
5	$1,01 \times 10^2$	$1,75 \times 10^2$	$2,07 \times 10^4$	$< 10^1$
6	$1,08 \times 10^2$	$1,80 \times 10^2$	$1,18 \times 10^4$	$< 10^1$
7	$3,72 \times 10^2$	$9,30 \times 10^2$	$1,28 \times 10^4$	$< 10^1$
8	$1,04 \times 10^2$	$1,35 \times 10^2$	$1,40 \times 10^4$	$< 10^1$
9	$1,75 \times 10^2$	$1,85 \times 10^2$	$1,52 \times 10^4$	$< 10^1$
10	$1,08 \times 10^2$	$2,00 \times 10^2$	$2,13 \times 10^4$	$< 10^1$

Statistické hodnocení

Pro hodnocení výsledků ze stanovení enterokoků, koliformních bakterií, CPM i spor byly použity metody popisné statistiky, korelace, dvouvýběrový t-test, jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA) a statistické zpracování výsledků do krabicových grafů. V metodě ANOVA byly výsledky testovány pomocí Scheffého testu, který neprokázal statisticky významné rozdíly, proto nebyl zahrnut do textové části výsledků.

Tabulka 5: Popisné statistiky

Proměnná	Popisné statistiky (vysledky pro stat_dp)				
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm.odch.
Enterokoky	40	121,27	0,000	372,00	75,918
Koliformy	40	206,88	15,000	1310,00	264,572
Spory	40	8,92	0,000	89,00	19,873
CPM	40	14287,00	2300,000	26180,00	5216,584

V Tabulce 5 jsou zobrazeny popisné statistiky, jako je počet platných hodnot, průměry jednotlivých stanovení, jsou určeny jejich minimální a maximální hodnoty. Je také zobrazena směrodatná odchylka, která určuje, jak moc jsou hodnoty rozptýleny od průměru hodnot.

Tabulka 6: Korelace

Proměnná	Korelace (vysledky pro stat_dp) Označ. korelace jsou významné na hlad. p < ,05000 N=40 (Celé případy vynechány u ChD)					
	Průměry	Sm.odch.	Enterokoky	Koliformy	Spory	CPM
Enterokoky	121,27	75,918	1,000000	0,918387	-0,264490	0,084515
Koliformy	206,88	264,572	0,918387	1,000000	-0,180044	0,016792
Spory	8,92	19,873	-0,264490	-0,180044	1,000000	0,258368
CPM	14287,00	5216,584	0,084515	0,016792	0,258368	1,000000

Tabulka 6 popisuje korelace mezi jednotlivými stanoveními mikroorganismů. Z tabulky lze vyčíst, že korelace mezi enterokoky a koliformy je silná (dosahuje hodnoty 0,918387).

Příčinou korelace může být fakt, že enterokoky i koliformy patří do společné čeledi bakterií Enterobacteriaceae a původ kontaminace může být stejný. U jiných stanovení korelace nebyla zaznamenána.

Tabulka 7: Dvouvýběrový t-test pro mléčné automaty

Proměnná	t-testy; grupováno: MLÉKO Skup. 1: MA1 - počet platných hodnot: 10 Skup. 2: MA2 - počet platných hodnot: 10								
	Průměr MA1	Průměr MA2	t	sv	p	Sm.odch. MA1	Sm.odch. MA2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
Enterokoky	112,25	115,04	-0,090	18	0,930	74,621	64,221	1,350	0,662
Koliformy	194,00	171,50	0,230	18	0,813	251,228	158,781	2,503	0,188
Spory	7,65	7,15	0,074	18	0,942	14,791	15,571	1,108	0,881
CPM	14206,00	13885,00	0,124	18	0,903	6470,05	5000,267	1,674	0,454

V tabulce 7 jsou zobrazeny výsledky t-testu pro oba mléčné automaty. Byly zjištěny průměrné hodnoty z obou automatů, výpočet testového kritéria (t), počet hodnot (sv), určení kritického oboru hodnot (p), směrodatné odchylky, F-poměr rozptylů a p-hodnota rozptylů.

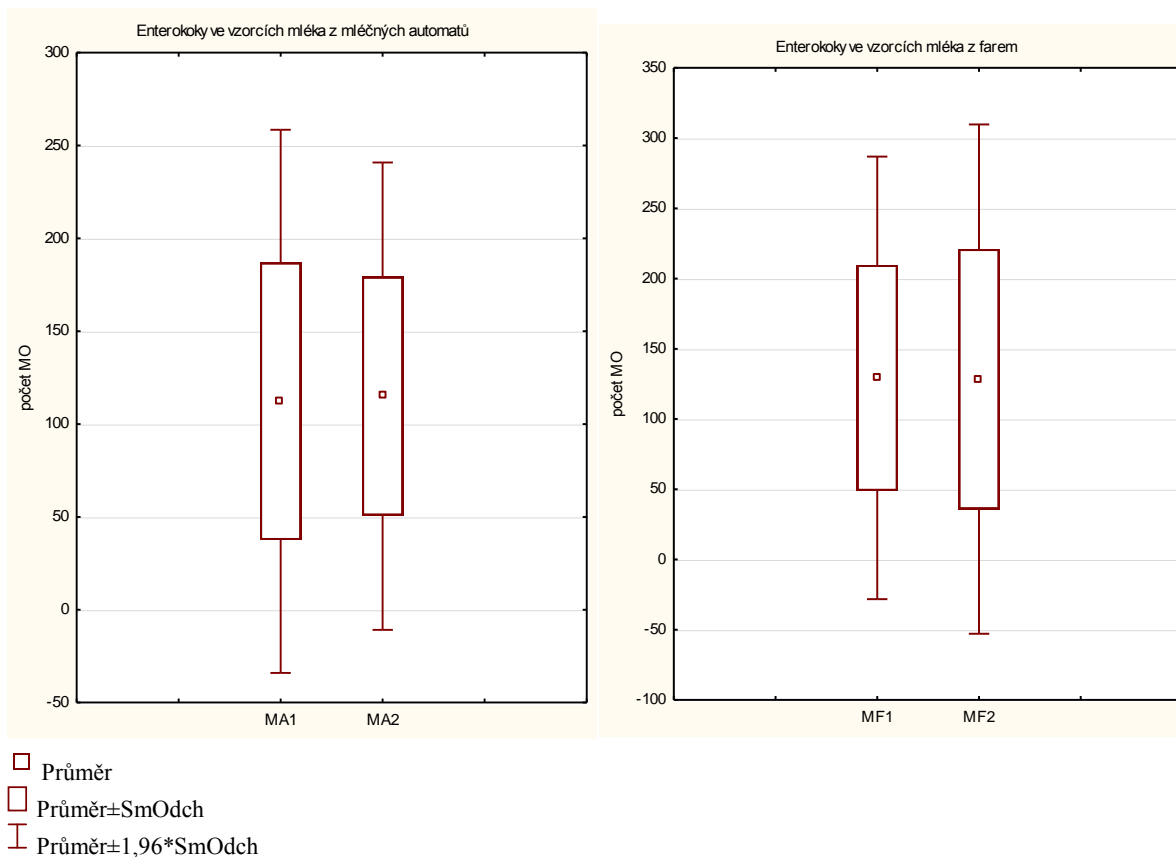
F-test je test o shodě dvou rozptylů. Pokud jsou rozptyly shodné, je přijata nulová hypotéza a dále proveden dvouvýběrový t-test. Pokud je hodnota p-rozptyly $< p$, nulová hypotéza je zamítnuta. Mezi vzorky není statisticky významný rozdíl.

Tabulka 8: Dvouvýběrový t-test pro farmy

Proměnná	t-testy; grupováno: MLÉKO								
	Skup. 1: MF1 - počet platných hodnot: 10			Skup. 2: MF2 - počet platných hodnot: 10					
	Průměr MF1	Průměr MF2	t	sv	p	Sm.odch. MF1	Sm.odch. MF2	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
Enterokoky	129,34	128,44	0,023	18	0,982	80,396	92,501	1,324	0,683
Koliformy	255,50	206,50	0,337	18	0,740	377,326	261,577	2,081	0,290
Spory	10,75	10,15	0,054	18	0,958	27,542	21,931	1,577	0,508
CPM	14650,00	14407,00	0,108	18	0,915	4852,834	5211,372	1,153	0,835

Tabulka 8 zobrazuje výsledky t-testu. Jako u předchozího testu, hodnota p-rozptylů $< p$, nulová hypotéza je zamítnuta a mezi vzorky není statisticky významný rozdíl.

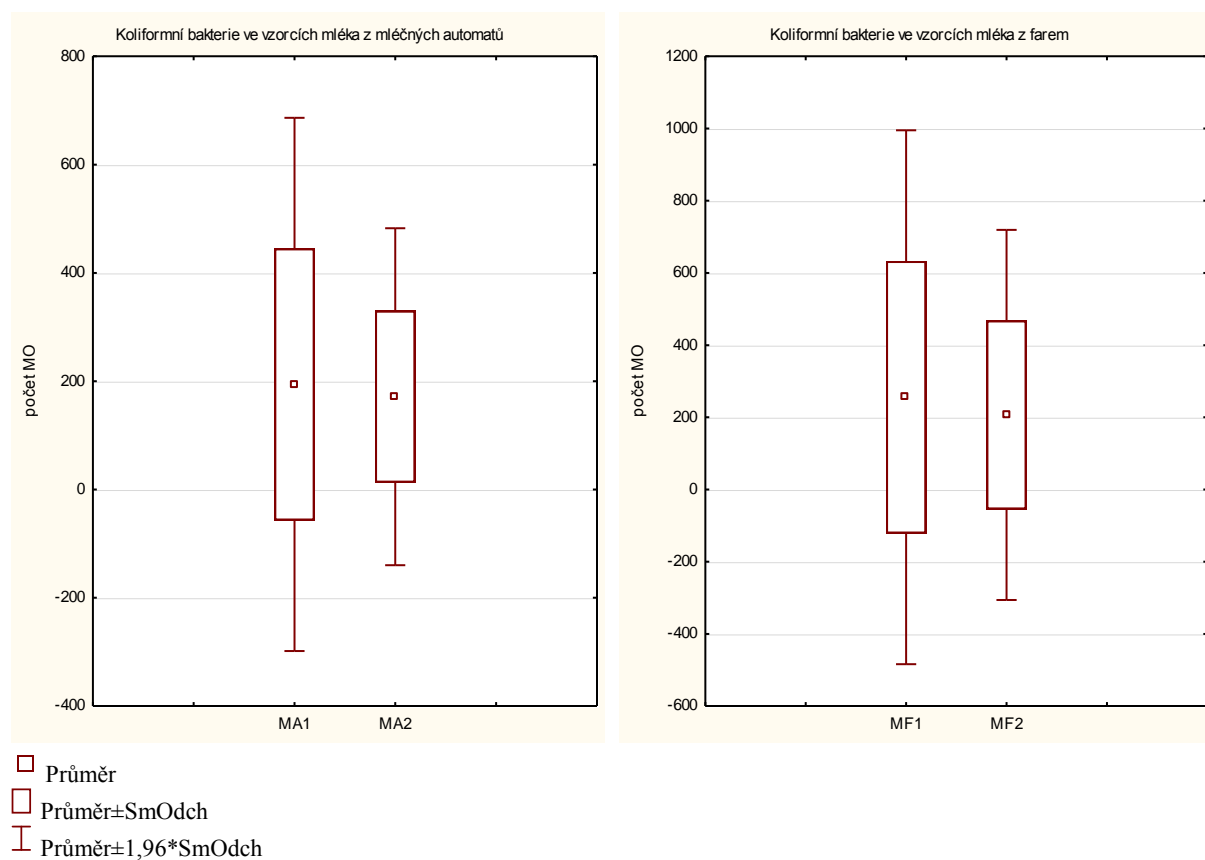
Grafy 1 a 2: Enterokoky ve vzorcích z mléčných automatů a z farem



Graf 1 zobrazuje pomocí krabicových grafů stanovení počtu enterokoků ve vzorcích mléka z mléčných automatů, graf 2 počty enterokoků v mléce z farem. Průměrná hodnota je ve všech čtyřech vzorcích podobná, pro MA je zaokrouhlena na $1,14 \times 10^2$ KTJ/ml, u MF je průměrná hodnota $1,29 \times 10^2$ KTJ/ml.

Ve vzorcích z MA1 a MF2 byly nalezeny větší odchylky od průměru hodnot (větší rozdíly mezi hodnotami). Vzorky MA2 a MF1 měly hodnoty více stabilní, než MA1 a MF2, kde vykazovaly větší rozdíly a menší stabilitu.

Grafy 3 a 4: Koliformní bakterie ve vzorcích z mléčných automatů a z farem



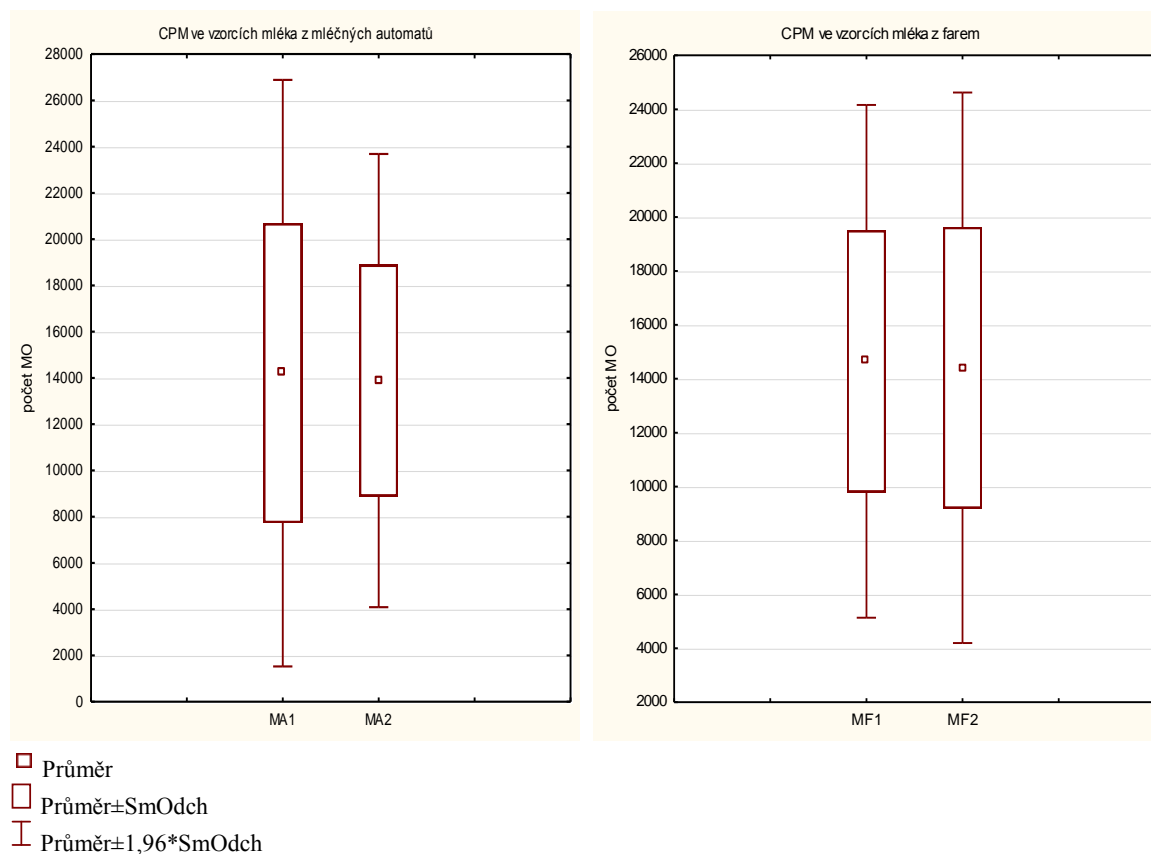
Grafy 3 a 4 zobrazují krabicovými grafy počty koliformních bakterií ve vzorcích mléka z mléčných automatů a z farem. Průměrné hodnoty jsou ve vzorcích obdobné, pro mléčné automaty je průměrná hodnota $1,83 \times 10^2$ KTJ/ml, pro farmy $2,31 \times 10^2$ KTJ/ml.

V grafech 3 a 4 ve vzorcích z MA1 a MF1 byly zaznamenány větší odchylky od průměru, což také znamenalo větší rozdíly mezi hodnotami. U vzorků MA2 a MF2 byly hodnoty stabilnější než u MA1 a MF1, kde byly více rozdílné.

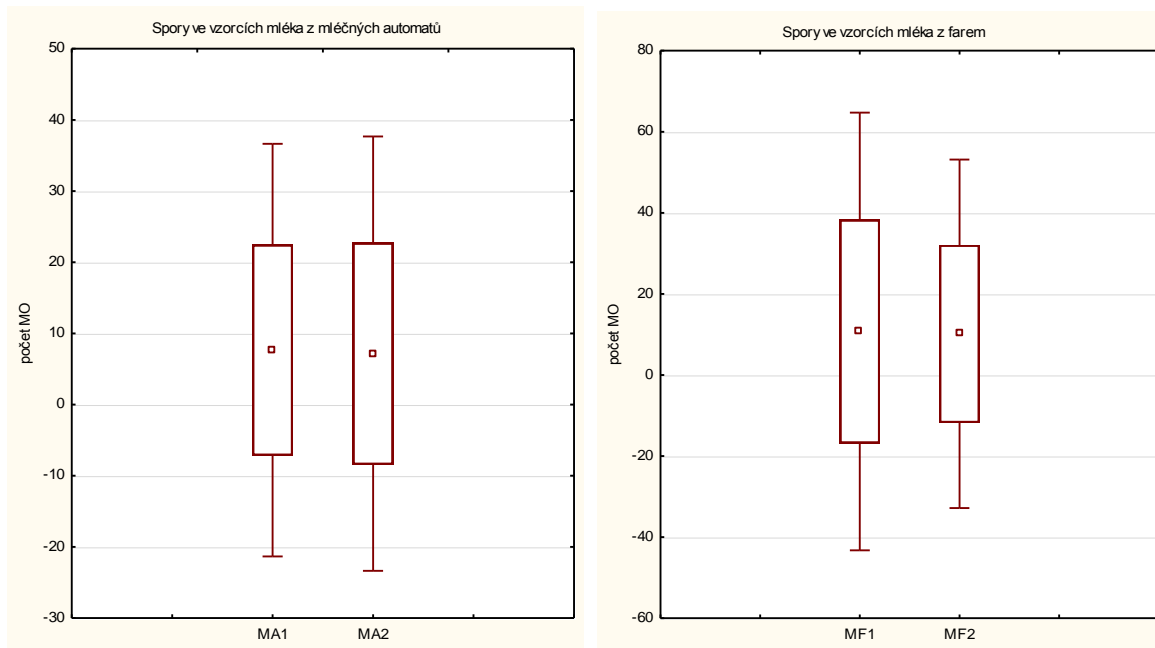
V grafech 5 a 6 jsou zobrazeny stanovení CPM pomocí krabicových grafů. Hodnoty CPM jsou si ve všech vzorcích blízké, průměrná hodnota pro mléčné automaty je $1,40 \times 10^4$ KTJ/ml a průměr pro farmy je $1,45 \times 10^4$ KTJ/ml.

Ve vzorcích z MA1 a MF2 byly popsány větší rozdíly mezi hodnotami. U vzorku MA2 byly hodnoty nejstabilnější, u MF1 byly hodnoty podobně rozdílné jako u MF2.

Grafy 5 a 6: CPM ve vzorcích z mléčných automatů a z farem



Grafy 7 a 8: Spory ve vzorcích z mléčných automatů a z farem

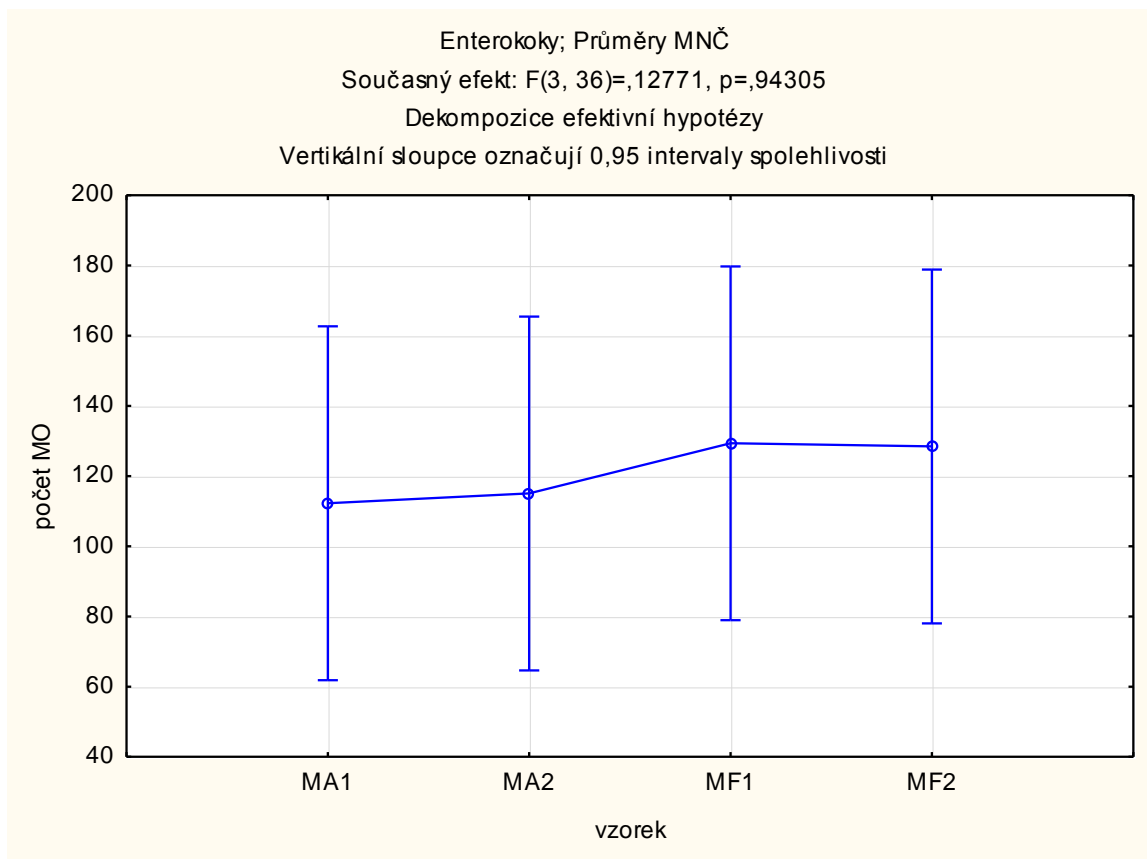


- Průměr
- ▭ Průměr±SmOdch
- Průměr±1,96*SmOdch

Graf 7 znázorňuje krabicovými grafy počet spor ve vzorcích mléka z mléčných automatů a graf 8 počet spor v mléce z farem. Průměrná hodnota je ve všech čtyřech vzorcích $\leq 10^1$ KTJ/ml, pro MA se pohybuje kolem 7,4 KTJ/ml, u MF je průměrná hodnota 10,45 KTJ/ml. Mléka z farem by dosahovala těsněji na hranici limitu, než mléka z mléčných automatů.

Ve vzorcích z MA1 a MA2 jsou velmi podobné odchylky od průměru hodnot. Největší rozdíly mezi hodnotami zobrazuje vzorek MF1. Vzorek MF2 měl hodnoty více stabilní, než MA1, MA2 a MF1, které vykazovaly větší rozdíly.

Graf 9: Enterokoky

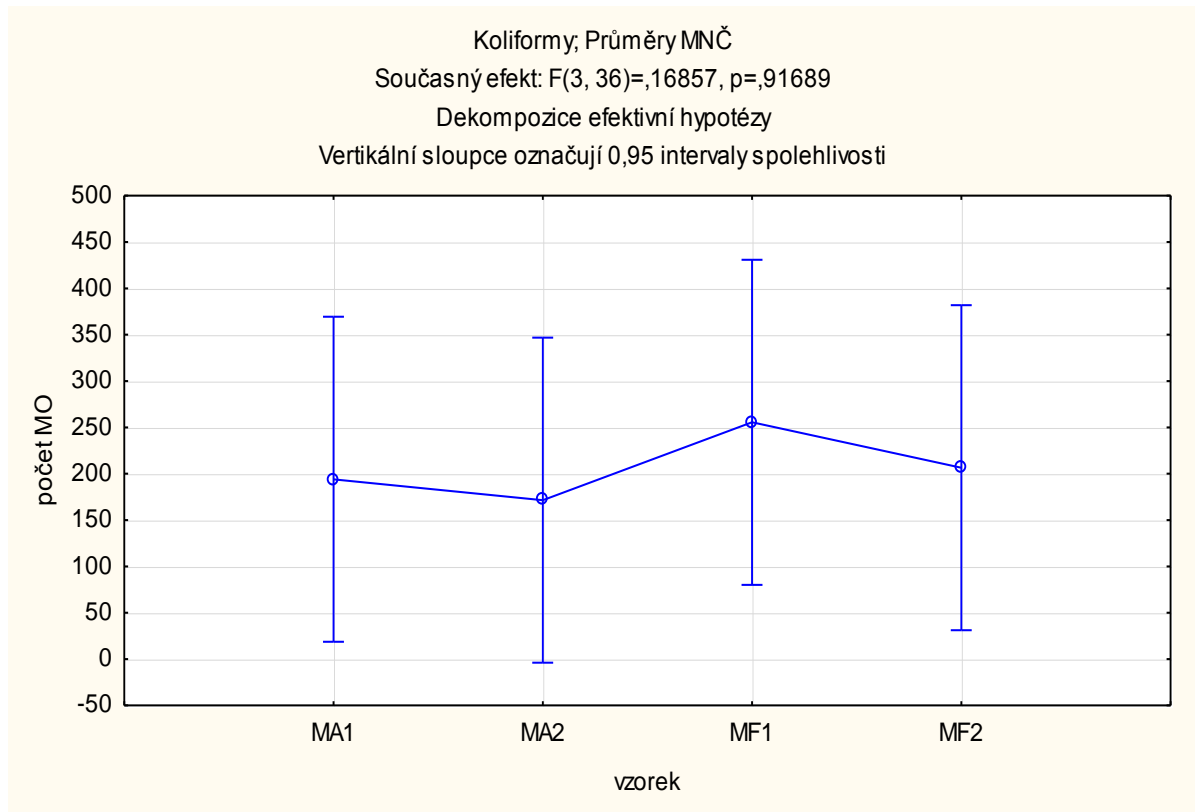


Na grafu 9 můžeme vidět vyhodnocení stanovení enterokoků pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Tento test analyzuje účinek jednoho faktoru na zkoumanou závislou proměnnou. Interval spolehlivosti je 95 %, velikost sloupce zobrazuje rozsah hodnot, do kterého se vejde 95 % měření.

Z grafu 9 je patrné, že průměrné hodnoty enterokoků jsou nejvyšší u vzorku mléka z první farmy (MF1) s počtem $1,29 \times 10^2$ KTJ/ml, velmi podobnou hodnotu má vzorek MF2 $1,28 \times 10^2$ KTJ/ml. Nejnižší počet enterokoků vykazuje mléko z prvního automatu (MA1) s hodnotou $1,12 \times 10^2$ KTJ/ml. Počty enterokoků jsou průměrně vyšší ve vzorcích z farem v porovnání se vzorky z automatů. Jedná se ale o rozdíly v rámci řádu, rozdíl není statisticky významný.

U všech farem i automatů je rozsah pravděpodobnosti (p) velmi podobný, velikost intervalu spolehlivosti je u všech v rámci 1×10^2 KTJ/ml.

Graf 10: Koliformní bakterie



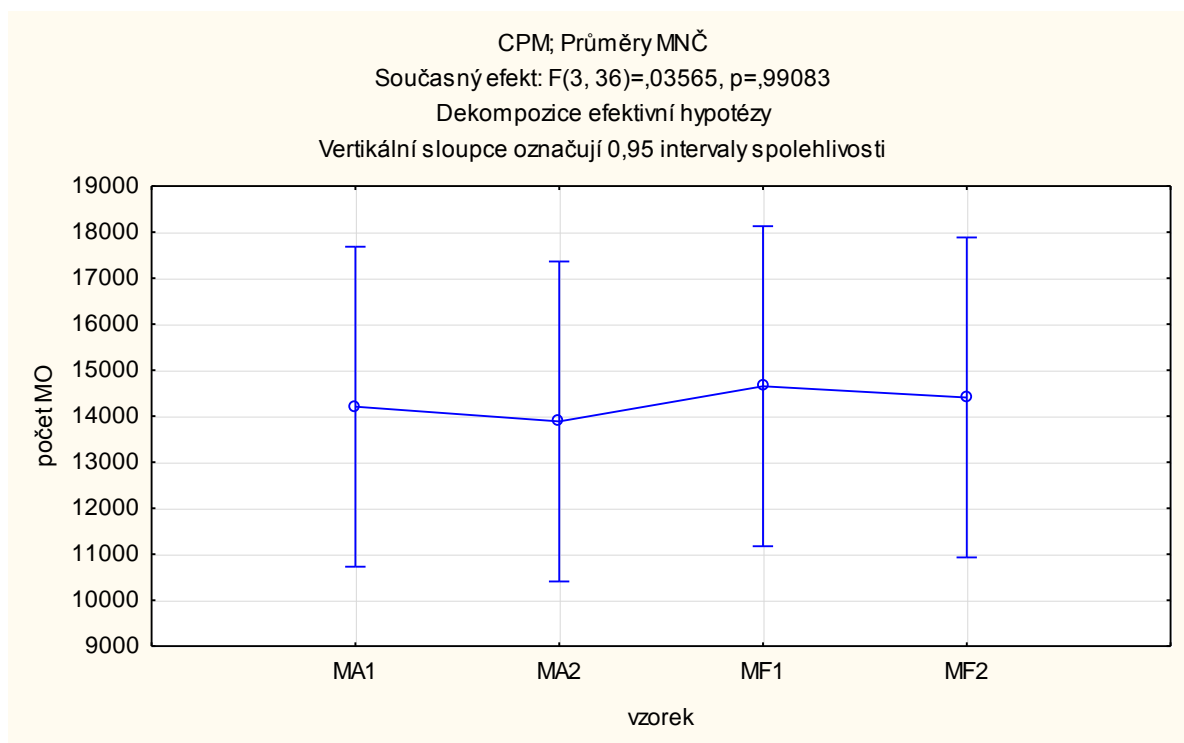
Graf 10 znázorňuje vyhodnocení koliformních bakterií.

Na grafu 10 je možné vidět, že průměrné hodnoty koliformů vykazují nejvyšších hodnot u mléka z první farmy (MF1) s počtem $2,56 \times 10^2$ KTJ/ml. Nejnižší hodnoty jsou zaznamenány u vzorku mléka z druhého automatu (MA2) s hodnotou $1,72 \times 10^2$ KTJ/ml.

U MA1 a MF1 jsou průměrné hodnoty vyšší než u MA2 a MF2. Počty koliformů jsou, stejně jako v předchozím stanovení, průměrně vyšší ve vzorcích z farem v porovnání se vzorky z automatů. Rozdíly nejsou statisticky významné.

U všech farem i automatů je rozsah pravděpodobnosti (p) obdobný.

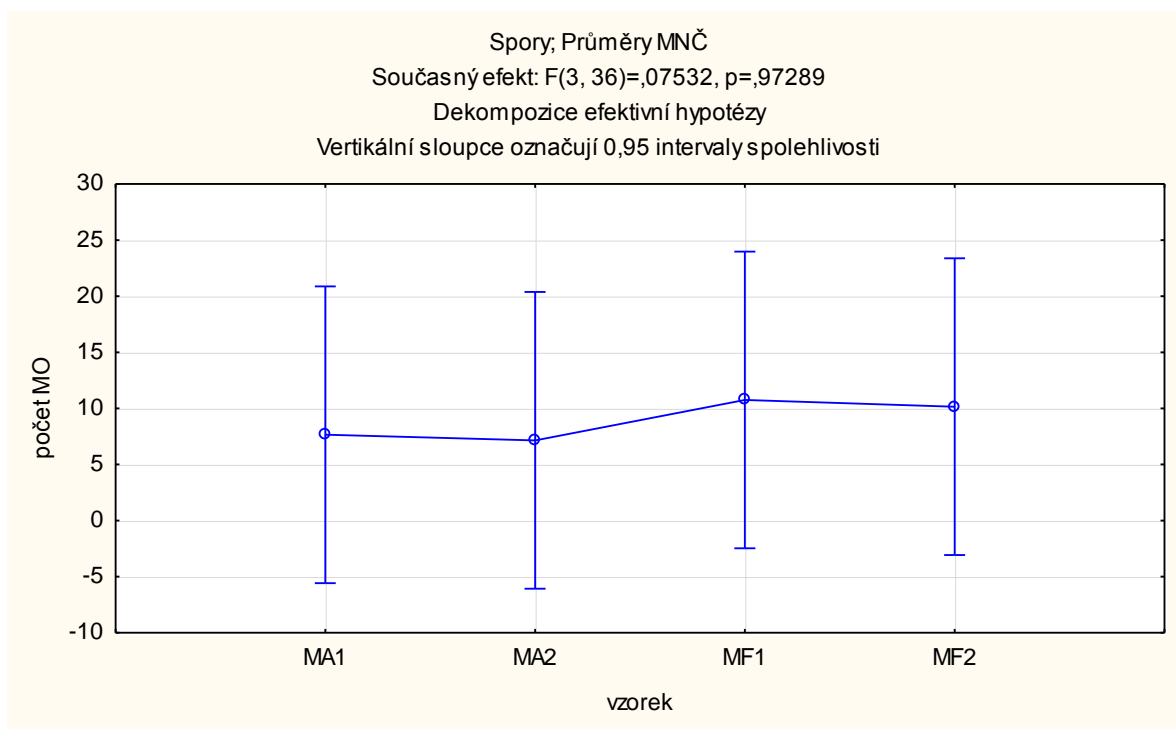
Graf 11: CPM



Průměrné hodnoty CPM jsou znázorněny na grafu 11. Nejvyšších hodnot dosahovalo opět mléko z první farmy (MF1) s hodnotou $1,47 \times 10^4$ KTJ/ml. Nejnižší hodnoty jsou také u mléka z druhého automatu (MA2), a to $1,39 \times 10^4$ KTJ/ml.

U všech vzorků jsou průměrné hodnoty téměř vyrovnané. Obdobně jako u předchozích stanovení, hodnoty CPM jsou průměrně vyšší ve vzorcích z farem, než ve vzorcích z automatů. Ani zde nejsou rozdíly statisticky významné.

Graf 12: Spory



Na grafu 12 můžeme vidět průměrné hodnoty počtu spor. Vyšší průměrné hodnoty byly naměřeny u vzorků mléka z farem (MF) s počty spor na hranici 1×10^1 KTJ/ml. Nižší počet spor vykazují mléka z automatů (MA) s hodnotami kolem 7 KTJ/ml, tedy $< 10^1$ KTJ/ml.

Počty spor jsou průměrně vyšší ve vzorcích z farem v porovnání se vzorky z automatů. Rozdíly nejsou statisticky významné.

6 Diskuze

V rámci této diplomové práce, která navazovala na práci bakalářskou, byly sledovány 4 různé parametry syrového kravského mléka z celkem 4 míst, 2 farem z tzv. přímého prodeje ze dvora a ze 2 mléčných automatů. Stanovenými parametry byly počty enterokoků, koliformních bakterií, celkového počtu mikroorganismů a sporotvorných bakterií.

Ve vzorcích mléka z farmy byly v této diplomové práci naměřeny maximální hodnoty enterokoků $3,72 \times 10^2$ KTJ/ml při sedmém odběru. Počet koliformních bakterií dosáhl vysokých hodnot také při sedmém odběru, maximálně se počty pohybovaly do $1,31 \times 10^3$ KTJ/ml. Stanovení CPM se nacházelo v rozmezí od $2,3 \times 10^3$ do $2,13 \times 10^4$ KTJ/ml. Hodnoty sporotvorných bakterií byly kromě čtvrtého odběru pod limitem $< 10^1$ KTJ/ml.

Meshref (2013) se zabýval mikrobiologickou kvalitou syrového mléka a uváděl výsledky stanovení CPM a koliformních bakterií ze 38 vzorků mléka. Při stanovení CPM bylo dosaženo hodnot v rozmezí $2,1 \times 10^4$ až 4×10^8 KTJ/ml. Stanovení počtu koliformních bakterií, kterým se studie také zabývala, zaznamenala v rozmezí hodnot < 3 do $1,5 \times 10^7$ KTJ/ml. V porovnání s diplomovou prací, kde byly max. hodnoty CPM do $2,61 \times 10^4$ KTJ/ml a počty koliformních bakterií $1,31 \times 10^3$ KTJ/ml, se jedná o hodnoty velmi vysoké.

Také ve studii Němcové et al. (2011) byl stanovován CPM, počet koliformních bakterií a počet enterokoků. V syrovém kravském mléce se hodnota CPM pohybovala kolem $6,4 \times 10^3$ KTJ/ml. Počet koliformních bakterií byl zaznamenán v hodnotách $2,6 \times 10^2$ KTJ/ml. Stanovení hodnoty enterokoků uvádí výsledek $1,7 \times 10^1$ KTJ/ml. V této práci byla hodnota CPM vyšší, ne však výrazněji, než v uváděné studii. Počet koliformních bakterií a enterokoků byl také nalezen vyšší. V případě koliformů ne o mnoho, ve stanovení enterokoků o více než 1 řád.

V rámci studie Pazlarové et al. (2011) byl sledován výskyt koliformních bakterií a enterokoků. Tato studie probíhala v letech 2007 – 2010 a zahrnovala nejen stanovení patogenů v syrovém mléce z farem, ale i z mléčných automatů, k jejichž významnému rozšíření došlo právě v těchto letech. Nejprve se studie zabývala stanovením mikroorganismů ve vzorcích mléka z farem. Syrové mléko z tanku obsahovalo koliformní bakterie v rozmezí hodnot 2×10^1 až $1,5 \times 10^3$ KTJ/ml. Počet enterokoků byl zaznamenán v hodnotách od $1,3 \times 10^4$ do $1,1 \times 10^5$ KTJ/ml. Mléko z tanku z farem v rámci diplomové práce dosahovalo max. hodnot koliformních bakterií $1,31 \times 10^3$ KTJ/ml, tedy téměř shodné se studií. Počet enterokoků byl ve srovnání se studií nižší o min. 2 řády.

Pokračováním studie Pazlarové et al. (2011) byla kromě jiných stanovení také identifikace koliformních bakterií a enterokoků v mléčných automatech. V průběhu 4 měsíců byly odebírány vzorky mléka ze 4 různých mléčných automatů v celkem 20 odběrech. Při stanovení koliformů bylo zjištěno rozmezí jejich počtu < 1 až $2,2 \times 10^1$ KTJ/ml. Zjištěné hodnoty počtu enterokoků se pohybovaly od $< 10^1$ do $2,5 \times 10^3$ KTJ/ml. Diplomová práce také zjišťovala počet koliformních bakterií v mléku z mléčných automatů, s maximem hodnot $8,95 \times 10^2$ KTJ/ml, a počet enterokoků, kde byla hodnota do $2,92 \times 10^2$ KTJ/ml. V porovnání s touto prací, studie zaznamenala nižší hodnoty koliformních bakterií, ale naopak o jeden řád vyšší hodnoty enterokoků.

Ve studii zabývající se identifikací bakteriologické kvality mléka od farmářů až po prodej Kalupahana & Silva-Fletcher (2016) zjistili, že se obsah CPM v syrovém mléce pohyboval v rozmezí 2×10^6 až 3×10^7 KTJ/ml. Hodnota uvedená ve studii je v porovnání s touto prací o několik řádů vyšší.

Mikrobiologickou kvalitou syrového kravského mléka a její potenciální kontaminací se zabývali také Pandey et al. (2014), kteří vyhodnocovali obsah koliformních bakterií a CPM. Zjištěné hodnoty CPM se pohybovaly kolem 4×10^6 KTJ/ml a obsah koliformů byl $4,6 \times 10^3$ KTJ/ml. Naměřené max. hodnoty CPM v diplomové práci byly $2,61 \times 10^4$ KTJ/ml, tedy o mnoho řádů nižší, stejně jako obsah koliformních bakterií vyšší v rámci řádu.

CPM také uváděli Bonfoh et al. (2006), jejichž naměřené hodnoty se pohybovaly od $4,8 \times 10^5$ do $1,6 \times 10^7$ KTJ/ml. Rovněž byly hodnoceny koliformy a enterokoky, kde autoři zjistili hodnoty v rozmezí $1,1 \times 10^4$ až $1,1 \times 10^6$ KTJ/ml.

Silva et al. (2016) se zabývali stanovením CPM. Z jednoho regionu bylo náhodně vybráno 5 ze 13 chladících center a z nich odebrány vzorky z chladících tanků na mléko. Před zavedením správné praxe managementu (Good Management Practices) se hodnoty CPM pohybovaly v úrovni před 10^7 KTJ/ml. Po implementaci nové praxe byly výsledné hodnoty již v rozmezí do 10^6 KTJ/ml. Hodnoty CPM jsou v porovnání s diplomovou prací vyšší o 3, resp. 2 řády.

Podle studie Smigic et al. (2012) bylo zjištěno, že použití systému HACCP má významný vliv na snížení kontaminace mléka. Během 4 let bylo testováno 45 600 vzorků syrového mléka se závěrem, že hodnota CPM byla zredukována z hodnoty přesahující 10^3 na počet pod 10^2 KTJ/ml během 8 měsíců po zavedení systému HACCP.

Millogo et al. (2010) uvádějí jako zdroj kontaminace syrového kravského mléka vliv suché a deštivé sezóny. Byly odebrány vzorky individuálně přímo od dojníc, z tanků z farem,

z konví na mléko, z tanků na zpracování mléčných výrobků a z lokálních trhů. Výsledky ukázaly, že nižší počty CPM (pod 10^4 KTJ/ml) byly nalezeny ve vzorcích od dojníc než vzorky z dalšího zpracování. Celkový počet mikroorganismů ve vzorcích mléka z farmy byl 10^6 KTJ/ml, vzorky z konví na mléko, z tanků na zpracování mléčných výrobků a z lokálních trhů obsahovaly 10^7 KTJ/ml. V porovnání s diplomovou prací, hodnoty CPM z mléka z farmy dosahovaly max. 10^4 KTJ/ml. Nízké počty CPM jak ve studii, tak v této práci mohou být způsobeny minimem podílu lidské práce.

Stanovením počtu sporotvorných bakterií se zabývali Coorevits et al. (2008). Porovnávali celkem 930 vzorků syrového mléka z 10 konvenčních a ekologických farem v letním a zimním období a byla posuzována přítomnost sporotvorných bakterií. Byly prokázány bakterie rodu *Bacillus* sp. a jejich spory se nacházely ve všech vzorcích, od hodnot < 2 až do 144 KTJ/ml. Méně spor se ve vzorcích nacházelo v zimním období. V rámci této práce byly nalezeny spory v nižších počtech, od 0 do 89 KTJ/ml. Hodnoty v obou pracích jsou si podobné.

Suelam et al. (2016) sledovali 153 vzorků syrového mléka a v 61 z nich (39,9 %) byl přítomen sporotvorný *Bacillus cereus*. Také ve studii Páčová et al. (2003) testovali 56 vzorků syrového mléka a ve všech potvrdili přítomnost rodu *Bacillus* sp.

Giffel & Beumer (1998) identifikovali spory produkované *Bacillus cereus* ve vzorcích syrového mléka z farem, a to v 35 % případů. Během zimy, kdy dojnice byly ustájeny uvnitř, se kontaminace zvýšila z důvodu většího znečištění mléčné žlázy.

Také studie Lückinga et al. (2013) vyhodnotila panel 467 vzorků a přítomnost spor v nich. Zjistila přítomnost termorezistentních spor přežívajících teploty nad $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut v jedné třetině vzorků, méně byly také nalezeny bakterie produkující vysoce termorezistentní spory odolné vůči teplotě $125\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut.

Tato diplomová práce také sledovala vzorky mléka z mléčných automatů. Zaznamenány byly hodnoty pro stanovení enterokoků dosahující maxima při sedmém odběru $2,92 \times 10^2$ KTJ/ml. Při stanovení koliformů bylo dosaženo nejvyšších hodnot rovněž při sedmém odběru, a to ve vzorku mléka z prvního automatu s hodnotou $8,95 \times 10^2$ KTJ/ml. Hodnoty koliformních bakterií se vzájemně mezi sebou nelišily výrazně, s výjimkou sedmých odběrů. Tato skutečnost mohla být způsobena abnormálně vysokými letními teplotami.

CPM u vzorků z mléčných automatů byl v průměru $1,42 \times 10^4$ a $1,39 \times 10^4$ KTJ/ml. V obou automatech byly hodnoty CPM nejnižší v prvním odběru. V ostatních případech odběrů se hodnoty výrazně nelišily.

Ve studii Kučerové et al. (2009) byla zjištěna v syrovém mléce populace enteroků v rozmezí $1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$ KTJ/ml. V diplomové práci se hodnoty CPM pohybovaly v nižších hodnotách, max. $2,61 \times 10^4$ KTJ/ml.

Další studií, která řeší výskyt enterokoků v syrovém mléce, se zabývali Fabianová et al. (2011). Naměřené hodnoty v syrovém mléce se pohybovaly kolem $6,5 \times 10^5$ KTJ/ml. Což je vyšší hodnota, než počet zjištěný v rámci této práce.

Mikrobiologickou kvalitou syrového mléka v Jihomoravském kraji se zabývala studie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně (Bogdanovičová & Chmelař 2014). Poukázala na rozdílnou kvalitu mléka v závislosti na konkrétní farmě, odkud mléko pocházelo. Studie testovala 30 vzorků mléka, z toho 10 vzorků z mléčných automatů na obsah CPM a enterokoků. Při stanovení CPM zjistila překročení povoleného obsahu KTJ/ml v jednom případě a ve vzorcích mléka z jedné farmy identifikovala několikrát vysoké množství enterokoků.

V rámci další studie na téma kvality mléka z jihomoravských mléčných automatů Bogdanovičová et al. (2015) sledovali parametry pro syrové kravské mléko. Celkem bylo odebráno 45 vzorků mléka z 9 mléčných automatů a zjišťováno stanovení enterokoků, koliformních bakterií a CPM. Na základě výsledků byly zaznamenány hodnoty pro počet enterokoků v rozmezí $1,3 \times 10^1$ až $3,6 \times 10^2$ KTJ/ml, v letním období nebyly počty enterokoků zvýšeny, z toho lze usuzovat, že režim chlazení mléka v automatech byl adekvátně vyhovující v průběhu celého roku. Ve srovnání s diplomovou prací byly hodnoty enterokoků v mléce z mléčných automatů $2,92 \times 10^2$ KTJ/ml, což jsou hodnoty velmi podobné v uvedené studii. Přítomnost koliformních bakterií byla nalezena v 93,3 % vzorků. Při stanovení koliformních bakterií se hodnoty pohybovaly v rozmezí $1,0 \times 10^0$ až $5,6 \times 10^3$ KTJ/ml. Maximální počty koliformních bakterií v mléce z automatů byly v této práci zaznamenány $8,95 \times 10^2$ KTJ/ml, v mléce z farem $1,31 \times 10^3$ KTJ/ml. Ve stanovení CPM byly zaznamenány hodnoty v rozmezí $8,1 \times 10^3$ až $2,4 \times 10^5$ KTJ/ml. V létě nebyly hodnoty CPM v porovnání s chladnějšími měsíci roku zvýšeny. V rámci diplomové práce byly hodnoty CPM z mléčných automatů v rozmezí $3,6 \times 10^3$ až $2,61 \times 10^4$ KTJ/ml, tedy zhruba o jeden řád vyšší.

Karpíšková et al. (2011) se také zabývali výskytem patogenních bakterií v mléce z mléčných automatů. Bylo odebráno 219 vzorků mléka z 27 mléčných automatů pocházejících z 15 farem ve třech krajích ČR. Tato studie zjistila přítomnost některých patogenů ve 145 vzorcích mléka z celkových 219 (66,2 %).

Studie Cempírkové (2002) zjišťovala přítomnost sporotvorných bakterií a také stanovovala CPM. V souboru 144 vzorků mléka bylo zahrnuto také stanovení počtu psychrotrofních bakterií včetně sporotvorných bakterií v rozsahu $0,7 \times 10^3$ až $6,48 \times 10^4$ KTJ/ml a CPM v hodnotách 5×10^3 až $4,24 \times 10^6$ KTJ/ml. Na rozdíl od diplomové práce jsou hodnoty spor ve studii několikanásobně vyšší, výsledky CPM jsou také o 2 řády vyšší.

Sutherland & Murdoch (1994) se zabývali přítomností sporotvorných bakterií v syrovém mléce. Během 10 měsíců bylo měsíčně odebíráno po 3 vzorcích syrového mléka z 5 farem, 5 tanků na mléko a z 5 mléčných zásobních sil. Výsledkem bylo zjištění nízkého počtu spor v rozmezí 0 až $9,65 \times 10^2$ KTJ/ml. Nejvyšší počty spor byly nalezeny v mléce v zimním období, naopak nejnižší v létě. Výsledky stanovení spor v diplomové práci se pohybovaly do max. hodnot $8,9 \times 10^1$ KTJ/ml.

Obsah CPM byl zjišťován v rámci hodnocení jakosti syrového mléka (Smetana et al. 2009), jehož hodnoty byly sledovány v průběhu roku. Bylo naměřeno rozmezí hodnot 3×10^4 až 6×10^4 KTJ/ml. V porovnání s touto studií dosahují výsledky stanovení CPM v diplomové práci na spodní hranici CPM uvedené ve studii.

Stanovení CPM bylo také sledováno ve studii Vliv chladírenských teplot na růst a proteolytickou činnost mikroorganismů syrového mléka (Chramostová et al. 2014).

Seydlová & Snášelová (2010) v rámci studie Současný stav mikrobiologické a bakteriologické kvality syrového mléka určovaly stanovení obsahu koliformů, enterokoků a spor. Z celkových 90 vzorků byly koliformní bakterie identifikovány v 67 % vzorků, enterokoky v 55 % vzorků a spory ve 45 % případů vzorků. Koliformní bakterie byly zjištěny v rozmezí hodnot $< 1 \times 10^2$ až $> 7 \times 10^2$ KTJ/ml. V porovnání s diplomovou prací byly počty koliformních bakterií do max. $1,31 \times 10^3$ KTJ/ml. Spory nebyly prokázány v žádném ze vzorků. To, že nebyly nalezeny, v protikladu k ostatním patogenním mikroorganismům, mohlo svědčit o velmi dobrém sanitačním procesu na farmě. V rámci diplomové práce byly zjištěny spory $< 10^1$ KTJ/ml, pouze v jednom odběru byly zjištěny hodnoty do max. 8×10^1 KTJ/ml.

Studie Vyleťlové et al. (2011) se také zabývala mikrobiologickou kvalitou mléka z jesenických mléčných automatů. Byly sledovány vzorky syrového mléka ze dvou mléčných

automatů, z každého automatu 24 vzorků, ve kterých probíhalo stanovení CPM, koliformních bakterií a spor. V rámci těchto stanovení byly naměřeny výsledky hodnoty CPM 8×10^3 až 9×10^3 KTJ/ml, počty koliformů se pohybovaly v rozsahu 6 až 7×10^1 KTJ/ml. Obsah sporotvorných bakterií byl identifikován v 11 vzorcích a pohyboval se v hodnotách 2 až 3×10^1 KTJ/ml. Výsledky stanovení CPM v mléce z mléčných automatů v diplomové práci se pohybovaly do max. $2,61 \times 10^4$ KTJ/ml, stanovení počtu koliformních bakterií bylo zjištěno v maximální hodnotě $8,95 \times 10^2$ KTJ/ml a obsah sporotvorných bakterií byl pouze v jednom odběru max. $5,1 \times 10^1$ KTJ/ml, v ostatních případech $< 10^1$ KTJ/ml. V této diplomové práci tedy byly zjištěny vyšší hodnoty, než ve studii, ale mléko stále splňovalo všechny limity požadované legislativou.

Z výsledků vyplývá, že limit pro CPM pro syrové kravské mléko udávaný Nařízením č. 853/2004 Sb. s hodnotou $\leq 10^5$ KTJ/ml, byl ve všech vzorcích splněn. Stejně jako u vzorků mléka z farem, i hodnoty sporotvorných bakterií ve vzorcích mléka z mléčných automatů byly pod limitem $< 10^1$ KTJ/ml. Ve čtvrtém odběru jako u mléka z farmy byly zaznamenány vyšší hodnoty. Příčinou mohl být vliv letního počasí s vysokými teplotami.

Rozdílné hodnoty stanovení ve vzorcích mléka z mléčných automatů a této diplomové práce mohly být způsobeny rozdílnou úrovní hygieny dodržované při výrobě mléka. Dále je také možným důvodem stále vysoký počet kontrol na prodej syrového mléka z automatů a s tím spojené dodržování limitů pro výskyt mikroorganismů.

Ve stupni kontaminace může hrát významnou roli lidský faktor a dodržování hygienických opatření při manipulaci s mlékem.

Syrové mléko je doporučováno před konzumací tepelně ošetřit, čímž se výrazně sníží obsah kontaminantních bakterií a je tedy bezpečné pro konzumaci.

Mléko je mikrobiologicky kvalitní a nemůže ohrozit zdraví člověka.

7 Závěr

- V rámci této diplomové práce byla sledována mikrobiologická kvalita syrového kravského mléka ze dvou mléčných automatů a ze dvou přímých prodejů z farmy. Sledovanými parametry byl počet enterokoků, počet koliformních bakterií, celkový počet mikroorganismů a počet sporotvorných bakterií.
- Všechny odběry splňovaly normu ČSN 570529 pro stanovení enterokoků a koliformních bakterií, která uváděla max. povolený limit 10^3 KTJ/ml. Tato norma byla zrušena bez náhrady. Maximální počet enterokoků u mléka z automatů dosahoval $2,92 \times 10^2$ KTJ/ml a maximální hodnota koliformních bakterií byla $8,95 \times 10^2$ KTJ/ml. Mléka z automatů vyhověla také CPM, nejvyšší zjištěná hodnota $2,61 \times 10^4$ KTJ/ml byla pod limitem 10^5 KTJ/ml, který stanovuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 Sb. Norma ČSN 570529 pro spory požadovala negativní sporotvorné anaerobní bakterie v 0,1 ml mléka, čehož bylo dosaženo ve všech odběrech, kromě jednoho. Vzorky mléka z automatů se ve všech stanoveních mezi sebou v průběhu roku příliš nelišily.
- Vzorky mléka z farem z přímého prodeje téměř všechny vyhověly legislativním požadavkům. V případě normy splnily limit pro enterokoky, s max. zjištěnou hodnotou $3,72 \times 10^2$ KTJ/ml. Limit pro koliformy byl překročen v jednom odběru, s hodnotou $1,31 \times 10^3$ KTJ/ml, ostatní odběry splnily normu. Maximální zjištěný CPM byl $2,13 \times 10^4$ KTJ/ml, limit Nařízení č. 853/2004 Sb. nebyl překročen. Sporotvorné bakterie v jednom odběru (čtvrtém) překročily limit normy, podobně jako u mléčných automatů. Avšak ve všech ostatních odběrech bylo dosaženo hodnot $< 10^1$ KTJ/ml.
- Syrové mléko z mléčných automatů bylo mikrobiálně kvalitnější než z farem z přímého prodeje. Mléko splňovalo požadavky normy ČSN 570529 i Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 Sb.

8 Seznam literatury

- Ball DM et al. 2004. Vliv kvality krmiv na produkci a zdravotní nezávadnost mléka a masa. Jihočeská univerzita, České Budějovice.
- Bogdanovičová K, Chmelař P. 2014. Mléko v jihomoravských automatech je bezpečné, ale až po převaření. *Via Universitatis* **7**:17.
- Bogdanovičová K, Šťátková Z, Vyletělová-Klimešová M, Karpíšková R. 2015. Mikrobiologická kvalita mléka z jihomoravských mléčných automatů. *Mlékařské listy* **151**:1–3.
- Bonfoh B, Roth C, Traoré AN, Fané A, Simbé CF, Alfaroukh IO, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J. 2006. Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali). *Food Control* **17**:153–161.
- Cempírková R. 2002. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. *Veterinární Medicína* **47**:227–233.
- Cempírková R. 2004. Vliv životních podmínek dojnic na mikrobiální jakost mléka. Collection of Scientific Papers, Faculty of Agriculture in České Budějovice: Series for Animal Sciences. Special Issue: Agroregion **21**:101–104.
- Červenka J, Foltýn I, Kopeček P, Jarolímek J. 2005. Výroba, jakost a obchod s mlékem v podmínkách EU II. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Chramostová J, Rubina N, Šedivcová V, Dragoun M, Němečková I, Roubal P. 2014. Vliv chladiřských teplot na růst a proteolytickou činnost mikroorganismů syrového mléka. *Mlékařské listy* **146**:10–13.
- Claeys WL et al. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* **31**:251–262.
- Coorevits A, De Jonghe V, Vandroemme J, Reekmans R, Heyrman J, Messens W, De Vos P, Heyndrickx M. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology* **31**:126–140.
- ČSÚ. 2016. Spotřeba potravin - Spotřeba mléka a mléčných výrobků v hodnotě mléka (na obyvatele za rok). ČSÚ, Praha. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2016> (accessed March 2019).
- Dolejš J, Toufar O, Doležal O, Knížek J. 2003. Tepelný stres ohrožuje naše chovy dojnic. *Agromagazín* **4**:46–49.
- EFSA. 2012. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. Parma.
- EFSA. 2015a. Raw drinking milk: what are the risks? Parma.
- EFSA. 2015b. Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. Parma.

- Fabianová J, Ducková V, Čanigová M, Kročko M, Gábor M. 2011. In vitro testing of the sanitary solutions effect for the Enterococci survival. *Potravinářstvo* **5**:123–128.
- Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ. 2006. Gram-positive pathogens. ASM Press, Washington.
- Forsythe SJ. 2010. The microbiology of safe food. Wiley – Blackwell, Chichester.
- Gajdůšek S. 2003. Laktologie. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.
- Giffel te M, Beumer R. 1998. Isolation, identification and characterization of *Bacillus cereus* in the dairy industry. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* **123**:628–632.
- Görner F, Valík L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatín. Malé Centrum, Bratislava.
- Harding F. 1995. Milk quality. Springer US, Boston.
- Hasoňová L, Beerová M, Samková E. 2016. Chováme se k mléku správně? Průzkum spotřebitelského chování při zacházení se syrovým kravským mlékem. *Mlékařské listy* **157**:13–18.
- Heller K. 2004. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. Wiley – Blackwell, Chichester.
- Hennekine SM. 2003. European screening method of the CRL milk. *Journal of AOAC International* **86**:10–15.
- Hlaváček J. 2010. Nový fenomén: Automaty na mléko. *Kroměřížské mlékařské dny*:25–28.
- Jedlička M. 2005. Jednotný pohled na kvalitu mléka. *Náš chov*, Praha. Available from <https://www.naschov.cz/jednotny-pohled-na-kvalitu-mleka/> (accessed March 2019).
- Ježková A. 2008. Základní zásady zoohygieny při dojení. *Náš chov* **68**:53–54.
- Kalupahana R, Silva-Fletcher A. 2016. A participant - Led programme for field veterinary training to identify bacteriological quality of milk from the farmer to the retail outlet. *Food Control* **63**:128–134.
- Karpíšková R, Koláčková I, Vyletěllová M, Janštová B. 2011. Studie „Mléčné automaty“ – nálezy původců alimentárních onemocnění v syrovém mléce. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie* **20**:212–214.
- Klaban V. 1999. Svět mikrobů. Malý mikrobiologický slovník. Gaudeamus, Hradec Králové.
- Kopáček J. 2010. Byla krize v mlékárenství již překonána? Jaké jsou další výhledy mlékárenského sektoru? *Kroměřížské mlékařské dny*:11–16.
- Kopáček J et al. 2004. Návod pro správné techniky zemědělského chovu mléčných zvířat. FAO and International Dairy Federation, Řím.
- Kouřimská L, Babička L, Poustková I. 2006. Bezpečnost potravin a systém HACCP při faremním získávání mléka. Strany 21–30 in L. Babička a L. Kouřimská, editoři. Praktikum pro faremní zpracovatele mléka (Seminar pro praxi) Hygienické požadavky na faremní zpracování mléka. Česká zemědělská univerzita, Praha.

- Krátký J. 2007. Jak správně čistit struky. *Náš chov* **67**:102–103.
- Kučerová K, Svobodová H, Tůma Š, Ondráčková I, Plocková M. 2009. Production of Biogenic Amines by Enterococci. *Czech Journal of Food Sciences* **27**:50–55.
- Kunová G, Pechačová M, Jaglič Z, Pazlarová J, Roubal P. 2011. Biofilmy a hygiena výroby v mlékárenských provozech. *Mlékařské listy* **127**:19–22.
- Kurki J. 2004. Experiences of HACCP in milk establishments. DG SANTE - DG Health and Food Safety, Brussel.
- Lücking G, Stoeckel M, Atamer Z, Hinrichs J, Ehling-Schulz M. 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* **166**:270–279.
- Marth EH, Steele JL. 2001. *Applied dairy microbiology*. CRC Press, New York.
- Meshref AMS. 2013. Bacteriological quality and safety of raw cow's milk and fresh cream. *Slovenian Veterinary Research* **50**:21–33.
- Metaal R. 2004. HACCP - principles in food industry, HACCP training course. DG SANTE - DG Health and Food Safety, Brussel.
- Mezera J, Mejstříková L. 2011. Strukturální a ekonomické aspekty mlékárenského oboru v ČR. Ústav zemědělské ekonomiky a informací (ÚZEI), Praha.
- Millogo V, Svennersten Sjaunja K, Ouédraogo GA, Agenäs S. 2010. Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso. *Food Control* **21**:1070–1074.
- MZe. 1997. Zákon č. 110/1997 o potravinách. Praha.
- MZe. 2004. Vyhláška č. 161/2004 Sb. zákona o potravinách. Praha.
- MZe. 2007. Vyhláška č. 289/2007 Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. Praha.
- Navrátilová P, Králová M, Janštová B, Přidalová H, Cupáková Š, Vorlová L. 2012. Hygiena produkce mléka. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno.
- Němcová M, Kalhotka L, Fišerová H. 2011. Metabolická aktivita vybraných mikroorganismů v kravském a kozím mléce. *Mlékařské listy* **125**:10–14.
- Nero L, de Carvalho AF. 2018. *Raw milk - Balance between hazards and benefits*. Academic Press, Vicosa, Brazil.
- Neubeck von M, Baur C, Krewinkel M, Stoeckel M, Kranz B, Stressler T, Fischer L, Hinrichs J, Scherer S, Wenning M. 2015. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology* **211**:57–65.
- Páčová Z, Švec P, Stenfors LP, Vyletělová M, Sedláček I. 2003. Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech Journal of Animal Science* **48**:93–96.

- Palánová B, Stávková J, Lefnerová D, Matějová H. 2016. Mikrobiologická rizika z potravin během těhotenství. *Výživa a potraviny* **1**:15–18.
- Pandey N, Kumari A, Varma AK, Sahu S, Akbar MA. 2014. Impact of applying hygienic practices at farm on bacteriological quality of raw milk. *Veterinary World* **7**:754–758.
- Pazlarová J, Demnerová K, Růžičková H, Roubal P, Němečková I, Karpíšková R. 2011. Mikrobiologická rizika v mlékárenských výrobcích - detekce patogenních bakterií. *Mlékařské listy* **128**:7–10.
- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* **37**:664 – 698.
- Rada evropských společenství. 1992. Směrnice Rady 92/46/EHS o hygienických předpisech pro produkci syrového mléka, tepelně ošetřeného mléka a mléčných výrobků a jejich uvedení na trh. Brusel.
- Roginski H et al. 2002. *Encyclopedia of dairy science*. Academic Press, London.
- Ryšánek D, Babák V. 2005. Bulk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. *Journal of Dairy Research* **72**:400–405.
- Samková E, Daniel R, Hasoňová L, Smetana P. 2011. Problematika prodeje syrového kravského mléka z pohledu spotřebitelů. *Mlékařské listy* **127**:10–14.
- Seydlová R. 2010. Hygienická kvalita mléka v ekologických chovech ČR. *Mlékařské listy* **123**:7–9.
- Seydlová R, Snášelová J. 2010. Současný stav mikrobiologické a bakteriologické kvality syrového mléka. *Mlékařské listy* **121**:31–35.
- Silva de SASD, Kanugala KANP, Weerakkody NS. 2016. Microbiological Quality of Raw Milk and Effect on Quality by Implementing Good Management Practices. *Procedia Food Science* **6**:92–96.
- Smetana P, Hlaváček J, Mrázek J, Samková E, Pospíšil M, Rozsypal R, Trávníček P. 2009. Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství. Kvalita mléka, hygienické požadavky na jeho zpracování, přímý prodej mléka. *Zásady ekologického chovu skotu, ovčí a koz*. Bioinstitut, Olomouc.
- Smigic N, Djekic I, Tomasevic I, Miocinovic J, Gvozdenovic R. 2012. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. *Food Control* **25**:728–731.
- Suelam IIA, Merwad AMA, Mohamed MEM. 2016. Molecular profile of some *Bacillus cereus* strains isolated from milk with reference to its susceptibility to lysozyme. *Japanese Journal of Veterinary Research* **64**:103–108.
- Sun D-W. 2012. *Handbook of food safety engineering*. Wiley – Blackwell, Chichester.
- Šustová K, Sýkora V. 2013. *Mlékárenské technologie*. Mendelova univerzita, Brno.
- Sutherland AD, Murdoch R. 1994. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in

- raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International Journal of Food Microbiology* **21**:279–292.
- SVS. 2018. Registrované subjekty - pro přímý prodej - prodejci syrového mléka. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from <https://www.svs.cz/prodejci-syroveho-mleka/> (accessed December 2018).
- SZIF. 2016. Zpráva o trhu s mlékem a mléčnými výrobky. Tržní informační systém ČR. Státní zemědělský intervenční fond, Praha.
- Tamime AY. 2009. *Milk Processing and Quality Management*. Wiley – Blackwell, Chichester.
- Ticháček A, Bjelka M, Hanuš O, Kopunecz P, Olejník P, Pavlata L, Pechová A, Ponížil A. 2007. Poradenství jako nástroj bezpečnosti v prvovýrobě mléka. Agritec, Šumperk.
- Voldřich M, Čerovský M, Cahlíková N, Demnerová K, Pazlarová J, Hajšlová J. 2000. Zavádění systému kritických bodů (HACCP). ÚZPI, Praha.
- Voldřich M, Jechová M, Kaudelová M. 2004. Systém kritických bodů (HACCP) v obchodě. České a slovenské odborné nakladatelství, Praha.
- Vorlová L. 2010. Automaty na mléko v ČR. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. Available from <https://www.vetweb.cz/automaty-na-mleko-v-cr/> (accessed March, 2019).
- Vranješ AP, Popovic M, Jevtic M. 2015. Raw milk consumption and health. *Serbian Archives of Medicine* **143**:87–92.
- Vyletělová M. 2000. Bakteriální kontaminace ve vztahu k některým složkám syrového a pasterovaného mléka. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o., Rapotín. Available from <http://www.agris.cz/clanek/109749> (accessed March 2019).
- Vyletělová M, Roubal P, Karpíšková R, Vlková H, Hanuš O, Bubíková M. 2011. Mikrobiologická kvalita mléka z jesenických mléčných automatů. *Mlékařské listy* **126**:18–21.
- Weeks BS, Alcamo EI. 2007. *Microbes and Society*. Jones & Bartlett Learning, London.
- Zejdová P, Chládek G, Falta D. 2014. Vliv stájového prostředí na chování a mléčnou užitkovost dojníc. Mendelova univerzita, Brno.
- Zelinková G. 2007. Mastitidy v novém světle. *Náš chov* **67**:64–68.