

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mikrobiologická kvalita buvolího mléka**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Matylda Malá**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Veronika Legarová, Ph.D.**

**Konzultant práce: Ing. Tereza Kodešová**

© 2022 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikrobiologická kvalita buvolího mléka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Legarové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady v průběhu psaní diplomové práce. Dále velmi děkuji Ing. Tereze Kodešové za trpělivost a pomoc při zpracování praktické části. Současně děkuji všem blízkým za podporu během celého studia.

# Mikrobiologická kvalita buvolího mléka

## Souhrn

Po kravském mléce patří buvolí k nejprodukovanějším mlékům světa. Jedním z důvodů zvyšujícího se zájmu může být i stoupající počet lokalit vhodných pro chov buvolů zapříčiněn klimatickými změnami. Lze předpokládat, že s větším počtem chovaných buvolů bude stoupat i zastoupení buvolího mléka a mléčných výrobků na spotřebitelské půdě. Nicméně s narůstající poptávkou je důležité i kontrolovat kvalitu daných výrobků, přičemž za některé z parametrů sledovaných u mléka a mléčných výrobků zodpovídají mikroorganismy.

V rámci diplomové práce bylo analyzováno 10 směsných vzorků buvolího mléka v průběhu 4 měsíců získaného z české farmy nedaleko Příbrami, která chová buvoly za ekologických podmínek. Pomocí plotnových kultivačních metod byly stanovovány počty a průkaznost jednotlivých mikroorganismů, které se často sledují v souvislosti s mikrobiologickou kvalitou kravského mléka. Sledoval se počet CPM, *Escherichia coli*, koliformních bakterií, bifidobakterií, bakterií mléčného kvašení, laktobacilů, kvasinek, plísní, stafylokoků a *Staphylococcus aureus*. Současně probíhala analýza patogenních bakterií rodu *Salmonella* a *Listeria*, u kterých byly použity metody průkazu. Pro zjištění převládající mikrobioty byla pokaždé prováděna kvasná zkouška.

Průměrný počet CPM činil  $4,1 \cdot 10^3$  KTJ/mL, přičemž nepřesahoval limit stanovený legislativou ( $\leq 500\,000$  KTJ/mL) pro jiné než kravské mléko, a dokonce by se dle limitů pro kravské mléko dal zařadit mezi I. třídu jakosti. Koliformní bakterie byly sledovány v průměrném počtu 2 KTJ/mL, což by odpovídalo v minulosti stanoveným, ale již nenahrazeným limitům pro kravské mléko. V malém množství  $2,0 \cdot 10^1$  KTJ/mL byly sledovány i kvasinky a plísně, přičemž nedošlo k překročení maximálního limitu. Ačkoliv by BMK měly zastávat majoritní mikrobiotu, v této práci byly zjištěny v průměrném množství  $9,9 \cdot 10^1$  KTJ/mL. S tím související zastoupení laktobacilů s průměrnou hodnotou  $<1,00$  KTJ/mL dosahovalo velmi nízkých hodnot. Rod *Bifidobacterium* spp., který by v syrovém mléce neměl být přítomen z důvodu možného fekálního znečištění, byl detekován jedenkrát v množství  $2,5 \cdot 10^4$  KTJ/mL. *E. coli*, salmonely a listerie nebyly detekovány vůbec, což je v souladu s legislativou. V průměrném zastoupení  $2,4 \cdot 10^2$  KTJ/mL byly zjištěny stafylokoky, pro které není stanoven legislativní limit. Jejich patogenní zástupce *Staphylococcus aureus* byl během 3 odběrů detekován, ale pouze jednou potvrzen Staphylase testem jako koagulázopozitivní v množství  $1,3 \cdot 10^2$  KTJ/mL. Na základě kvasné zkoušky byla zjištěna převaha kyselinotvorných mikroorganismů v zimních měsících roku 2021 a s nástupem nového roku proteolytických mikroorganismů.

Mikrobiologická kvalita zkoumaného buvolího mléka by se dala posoudit jako příznivá z hlediska zjištěných kvantitativních i kvalitativních stanoveních daných paramterů. Nicméně nutno nezapomenout na přítomnost patogenního *S. aureus*, který by mohl znamenat ohrožení zdraví zvířete i člověka.

**Klíčová slova:** buvolí mléko, mikrobiologie, kvalita, patogen

# Microbiological quality of buffalo milk

## Summary

After cow's milk, buffalo milk is one of the most produced milks in the world. One of the reasons for the growing interest may be the increasing number of suitable locations for buffalo farming due to climate change. It can be assumed that as the number of buffaloes raised increases, so will the representation of buffalo milk and dairy products on consumer land. However, as demand increases, it is also important to control the quality of these products, and microorganisms are responsible for some of the parameters monitored in milk and milk products.

In the framework of the thesis, 10 mixed samples of buffalo milk over a period of 4 months obtained from a Czech farm near Pribram, which raises buffalo under organic conditions, were analysed. The numbers and significance of individual microorganisms, which are often monitored in relation to the microbiological quality of cow's milk, were determined by means of plate culture methods. The numbers of TPC, *Escherichia coli*, coliforms, bifidobacteria, lactic acid bacteria, lactobacilli, yeasts, fungi, staphylococci and *Staphylococcus aureus* were monitored. At the same time, pathogenic bacteria of the genus *Salmonella* and *Listeria* were analysed using detection methods. A fermentation test was carried out each time to determine the predominant microbiota.

The average TPC count was  $4,1 \cdot 10^3$  CFU/mL, which did not exceed the limit set by legislation ( $\leq 500\,000$  CFU/mL) for non-cow's milk and could even be classified as Class I according to the limits for cow's milk. Coliforms were monitored at an average of 2 CFU/mL, which would correspond to the previously established but no longer replaced limits for cow's milk. Yeasts and moulds were also monitored in small amounts of  $2,0 - 10^1$  CFU/mL, without exceeding the maximum limit. Although LABs should represent the majority of the microbiota, in this work they were detected in average amounts of  $9,9 - 10^1$  CFU/mL. The associated lactobacilli representation with an average value of  $<1,00$  CFU/mL was very low. The genus *Bifidobacterium* spp., which should not be present in raw milk due to possible faecal contamination, was detected once at  $2,5 - 10^4$  CFU/mL. *E. coli*, salmonella and listeria were not detected at all, which is in line with the legislation. Staphylococci, for which there is no legislative limit, were detected in an average of  $2,4 - 10^2$  CFU/mL. Their pathogenic representative, *Staphylococcus aureus*, was detected during 3 samplings but only once confirmed by the Staphylase test as coagulase-positive in the amount of  $1,3 - 10^2$  CFU/mL. Based on the fermentation test, a predominance of acid-fast microorganisms was detected in the winter months of 2021 and proteolytic microorganisms with the onset of the new year.

The microbiological quality of the buffalo milk examined could be considered favourable in terms of the quantitative and qualitative determinations of the parameters found. However, the presence of pathogenic *S. aureus*, which could pose a threat to animal and human health, should not be forgotten.

**Keywords:** buffalo milk, microbiology, quality, pathogen

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Chov buvola domácího</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Požadavky na chov .....	10
3.1.2 Krmení .....	10
3.1.3 Reprodukce.....	11
3.1.4 Produkce.....	11
3.1.5 Patologické stavy .....	13
<b>3.2 Složení mléka</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3 Porovnání kravského a buvolího mléka</b> .....	<b>14</b>
3.3.1 Lipidy .....	14
3.3.2 Proteiny .....	15
3.3.3 Enzymy.....	15
3.3.4 Minerální látky.....	16
3.3.5 Vitaminy.....	16
3.3.6 Fyzikální a technologické vlastnosti mléka .....	17
<b>3.4 Mikroorganismy v buvolím mléce</b> .....	<b>17</b>
3.4.1 Zdroje kontaminace .....	18
3.4.2 Indikátorové mikroorganismy .....	19
3.4.2.1 Celkové počty mikroorganismů.....	19
3.4.2.2 Kvasinky a plísně .....	20
3.4.2.3 Koliformní bakterie .....	21
3.4.3 Probiotické bakterie .....	21
3.4.3.1 Bakterie mléčného kvašení .....	21
3.4.3.2 Bifidobakterie .....	23
3.4.4 Patogenní mikroorganismy v mléce .....	23
3.4.4.1 Escherichia coli .....	23
3.4.4.2 Stafylokoky .....	25
3.4.4.3 Salmonella spp. ....	27
3.4.4.4 Listeria spp. ....	27
3.4.4.5 Další patogenní mikroorganismy.....	29
3.4.5 Mikrobiota sýrů .....	30

3.5	Jakostní kritéria mléka .....	31
4	Metodika .....	33
4.1	Odběr a skladování vzorků .....	33
4.2	Ředící řada .....	33
4.3	Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) .....	34
4.4	Stanovení počtu koliformních bakterií a <i>E. coli</i> .....	35
4.5	Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení (BMK) .....	35
4.6	Stanovení počtu laktobacilů .....	36
4.7	Stanovení počtu bifidobakterií .....	36
4.8	Stanovení počtu kvasinek a plísní .....	36
4.9	Stanovení počtu stafylokoků .....	37
4.10	Stanovení počtu <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
4.11	Stanovení přítomnosti salmonel .....	38
4.12	Stanovení přítomnosti listerií .....	39
4.13	Kvasná zkouška .....	41
4.14	Vyhodnocení výsledků .....	42
5	Výsledky .....	43
5.1	Kvantitativní stanovení mikroorganismů .....	43
5.2	Kvalitativní stanovení mikroorganismů .....	46
6	Diskuze .....	47
7	Závěr .....	51
8	Literatura .....	52
9	Seznam použitých zkratk a symbolů .....	64
10	Samostatné přílohy .....	I





# 1 Úvod

Nepostradatelnou součástí jídelníčku je mléko a mléčné výrobky, které poskytují makronutrienty i mikronutrienty potřebné pro správné fungování organismu. Mléko pocházející od buvolů hraje v současnosti zásadní roli v zajištění potravin v rurálních i urbanistických oblastech v celosvětovém měřítku, zejména v Číně, Indii, Bulharsku a Pákistánu. Celosvětová produkce buvolího mléka stále stoupá a získává si na oblibě zejména z důvodu bohatého obsahu hlavních komponent a unikátní chuti. Produkce buvolího mléka se rozšiřuje i na evropské území, převážně v Itálii, ba i do našich krajín. Na českém území je zpracováváno a konzumováno převážně mléko kravské, nicméně před lety se trh rozšířil i o mléko buvolí, které je získáváno od buvolů chovaných na jediné buvolí farmě v České republice.

S narůstající produkcí je úzce spojena i kontrola kvality mléka, která má jednak hygienickou rovinu, tak i mikrobiální. Ať už se jedná o mléko kravské či buvolí, hygienickou či mikrobiální kvalitu, je důležité zajistit zdravotní nezávadnost potravin pro spotřebitele. Mléko získané od buvolů obsahuje více bílkovin, tuku, laktózy a sušiny v porovnání s kravským mlékem. Díky jedinečnému složení a vlastnostem představuje vhodnou surovinu pro výrobu másla, sýrů či zmrzliny, ale i ideální prostředí pro růst mikroorganismů. Syrové mléko jako takové může být totiž zdrojem jednak těch zdraví prospěšných, ale i patogenních mikroorganismů. Z tohoto důvodu je nutné sledovat mikrobiální zastoupení pro předcházení možného ohrožení zdraví a současně předcházet kontaminaci pomocí dodržování hygienických zásad.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Hypotéza: Vzhledem k odlišnému způsobu chovu buvolů je očekáván rovněž odlišný mikrobiologický obraz vzorků mléka.

Cílem práce je v teoretické části přehledná literární rešerše zaměřená na problematiku mikrobiologické kvality mléka, konkrétně buvolího. V praktické části je pak cílem mikrobiologický rozbor vzorků buvolího mléka, pomocí vhodných metod.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Chov buvola domácího

Buvol domácí, vodní buvol nebo také *Bubalus arnee f. bubalis*, se řadí k domestikovaným formám buvola indického a dělí se na dva poddruhy: buvola říčního a buvola bažinného. Vyznačuje se vysokou imunitou vůči chorobám a schopností žít se levnými krmivy při efektivním využití složek krmiva. V mnoha zemích je cenným zvířetem z důvodu jedinečných vlastností buvolího mléka (FAO 2021, Czerniawska-Piatkowska et al. 2010).

#### 3.1.1 Požadavky na chov

Díky snadné adaptaci k různým přírodním podmínkám je možné buvoly potkat téměř na každém kontinentu. Chovají se ve vyspělých zemích i v zemích s primitivnějšími zemědělskými technikami (Czerniawska-Piatkowska et al. 2010). Chov buvolů obvykle probíhá extenzivně na mokřích pastvinách, které jsou pro buvoly stěžejním z důvodu efektivní termoregulace. Na rozdíl od skotu domácího (*Bos taurus*) disponují menším počtem potních žláz (Joshi et al. 1968; Czerniawska-Piatkowska et al. 2010), a tudíž termoregulace musí být podporována vodními koupelemi. Kritickým obdobím pak mohou být horké dny, kdy je nutné zajistit zvířatům přístup k potoku, řece či uměle vytvořeným bazénům. Případnou možností mohou být i studené sprchy (Czerniawska-Piatkowska et al. 2010). Záměrná distance od vodního prostředí, zajištěná člověkem, může způsobit špatnou produktivitu a reprodukci (Marai & Haebe 2010).

V létě hraje důležitou roli poskytnutí přístřešku, pod kterým zaujímá své místo i krmivo, voda a dojící technika, pro ochranu před silným slunečním zářením a deštěm. Naopak během zimního období je vhodné postavit zastřešené, třístěnné úkryty, chránící zvířata před sněhem a silným větrem. V případě dlouhotrvajících nepříznivých podmínek musí být poskytnuto krmivo (Czerniawska-Piatkowska et al. 2010).

Buvoli chovaní pro mlékařskou produkci mohou být po celý rok umístěni v komorových stodolách v rámci intenzivního chovu (Borghese & Moioli 2002).

#### 3.1.2 Krmení

Extenzivní systém umožňuje volný pohyb na pastvě během příznivých ročních dob, přičemž se daný způsob uplatňuje zejména v rámci Evropy a Blízkého východu (Borghese & Moioli 2002). Umožnit buvolům přístup na pastvu je současně vhodné z důvodu menší náročnosti na kvalitu porostu. Buvoli jsou schopni efektivněji využít porost s nižším obsahem živin v porovnání s domácím skotem (Thomas 2004). Seno, siláž, kukuřičná zrna a jejich vedlejší produkty patří k hlavním zdrojům přijímaných živin. K vedlejším produktům lze řadit řepové řízky, pivovarské kvasnice, slupky od rajčat či odpadní produkty při zpracování cukrové třtiny a bavlny (Borghese & Moioli 2002).

Borghese a Moioli (2002) uvádí příklad denního příjmu živin pro vysoce výnosné buvoly chované v Itálii, přičemž 16 kg tvoří kukuřičná siláž, 7,5 kg seno, proteinový koncentrát 3,0 kg a kukuřičné zrno 1,3 kg.

Zároveň je však nutné zmínit, že se nutriční požadavky buvolí samice liší na základě období, ve kterém se kráva nachází. V životě krávy existují dvě stádia: období laktace a období stání na sucho. Za fázi stání na sucho se považuje časový úsek mezi koncem laktace, porodem a začátkem další laktace. Během této fáze by měl protein poklesnout ze 13 % na 7,5 % sušiny. Buvoli disponují větší kapacitou pro utilizování proteinu z krmiv, které dostávají během fáze stání na sucho. Fáze laktace obvykle trvá 270 dní a mléčná užitkovost se po otelení zvyšuje a dosahuje maxima mezi čtvrtým a šestým týdnem. Procentuální zastoupení proteinu během laktační fáze činí necelých 16 %. Zvýšené koncentrace proteinu způsobují zvýšení glykémie a snížení inzulinémie, což umožní větší dostupnost glukózy díky syntéze laktózy (Fagiolo et al. 2005). Pro porovnání denní příjem sušiny dojnice skotu, při produkci 25 kg mléka denně, by měl činit 20 kg. Protein by měl zastupovat 15 % denního příjmu. Naopak během fáze stání na sucho by dojnice měla přijímat cca 14 kg sušiny (Erickson & Kalscheur 2020).

### 3.1.3 Reprodukce

Buvoli, obdobně jako skot, patří k polyestrálním živočichům, nicméně otelení závisí na srážkách, teplotě okolního prostředí, přísunu krmiva i délce denního slunečního svitu (Jainudeen 2004).

Řadí se k pozdně dospívajícím zvířatům. Samice dosáhnou pohlavní dospělosti v 15-18 měsíci a k reprodukci jsou připraveny ve věku 24-36 měsíců. Při páření jalovic však chovatel musí zohlednit nejen jejich věk, ale také hmotnost. Při prvním páření nebo inseminaci by měly vážit 250-275 kg (Barile 2005). Průměrná délka pohlavního cyklu je 21 dní a ovulace nastupuje přibližně 14 hodin po říji, přičemž samotná říje může trvat až 24 hodin. V případě připuštění je samice březí po dobu 310 dní (Ingawale & Double 2004). Po narození váha telete dosahuje 35-40 kg.

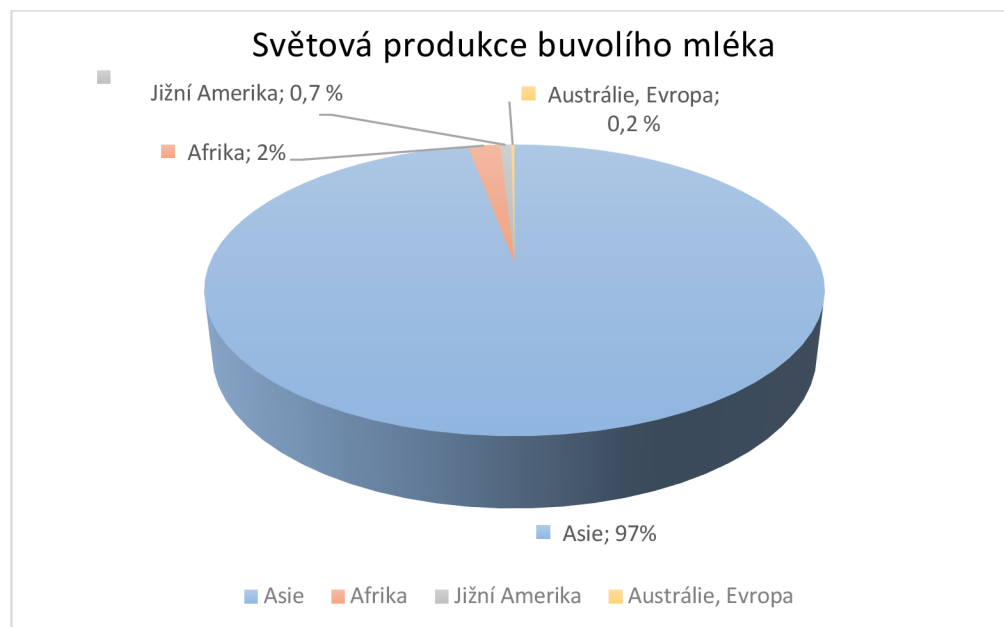
Co se týče pohlavní dospělosti samce, nastupuje okolo 18. měsíce věku a k plemenitbě může být použit od 3. roku života (Czerniawska-Piatkowska et al. 2010).

### 3.1.4 Produkce

V roce 2005 dle FAO dosáhla produkce mléka 629,2 tun, z čehož 12,2 % tvořilo mléko buvolí. Dle FAO (2021) tvoří buvolí populaci přes 270 milionů zvířat, zatímco 97 % je chováno v Asii, kde vodní buvolí hrají zásadní roli v živočišné produkci. Současně však narůstá zájem v oblasti Středomoří, Latinské Americe, ale i v Austrálii a Evropě (Obrázek č. 1). Jeden z důvodů může být ekonomický benefit vycházející z požadavků na buvolí mléko, na které se na rozdíl od kravského nevztahují specifické restriktce požadované Evropskou unií o snížení produkce mléka (Fagiolo et al. 2005). Zeměmi s největším počtem buvolů mléčného skotu jsou Indie, Pákistán, Čína, Egypt a Nepál. V Pákistánu, Egyptě a Nepálu je více dojných buvolů než dojných krav. Největšími producenty mléka z vodních buvolů jsou Indie a Pákistán, kde buvolci produkují více mléka než skot (FAO 2021).

Buvol vodní se může vyskytovat ve dvou poddruzích: říční a bažinný buvol. Říční buvolí tvoří přibližně 70 % světové populace vodních buvolů. Mléko říčních buvolů tvoří podstatnou část celkové produkce mléka v Indii a Pákistánu a také hraje důležitou roli na Blízkém východě. Obvykle produkují 1 500 až 4 500 litrů mléka za laktaci. Bažinný buvolí jsou menší a mají nižší mléčnou užitkovost. Vyskytují se především ve východní Asii a jsou

chování převážně pro tažnou sílu. Mají výrazně delší produkční život než skot, poskytují telata a mléko až do věku 20 let. K mnoha faktorům, které omezují komerční produkci mléka buvolů, patří pozdní věk zvířat při prvním otelení, sezónnost říje a dlouhý interval mezi oteleními a obdobími sucha (FAO 2021).



**Obrázek č. 1** – Graf světové produkce buvolího mléka (FAO 2021)

Mléko lze konzumovat v tekuté formě nebo zpracovávat na širokou škálu výrobků, a to buď samostatně, nebo ve směsi s mlékem jiných hospodářských zvířat. Vyrábí se kysané mléko, máslo, ghí, kondenzované a sušené mléko a sýry (Borghese & Moioli 2002).

Mnoho farem vyrábí vlastní sýry a smetanu, které přímo prodávají. Podle obsahu vody jsou typické následující druhy sýrů:

- 1) Měkké sýry (obsah vody > 45 %): Karish, Mish a Domiati v Egyptě; Madhfor v Iráku; Mozzarella v Itálii; Alghab v Sýrii; Vladeasa v Rumunsku.
- 2) Polotvrdý sýr (obsah vody 40-45 %): Beyaz peyneri v Turecku.
- 3) Tvrdý sýr (obsah vody <40 %): Peyeryy, Turecko; Braila v Rumunsku; Rahss v Egyptě; bílý solný sýr v Bulharsku; Akkawi v Sýrii.

Používanější klasifikace sýrů je založena na typu srážení: buď enzymatické srážení (syřidlem), nebo kyselé srážení (po přirozeném okyselení nebo působením mléčných bakterií). Většina sýrů vyráběných ve Středomoří, včetně Mozzarely, patří do kategorie sýrů s enzymatickým srážením. Poptávka po vysoce kvalitní Mozzarelle v Itálii a ve světě podnítila nárůst chovu buvolů v Itálii a zlepšení technik chovu zvířat. Produkce Mozzarely je vyšší než u všech ostatních sýrů (Borghese & Moioli 2002).

Jogurt se vyrábí v Bulharsku, Rumunsku a Albánii z buvolího, kravského nebo ovčího mléka. **Raha** je fermentované mléko z Iráku, které se vyrábí buď z plnotučného, nebo odstředěného mléka, a **laban** nebo **khather** jsou fermentovaná mléka v Sýrii, která se často vyrábějí z buvolího mléka (Borghese & Moioli 2002).

### 3.1.5 Patologické stavy

Výskyt onemocnění objevující se u buvolů může mít specifický, ale i charakteristický projev jako u skotu. Pravděpodobně z důvodu adaptace na horké a vlhké klima vykazují buvoli větší rezistenci k infekcím než skot (Borghese & Moioli 2002).

Bakterie *Escherichia coli*, postihující převážně telata, způsobuje gastroenterologické patologie, které se mohou objevit i při přítomnosti dalších patogenních bakterií (*Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiel*), kokcií či virů. Současně *E. coli*, ale i *Pasteurella*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*, způsobují respirační potíže vedoucí k vysoké úmrtnosti v případě, že nedochází k léčbě antibiotiky. K nejzávažnějším onemocněním patří hemoragická septikémie, objevující se zejména v Asii, jejíž původcem je *Pasteurella multocida*. Vysoký počet úmrtí lze regulovat pomocí antibiotik a vakcinace. Tuberkulóza, brucelóza, leptospiróza či listerióza patří k dalším zoonózám ohrožujícím organismus zvířete (Borghese & Moioli 2002; Fagiolo et al. 2005).

Profylaxe hraje velmi důležitou roli u některých virových onemocnění, které způsobují neonatální průjem (*Rotavirus*, *Coronavirus*), vyskytující se zejména na farmách s intenzivním chovem. Infekční bovinní rinotracheitida (IBR) a bovinní virová diareja (BVD) se šíří rovněž zejména v rámci intenzivního chovu (Borghese & Moioli 2002; Martucciello et al. 2009).

Parazitární infekce patří k běžně se vyskytujícím onemocněním, zejména v rozvojových zemích. Buvolí organismus mohou poškodit gastrointestinální helminty, kokcidie, paraziti postihující játra, krevní paraziti nebo i roztoči, přičemž každé onemocnění způsobené zmíněnými organismy zapříčiní ekonomické ztráty (Borghese & Moioli 2002).

## 3.2 Složení mléka

Obsah jednotlivých komponent buvolího mléka závisí na plemeni, krmivu, podmínkách prostředí i zdravotním stavu krávy. Níže uvedené hodnoty vychází z průměrných hodnot napříč ovlivnitelnými faktory.

Buvolí mléko obsahuje přibližně 83 % vody a 17 % sušiny, jejíž hlavní složky jsou uvedeny a porovnány s kravským mlékem v tabulce č. 1. Tuk reprezentuje převládající komponent sušiny, a to v množství  $6,6 - 8,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , nicméně lze se setkat i s  $15 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  v závislosti na plemeni (Varricchio et al. 2007; El-Salam & El-Shibiny 2011). Druhý největší komponent zastupuje laktóza s obsahem  $4,5 - 5,2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Protein je zastoupen v množství  $3,8 - 4,6 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Popeloviny zaujímají  $0,71 - 0,90 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Výše zmíněné hodnoty indikují fakt, že buvolí mléko je bohatší na hlavní složky v porovnání s kravským mlékem (El-Salam & El-Shibiny 2011).

Minoritní komponenty, ve vztahu ke gramáži, zahrnují enzymy, minerální látky vitaminy a mikroorganismy. Vápník (Ca), fosfor (P) a hořčík (Mg) spadají pod hlavní elementy minerálních látek. Vápník, v průměrném množství  $0,190 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , se vyskytuje zejména v nerozpustné formě díky přítomnosti vysokého obsahu kaseinu. Obsah fosforu ( $180 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ) se vyskytuje v koloidní anorganické formě (42,4 % z celkového množství P), jako rozpustný anorganický P (29,9 % z celkového množství P), kaseinový P (17,3 % z celkového množství) a organický P (9,2 % z celkového množství). Draslík zaujímá 110 mg a sodík 50 mg. Rozpustný

hořčík zaujímá přibližně 50 % z celkového množství Mg, přičemž jeho hodnota se rovná 10 mg ve 100 g mléka (El-Salam & El-Shibiny 2011; Medhammar et al. 2012).

Ze skupiny vitaminů lze v mléce najít hlavně vitaminy A a E (El-Salam & El-Shibiny 2011).

**Tabulka č. 1** – Obsah složek v buvolím a kravském mléce (El-Salam & El-Shibiny 2011; Medhammar et al. 2012)

<b>Složka</b>	<b>Obsah v buvolím mléce (g · 100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Obsah v kravském mléce (g · 100 g<sup>-1</sup>)</b>
Voda	83	87,5
Tuk	6,6 – 8,8	3,5
Laktóza	4,5 – 5,2	5
Protein	3,8 – 4,6	3,4
Popeloviny	0,71 – 0,90	0,7
Ca	0,19	0,15
P	0,18	0,14
K	0,11	0,15
Na	0,05	0,04
Mg	0,01	0,01

### 3.3 Porovnání kravského a buvolího mléka

Vzhledem k převaze produkce kravského mléka (KM) je na místě porovnat obsah jednotlivých složek s buvolím mlékem (BM). Při nahlédnutí do obsahové stránky mléka je jisté, že v BM se vyskytuje větší množství tuku (8 %) než v mléce kravském (3,5 %). Současně k tání mléčného tuku v BM dochází při vyšších teplotách, za což zodpovídá větší zastoupení nasycených mastných kyselin vůči nenasyceným mastným kyselinám (77:23). Zároveň se větší výskyt v BM objevuje u proteinů (4 %), laktózy (4,9 %) a popelovin (0,8 %) v porovnání s KM. Menší zastoupení v BK lze nalézt u cholesterolu a fosfolipidů (Czerniawska-Pitkowska et al. 2010).

#### 3.3.1 Lipidy

Tuk obsažený v mléce se vyskytuje ve formě tukových kapének (TK), jejichž velikost ovlivňuje mimo jiné fyzikálně-chemické a funkční vlastnosti sýrů (Michalski et al. 2004). Průměrná velikost tukové kapénky v buvolím mléce (5,00 μm) změřená pomocí mikroskopických metod je vyšší než u ostatních přežvýkavců včetně krávy (Menard et al. 2010). Velikost kapének se liší i v rámci jedince, přičemž v buvolím mléce je zastoupeno větší množství velkých tukových kapének než v případě mléka kravského. Současně BM má vyrovnanější rozložení jednotlivých různě rozměrných TK s velikostí 3-6 μm. Vliv sezónnosti a laktace může způsobit změnu velikosti kapénky, přičemž malé rozměry byly zaznamenány během pozdní laktace. Předpokládá se, že zvětšení TK buvolího mléka může být způsobeno

zvýšeným buněčným metabolismem mléčné žlázy a schopností produkovat mléčný tuk (Schafberg et al. 2007).

Varricchio et al. (2007) uvádí průměrný obsah nasycených mastných kyselin (SFA) a nenasycených mastných kyselin (USFA) 65,5 % a 34,5 %, což odpovídá vyššímu zastoupení SFA a zároveň menšímu množství USFA v BM, než je přítomno v KM. Kompozice mastných kyselin může být však ovlivněna plemenem a fází laktace (Talpur 2007), konvenčním či organickým způsobem chovu (Bergamo et al. 2003), stejně tak jako krmivem (Varricchio et al. 2007). Navzdory rozdílnému zastoupení mastných kyselin se aterogenní index s hodnotami pro KM 1.92–2.56 a BM 1.77–2.55 u obou mlék téměř neliší (Talpur 2007). Zvláštní pozornost by měla být věnována konjugované kyselině linolenové (CLA) z důvodu jejího potenciálního pozitivního efektu na lidské zdraví. V BM je CLA obsažena v množství  $0,9 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , zatímco obsah CLA  $0,7 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  se vyskytuje v kravském mléce (Menard et al. 2010). Nicméně dané hodnoty nelze považovat jako dogma, protože několik dalších studií potvrdilo, že v závislosti na environmentálních a genetických faktorech se množství CLA v BM může značně lišit (Kumar & Kansal 2005; Talpur 2007).

Obsah cholesterolu, jakožto látky lipidové povahy, se pohybuje v BM v rozmezí 14,2–16,0  $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Mattera et al. 2007). Přestože BM obsahuje vyšší obsah tuku, má o něco méně cholesterolu než mléko skotu, což lze přičíst především rozdílu ve velikosti tukových kapének u obou druhů (El-Salam & El-Shibiny 2011).

### 3.3.2 Proteiny

Proteiny, zastoupené v BM, jsou reprezentovány kaseiny:  $\alpha$ 1-kasein ( $\alpha$ 1-CN),  $\alpha$ 2-kasein ( $\alpha$ 2-CN),  $\beta$ -kasein ( $\beta$ -CN),  $\kappa$ -kasein ( $\kappa$ -CN), a syrovátkovými bílkovinami:  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG) a  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA). V porovnání s KM obsahuje BM více  $\alpha$ 2-CN a  $\kappa$ -kaseinu. Větší množství  $\kappa$ -CN v BM lze považovat za faktor urychlující enzymatickou fázi srážení syřidlem a požadavek menšího množství chymosinu při výrobě sýra. Relativní koncentrace syrovátkových bílkovin v BM je podobná jako v KM, kdy  $\beta$ -LG tvoří více jak 50 % celkových syrovátkových bílkovin a je tím pádem hlavní sérovou bílkovinou (Mohran 1991). Relativní rozložení (v procentech) kaseinových a syrovátkových bílkovin v BM je ovlivněno počtem somatických buněk. Pasquini et al. (2003) pomocí elektroforézy zjistili, že s klesajícím počtem somatických buněk stoupá zastoupení kaseinových bílkovin, což by mohlo zvýšit výtěžnost sýra. Nicméně mechanismus ovlivnění nebyl objasněn. Správným dodržováním hygienických zásad, a tedy snížením PSB, by se mohlo dosáhnout produkce vysoce kvalitního mléka vhodného pro sýrařský průmysl.

### 3.3.3 Enzymy

Mléko savců obsahuje velké množství enzymů, z nichž některé mají technologický význam, např. markery tepelného ošetření a konzervace mléka, a mohou vést k nežádoucím změnám během skladování. Buvolí méko vykazuje vysokou enzymatickou aktivitu, která je zprostředkována například lipázami, lysozymem, laktoperoxidázou, alkalickou fosfatázou či proteinázou (El-Salam & El-Shibiny 2011).

Kansal a Priydarshini (2002) uvádí dvojnásobnou aktivitu lysozymu v BM oproti kravskému mléku a současně fakt, že mlezivo buvolů vykazuje pětinašobně větší aktivitu



lysozymu než zralé mléko. Aktivita lysozymu v BM se výrazně snižuje při skladování, zejména při přítomnosti vysoké teploty, jelikož optimální teplota pro buvolí lysozym je 37 °C. Lysozym přítomný v buvolím mléce dokáže inhibovat 4 ze 7 gram pozitivních bakterií, nicméně gram negativní bakterie vykazují vůči lysozymu rezistenci.

Laktoperoxidáza se ve velké míře nachází volně v BM a má téměř dvojnásobně vyšší aktivitu než v mléce kravském, a může tak BM déle zachovávat své původní vlastnosti (Borghese & Moioli 2002; Sharma et al. 2009).

### 3.3.4 Minerální látky

Některé minerální látky nacházející se v buvolím mléce jsou zastoupeny v podobném množství jako v KM, jiné se naopak svým obsahem značně liší od minerálních látek v kravském mléce. Co se týče hlavních minerálních látek, BM se vyznačuje vysokým obsahem vápníku (Ca), jehož zastoupení je přibližně 1,5 x větší než v KM. Zdá se, že obsah Ca v BM může být značně ovlivněn plemenem, faktory prostředí a metodami použitými pro analýzu. Většina Ca se nachází v nerozpustné formě (67,6-82,6 % celkového Ca), a to především kvůli vysokému obsahu kaseinu v BM. Obsah rozpustného Ca v BM byl podobný obsahu zjištěnému v KM, kde se vodná fáze mléka považuje za nasycenou z hlediska Ca (El-Salam and El-Shibiny 2011). V případě obsahu fosforu (P) se rozdíl mezi mléky téměř nevyskytuje. BM má 850 mg/kg P, zatímco KM 910 mg/kg. Srovnání zastoupení hořčíku (Mg) rovněž nevedlo k zásadním rozdílným výsledkům, jelikož Mg v BM zaujímá 170 mg/kg, přičemž KM obsahuje 110 mg Mg. Další hlavní zástupci minerálních látek, sodík (Na) a draslík (K), byly obsaženy v obou typech mlék srovnatelně (Ahmad et al. 2008; Stergiadis et al. 2019).

### 3.3.5 Vitaminy

V buvolím mléce se rovněž nachází neméně významné vitaminy. Kravské mléko je kvalitním zdrojem vitamínu A díky obsahu karotenu a vitamínu A, nicméně BM obsahuje vyšší množství, a to pouze ve formě vitamínu A. Absence karotenu v BM napovídá i výraznější bílé barvě než u KM (Borghese & Moioli 2002; Mattera et al. 2007). Retinol ve formě 13 *cis*-izomer, který má maximální účinnost vitamínu A, je v čerstvém syrovém BM přítomen v malém množství 2,4-5,2  $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Mattera et al 2007). Zajímavého poznatku si všiml Bergamo et al. (2003), kdy zjistil, že v mléce buvolů chovaných organickým způsobem se nachází nižší koncentrace vitamínu A než v mléce buvolů v konvenčním chovu.

Koncentrace vitamínu E v buvolím mléce a mléčném tuku je nižší než v kravském mléce, což potvrzuje korelaci mezi obsahem tokoferolu a obsahem polynenasycených mastných kyselin v mléčném tuku (Fatouh et al. 2005).

Jediná zmínka o vitamínu D v tuku buvolího mléka uvádí hodnotu 30  $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , což naznačuje, že BM není vhodným zdrojem vitamínu D (Fatouh et al. 2005). Naopak v případě vitamínu C obsahuje BM větší množství s rozdílem přibližně 971,1  $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  oproti KM (Mohamed et al. 1990). Vyšších hodnot u BM dosahuje i vitamin B12, kdy přibližně čtyřikrát vyšší množství vitamínu B12 (2,2  $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) se vyskytuje v BM ve srovnání s KM 500  $\mu\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Sharma et al. 2007).

### 3.3.6 Fyzikální a technologické vlastnosti mléka

Viskozita BM je obecně vyšší než viskozita KM, závisí však do značné míry na obsahu tuku. Odstředěné, standardizované (3 % tuku) a plnotučné BM (6,1 % tuku) vykazuje viskozitu 1,33, 1,70 a 2,02 mPa · s<sup>-1</sup>, zatímco odstředěné, standardizované (3 % tuku) a plnotučné kravské mléko má viskozitu 1,17, 1,44 a 1,66 mPa · s<sup>-1</sup> (Ismail & El-Deeb 1973). Arian et al. (2008) zaznamenali rychlý pokles viskozity BM po otelení z 6,80 mPa · s<sup>-1</sup> při prvním dojení na hodnotu 1,64 mPa · s<sup>-1</sup> naměřenou šestý den. Výskyt mastitidy zvyšuje viskozitu BM na 2,79 a 2,43 mPa · s<sup>-1</sup> u mléka od zvířat s klinickou a subklinickou mastitidou (Haggag et al. 1991). Při pH 8,6 a 10,8 je viskozita BM dvakrát vyšší než KM (Ahmad et al. 2009), což je přisuzováno vyvolaným změnám v interakcích mezi vodou a kaseinovými micelami.

V případě pufrací aktivity, jakožto fyzikálního ukazatele, pH v BM klesalo během okyselování pomaleji než pH mléka kravského. Tento jev je způsoben vyšší pufrací kapacitou BM (Imam et al. 1974; Ahmad et al. 2008), která je zároveň důsledkem vysokého obsahu kaseinu a anorganických fosfátů.

Znalost tepelných vlastností mléka je nezbytná pro konstrukci výměníků tepla, kondenzátorů a odpařovačů, které se běžně používají v mlékárnách. Uvádí se, že průměrná tepelná vodivost plnotučného BM je 0,5689 ± 0,00734 S · m<sup>-1</sup> při 42-43 °C, která je vyšší než v případě KM (Sharma & Roy 1983).

K vlastnostem, hrající roli při technologických postupech, patří kyselinou indukovaná gelace, srážením syřidlem či tepelná stabilita. Hodnota pH BM při nástupu gelace pomocí kyseliny se pohybuje v rozmezí 5,5 až 5,9, zatímco pH kravského mléka dosahuje hodnot nižších - pH 5,1-5,2 (Kim & Kinsella 1989). Vyšší hodnotu pH lze vysvětlit vyšším obsahem bílkovin (Abd El-Salam et al. 1996). Naopak v případě srážení syřidlem dochází k rychlejší koagulaci mléka buvolů (El-Shibiny & Abd El-Salam 1980). Jeden z dalších technologických ukazatelů mléka, tepelná stabilita, je opět u BM i KM odlišná. Buvolí mléko se považuje za teplotně méně stabilní z důvodu vysokého obsahu tuků a vápníku, hodnoty pH a nízké hladiny močoviny (17,5 mg · 100 ml<sup>-1</sup>) ve srovnání s KM (Pandya et al. 2004).

## 3.4 Mikroorganismy v buvolím mléce

Syrové mléko může obsahovat rozmanitou bakteriální populaci. Kromě toho jeho vysoký obsah živin s vysokou aktivitou vody při téměř neutrálním pH podporuje růst mnoha mikroorganismů. Nicméně navzdory skutečnosti, že mikrobiální společenstvo v mléce je složité, může mnoho izolátů ze syrového mléka přispívat ke zlepšení technologických vlastností mléčných výrobků a zároveň příznivě ovlivňovat lidského zdraví (Siró et al. 2008). Mikrobiota syrového buvolího mléka je z velké části zastoupena bakteriemi mléčného kvašení (BMK), dále koliformními bakteriemi, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a bakteriálními endosporami (Ercolini et al. 2004). Některé mikroorganismy jsou v mléce žádoucí, některé naopak. Již v 1. pol. 20. století Swithinbank a Newton (1903) zaznamenali, že kontaminované mléko může ohrozit lidské zdraví.

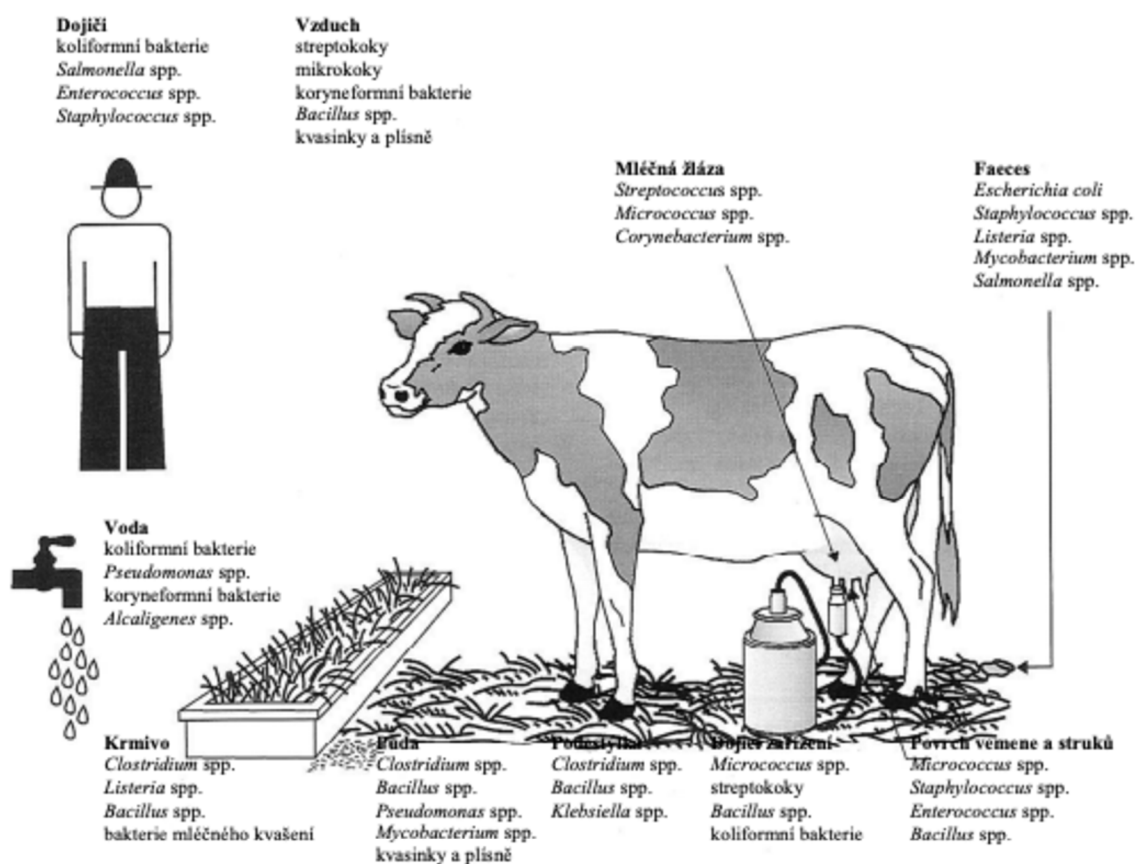
Mikroorganismy přítomné v mléce a mléčných výrobcích lze rozdělit na indikátorové a patogenní (Mendonca et al. 2020), nicméně je věnována pozornost i dalším

mikroorganismům, které nejsou řazeny ani do jedné ze zmíněných skupin, protože působí zdraví prospěšně. Patří sem bakterie mléčného kvašení (BMK) a *Bifidobacterium* spp. (Klaenhammer et al. 2005; Shafakatullah & Chandra 2014; Breyer et al. 2020).

### 3.4.1 Zdroje kontaminace

Z důvodu téměř ideálních podmínek poskytnutých v mléčném prostředí se zde setkáváme s hojným zastoupením několika mikroorganismů, které se do mléka mohou dostat různými způsoby (obrázek č. 2). Primární mikrobiota osídluje mléko již před zahájením dojení, a to dvěma cestami: strukovým kanálkem či krevním oběhem. Mikroorganismům přítomných v krvi není věnovaná taková pozornost, jelikož makrofágy a protilátky zamezují jejich průniku jednak do krve a následně i do mléka. Kontaminace způsobena mikroorganismy prostupujícími skrze strukový kanálek probíhá daleko častěji. Primární mikrobiota však nemá významný vliv na trvanlivost a jakost mléka.

Během dojení a následujícího zpracování přichází do styku s mlékem sekundární mikrobiota, která relativně rychle přerůstá a potlačuje mikrobiotu primární. Sekundární mikrobiota může být přítomna v krmivu, stelivu, výkalech, na vemenu či struku dojnice, dojiči, dojícím zařízení, ve vodě či vzduchu, a může tak kontaminovat syrové mléko (Navrátilová a kol. 2012).



Obrázek č. 2 – Zdroje kontaminace mléka (Roginski et al. 2003)

### 3.4.2 Indikátorové mikroorganismy

Indikátorové mikroorganismy se používají k hodnocení obecné hygieny nebo podmínek životního prostředí, které mohou naznačovat potenciální přítomnost patogenů ohrožujících bezpečnost potravin. Tyto organismy nemusí být nutně patogenní, jejich použití je však pro potraviny atraktivní, protože testy na patogeny mohou být nákladné, časově náročné a neefektivní, zejména při testování velkého množství potravin a/nebo vzorků z prostředí. Současně jsou indikátorové mikroorganismy užitečné pro stanovení mikrobiologických kritérií k definování přijatelnosti potravinářských výrobků. V tomto ohledu se přijatelnost vztahuje na nepřítomnost nebo přítomnost určitých mikroorganismů nebo na kvantifikovatelné limity těchto nebo jiných mikroorganismů na jednotku hmotnosti, objemu, plochy nebo šarže (Mendonca et al. 2020). Jako indikátor v mléce slouží celkové počty mikroorganismů, koliformní bakterie, *Escherichia coli* (*E. coli*), stafylokoky, *Pseudomonas aeruginosa*, kvasinky a plísňe (Mendonca et al. 2020).

#### 3.4.2.1 Celkové počty mikroorganismů

Za mikroorganismy detekovatelné po kultivaci a schopné tvořit kolonie se považují bakterie, kvasinky a plísňe (ČSN 4833-1), které rostou na neselektivních médiích a představují celkový počet mikroorganismů (CPM). Stanovení CPM se používá k odhadu populace mikroorganismů ve vzorku potravin. Vyjadřuje se počtem kolonií (kolonií tvořících jednotek – KTJ) v 1 mL, které jsou po kultivaci viditelné. Nejedná se o hodnocení celé bakteriální populace, ani neukazuje rozdíly mezi jednotlivými typy bakterií v potravinářském výrobku. Poskytuje však odhad počtu mikroorganismů, které mohou růst aerobně při mezofilních teplotách. Nedochozí tedy k detekci anaerobních mikroorganismů. CPM lze použít k posouzení hygienické kvality, sensorické přijatelnosti a souladu se správnou výrobní praxí (SVP). Výsledky CPM mohou poskytnout informace o kvalitě nebo historii manipulace se surovinami, potravinách a výrobcích, podmínkách zpracování a skladování a manipulaci s hotovým výrobkem. Kromě toho jej lze použít k určení doby trvanlivosti nebo nadcházejících sensorických změn potravinářského výrobku. Lze díky hodnotě CPM posoudit celkovou hygienickou úroveň provozu. Zjistitelné změny kvalitativních vlastností potravin v důsledku růstu mikroorganismů a produkci enzymů obvykle dochází, když nárůst CPM dosáhne přibližně  $1 \cdot 10^6 - 10^7$  KTJ v 1 mL (Mendonca et al. 2020). Vysoké hodnoty CPM indikují silnou kontaminaci v průběhu dojení, manipulace, skladování, konzervace či nedostatečnou teplotu chlazení vedoucí ke zpomalení růstu mikroorganismů (FAO 2009).

CPM je současně nespolehlivým ukazatelem mikrobiální bezpečnosti potravin, protože nemá přímou souvislost s výskytem patogenů nebo toxinů. Nízká hodnota CPM nesignalizuje nepřítomnost patogenů ve výrobku nebo jeho složkách, a nezaručuje tak bezpečnost potravin. Pokud je však pozorován neobvykle vysoký počet mikroorganismů v dané potravine (u buvolího mléka  $> 1\,500\,000$  KTJ/mL při 30 °C), lze předpokládat, že se jedná o nebezpečí pro lidské zdraví. Nicméně je důležité vzorek podrobit testování na patogenní mikroorganismy pro potvrzení potenciálního nebezpečí. Při interpretaci výsledků CPM je třeba vzít v úvahu typ potravinářského výrobku a to, zda je vysoká hodnota CPM pro daný výrobek typická. Například u fermentovaných potravin se očekává vysoká hodnota (Mendonca et al. 2020).

Syrové mléko s vysokým CPM může ovlivňovat lidské zdraví. Některé bakterie (*S. aureus*, *E. coli* a *Streptococcus agalactiae*) mohou způsobovat průjemová onemocnění. Po pasterizaci může dojít k opětovné kontaminaci mléka prostřednictvím znečištěných potrubí na mléko, ulpělých zbytků mléka na použitých zařízeních nebo termobakterií (*Bacillus cereus*), které mohou pasterizaci přežít. Bakterie mohou mít také negativní vliv na mléčné výrobky. Například bakterie *Alteromonas putrefaciens* způsobuje povrchovou skvrnitost másla a bakterie *E. coli* může kazit mléko a mléčné výrobky produkcí plynu během skladování (Gilmour & Rowe 1990).

#### 3.4.2.2 Kvasinky a plísně

Kvasinky jsou jednobuněčné mikroorganismy, spadající do říše hub, a mají schopnost kolonizovat mnoho různých typů prostředí. K nejčastějším zástupcům kvasinek vyskytujících se v mléku patří *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida rugosa*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii* a *Yarrowia lipolytica* (Callon et al. 2007; El-Sharoud et al. 2009; Büchl 2011). Potraviny s vysokým obsahem živin, jako je cukr (monosacharidy, disacharidy), organický dusík, minerální látky a vitamíny, obecně představují ideální substrát pro růst kvasinek. Vliv kvasinek v mléčných výrobcích může být prospěšný i škodlivý. Některé druhy hrají důležitou roli při výrobě tradičních fermentovaných mléčných výrobků a sýrů. Vytvářejí specifické aromatické složky, například etanol a oxid uhličitý v kefiru a kumysu, a přispívají k růstu bakteriálních zákysových kultur zrajících na povrchu měkkých a polotvrdých sýrů. Nicméně růst kvasinek je ve většině případů v mléce a mléčných výrobcích nežádoucí z důvodu vysokého rizika kažení. Kvasinky jsou schopny růst v širokém spektru prostředí s různým pH, proto jsou obvykle schopny zkazit mléčné výrobky s nízkým pH kvašené bakteriemi mléčného kvašení (BMK), zatímco často se vyskytující organismy v mléce, které patří mezi bakteriální čeledi *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae*, se za takových podmínek množit nemohou (Büchl 2011).

Plísně neboli mikromycety či vláknité mikroskopické houby patří k vícebuněčným mikroorganismům rovněž spadajícím k říši hub (Ostrý 1998). V mléčných výrobcích se vyskytují zejména *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*, *Mucor racemosus*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium commune* (Montagna et al. 2004). Zatímco některé z těchto druhů jsou známy jako nežádoucí (*Cladosporium cladosporioides*, *M. racemosus*, *Penicillium commune*), ve většině mohou významně přispívat k chuti a struktuře speciálních sýrů (Pereira-Dias et al. 2000). Obdobně jako kvasinkám i plísním se daří za podmínek, které nejsou příznivé pro růst bakterií, jako je nízké pH, nízká teplota a nízká aktivita vody nebo vysoká koncentrace cukru či soli. Proto se některé plísně nakonec stanou převládající mikrobiotou kazících se potravin včetně mléčných výrobků. Zatímco některé plísně mohou způsobovat kažení potravin v podobě změny barvy, zatuchlého zápachu, nepříjemné chuti, plynů nebo usazenin, jiné plísně mohou také produkovat i mykotoxiny, které mohou u spotřebitelů vyvolat toxické a karcinogenní účinky (Mendonca 2020).

Mezi potenciální zdroje kontaminace kvasinek a plísní patří okolní vzduch, pracovníci na farmách, sýraři, solanka a nedostatečně dezinfikované sýrařské vybavení (Borelli et al. 2006).

### 3.4.2.3 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou definovány jako aerobní nebo fakultativně anaerobní, gramnegativní, nesporulující tyčinky schopné fermentovat laktózu za vzniku plynu a kyseliny. Většina bakteriálních rodů, které tvoří skupinu koliformních bakterií (např. *Escherichia*, *Klebsiella* a *Serratia*), patří do čeledi *Enterobacteriaceae*, zatímco nejméně jeden rod s kmeny uznávanými jako koliformní, *Aeromonas*, patří do čeledi *Aeromonadaceae* (Martin et al. 2016). Vzhledem k různorodosti koliformních bakterií navrhli Leclerc et al. (2001) tři kategorie koliformních bakterií na základě taxonomických a fyziologických znaků: „termofilní“ (zahrnující *E. coli* fekálního původu), „termofilní a všudypřítomné“ a „psychrotrofní“, které jsou čistě environmentální.

Z „termofilních“ koliformních bakterií, které se vyznačují schopností růst a fermentovat laktózu při 44-45 °C, je jediným spolehlivým indikátorem fekálního znečištění *E. coli*. Tento organismus nepřežívá dobře v prostředí mimo trávicí trakt teplokrevných živočichů, proto není kontaminantem životního prostředí (Martin et al. 2016). Ostatní bakterie z této skupiny, včetně některých druhů *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Citrobacter*, sice mohou pocházet z výkalů, ale mohou pocházet i z prostředí, tudíž se nepovažují za spolehlivý indikátor fekální kontaminace.

Naproti tomu „psychrotrofní“ environmentální koliformní bakterie mají schopnost růst a fermentovat laktózu při chladirenských teplotách, ale nerostou při teplotách nad 38 °C, což je odlišuje od termofilní skupiny. Za environmentální koliformní bakterie se považují příslušníci rodů *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* a další.

„Termofilní a všudypřítomné“ koliformní bakterie pocházejí z různých přírodních prostředí včetně půdy, vody, vegetace, hmyzu, zemědělských produktů, dřevěných nádrží, trávy, siláží a čerstvé zeleniny. Zástupci této skupiny se vyskytují v rodech *Klebsiella*, *Enterobacter* a *Citrobacter* (Leclerc et al. 2001; Martin et al. 2016).

Přítomnost koliformních bakterií tedy z části indikuje fekálního znečištění, avšak ve většině je kontaminantem životního prostředí. Koliformní bakterie se snadno a rychle zjišťují a nevyskytují se v pasterovaných mléčných výrobcích, které nebyly vystaveny kontaminaci po zpracování. Například však *Pseudomonas* spp. často kontaminují mléčné výrobky po pasterizaci, ale testy na koliformní bakterie je nezjišťují (Martin et al. 2016). Koliformní bakterie se množí ve vlhkém prostředí a ve zbytcích mléka ulpělých na dojícím zařízení, a mohou se tak stát hlavním kontaminantem získávaného mléka (Robinson 2005).

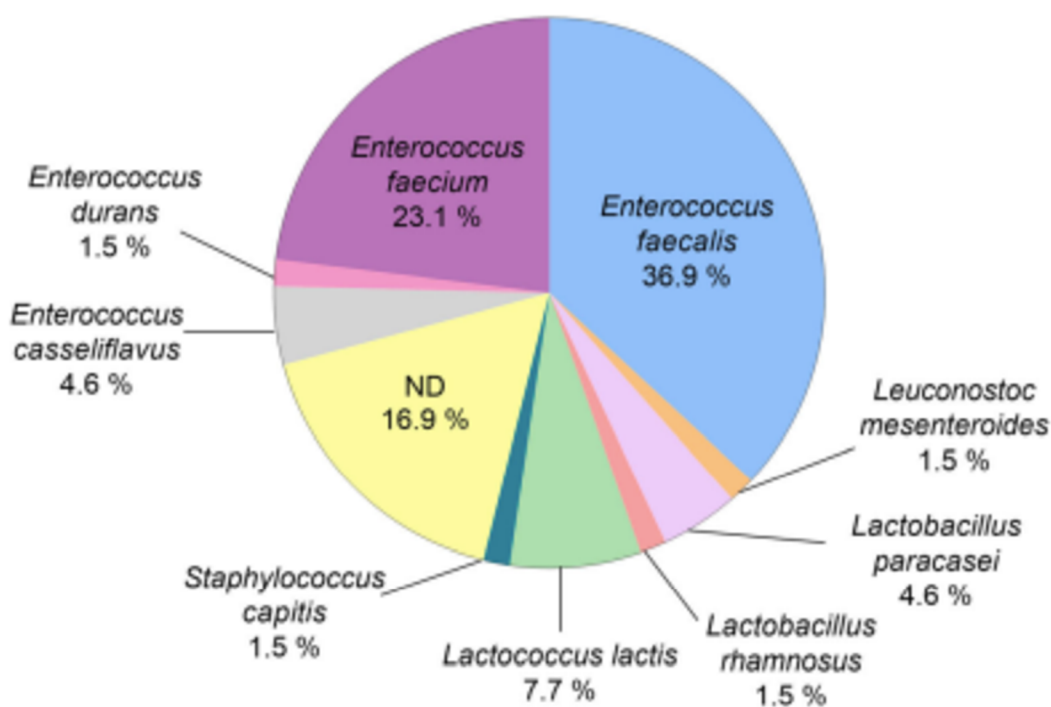
### 3.4.3 Probiotické bakterie

#### 3.4.3.1 Bakterie mléčného kvašení

Heterogenní a zároveň dominantní bakteriální skupinu v BM (Quigley et al. 2013) představují bakterie mléčného kvašení (BMK), které jsou schopny fermentovat různé substráty primárně za vzniku kyseliny mléčné. Heterofermentativní BMK produkují kromě kyseliny

mléčné i jiné produkty: kyselinu octovou, ethanol, oxidu uhličitý a kyselinu mravenčí (Kleerebezem & Hugenholtz 2003). BMK jsou zastoupeny zejména grampozitivními, nesporulujícími, anaerobními nebo aerotolerantními a acidotolerantními bakteriemi.

Na obrázku č. 3 je zobrazeno zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů identifikovaných pomocí MALDI-TOF v syrovém buvolím mléce (Breyer et al. 2020). Nejčastěji se vyskytující rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* a *Enterococcus* jsou zároveň i často skloňovány díky svým probiotickým účinkům (Quigley et al. 2013; Breyer et al. 2020). Za probiotika se považují živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány v přiměřeném množství, přinášejí zdravotní prospěch hostiteli (FAO 2002). Některé z funkčních účinků pravidelné konzumace probiotik popsanych v literatuře jsou následující: snížení hladiny cholesterolu (Khare & Gaur 2020), snížení příznaků gastrointestinálních onemocnění (Harper et al. 2018), stimulace imunity (Santos et al. 2020) či účinnost probiotik při léčbě obezity (Kadooka et al. 2013; Sharafedinov et al. 2013; Razmpoosh 2020). Probiotický potenciál BMK je hojně studován vzhledem k tomu, že tyto bakterie zvládnou tolerovat nepříznivé podmínky gastrointestinálního traktu, jako je kyselé prostředí díky HCl, expozice žlučovým kyselinám, kompetice o živiny s dalšími mikroorganismy a také adhezivní a agregační schopnosti přilnout ke střevnímu epitelu (Bezkorovainy 2001; Vijaya 2015).



**Obrázek č. 3** – Profil BMK v syrovém buvolím mléce (Breyer et al. 2020)

Některé BMK mohou vykazovat antagonistickou aktivitu vůči jiným mikroorganismům. Breyer et al. (2020) zaznamenali antagonistické působení *Lactobacillus lactis* (*L. lactis*), *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*), *Lactobacillus paracasei* vůči *Listeria monocytogenes*. Rovněž antagonistické chování bylo pozorováno u *L. lactis*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) proti *Pseudomonas aeruginosa* (Shafakatullah & Chandra 2014; Shi & Maktabdar 2022). Antibakteriální citlivost

na přítomnost *L. acidophilus* a *L. rhamnosus* se projevuje i u *E. coli* a *Staphylococcus aureus* (Shafakatullah & Chandra 2014). Současně je nutné zmínit, že bylo mnoho kmenů ze skupiny BMK zkoumáno z důvodu jejich antifugální aktivity, zejména *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. a *Leuconostoc* spp. Především zástupci z kmenu *Lactobacillus* spp. mají antifugální účinky proti širokému spektru hnilobných plísní jako například *Penicillium* či *Mucor* (Shi & Maktabdar 2022).

Vysoký obsah BMK v syrovém mléce vede k nežádoucímu kysnutí, sensorickým vadám či změnám textury mléka, a proto se navrhuje přijmout účinná preventivní opatření pro předcházení zmíněnému stavu překyselení (Drake et al. 1999; Navrátilová a kol. 2012; Han et al. 2007).

#### 3.4.3.2 Bifidobakterie

Skupinu grampozitivních, nesporulujících, heterofermentativních striktně anaerobních tyčinek představují bakterie rodu *Bifidobacterium*, které současně přirozeně osídlují lidský gastrointestinální trakt (Schell et al. 2002). Vzhledem k tomu, že bifidobakterie produkují kyselinu mléčnou jako jeden ze svých hlavních konečných produktů fermentace, jsou často mylně řazeny mezi bakterie mléčného kvašení (LAB), i když jsou fylogeneticky odlišné (Pokusaeva et al. 2011).

Některé rody, zejména *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantum*, *B. lactis*, *B. bifidum*, lze považovat za probiotikum, tedy mikroorganismus, který odolává žaludeční HCL a žluči, prolifерuje intestinem, spolupracuje na mikrobiální rovnováze, a je tak prospěšný zdraví. Současně je nutné zmínit, že v rámci probiotických charakteristik i *Bifidobacterium longum* má antibakteriální účinky vůči patogenním mikroorganismům, konkrétně na *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* či *Staphylococcus aureus* (Shafakatullah & Chandra 2014).

*Bifidobacterium* spp. patří k přirozené mikrobiotě obývající intestinální trakt člověka, nýbrž v syrovém mléce hospodářských zvířat by se tento rod vyskytovat neměl. Jejich přítomnost byla dokonce navržena jako indikátor fekálního znečištění a nesprávné hygieny na farmě (Delcenserie et al. 2005).

#### 3.4.4 Patogenní mikroorganismy v mléce

Mimo přítomných indikátorových a zdraví prospěšných mikroorganismů se v mléce můžeme sekat i s mikroorganismy schopných vyvolat onemocnění. K patogenním zástupcům vyskytujících se v syrovém mléce patří *Salmonella* spp., určité rody *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* a *Campylobacter* spp. (Mendonca et al. 2020).

##### 3.4.4.1 Escherichia coli

*Escherichia coli* je nesmírně rozmanitý druh, včetně kmenů s malým nebo nulovým patogenním potenciálem a kmenů, které jsou vysoce infekční a virulentní vůči lidem i zvířatům (Desvaux et al. 2020). Kmeny *E. coli* kolonizují gastrointestinální trakt již kojencům a koexistují s hostitelem, přičemž působí vzájemně prospěšně po celá desetiletí. Tyto komenzální kmeny zřídka způsobují onemocnění u zdravých hostitelů, protože postrádají specializovanou virulenci (Herzer et al. 1990; Escobar-Páramo et al. 2004). Nicméně ostatní



kmeny vykazují virulenci a jsou dokonce schopné se adaptovat na nové niky a způsobovat střevní a mimostřevní onemocnění (Le Gall et al., 2007; Tenaillon et al., 2010). V důsledku toho lze kmeny *E. coli* rozdělit do tří skupin: komenzální/probiotické kmeny, střevně patogenní kmeny a extraintestinálně patogenní kmeny.

**Tabulka č. 2** – Přehled intestinálních patotypů *E. coli* (Croxen et al. 2013)

Patotyp	Hostitel	Místo kolonizace	Onemocnění	Zdroj kontaminace	Léčba
EPEC	Děti do 5 let, dospělí při vysoké inokulaci	Tenké střevo	Silný vodnatý průjem	Lidé, zvířata	Rehydratace, antibiotika pro přetrvávající případy hydratace
STEC	Děti, dospělí	Distální ileum, tlusté střevo	Vodnatý průjem, hemoragická kolitida, HUS*	Potraviny, voda, lidé, zvířata	Rehydratace
EIEC/ <i>Shigella</i>	Děti do 5 let, dospělí, cestovatelé, imunokompromitované osoby	Tlusté střevo	Shigelóza/bacilární úplavice, potenciální HUS*	Potraviny, voda, lidé, zvířata	Rehydratace, antibiotika
EAEC	Dospělí, děti, imunokompromitované osoby	Tenké a/nebo tlusté střevo	Cestovatelský průjem, HUS*, perzistentní průjem	Potraviny, dospělí příležitostným nosičem	Antibiotika, rehydratace, probiotika
ETEC	Děti do 5 let, cestovatelé	Tenké střevo	Vodnatý průjem	Potraviny, voda, lidé, zvířata	Rehydratace, antibiotika
DAEC	Děti (narůstající závažnost od 18 měsíců do 5 let), dospělí	Střeva	Přetrvávající vodnaté průjmy u dětí, o kterých se předpokládá, že přispívají ke vzniku Crohnovy choroby u dospělých.	Neznámý	Rehydratace
AIEC	Dospělí, děti	Tenké střevo	Crohnova choroba	Neznámý	Antibiotika, chirurgická resekce

\*HUS= hemolyticko-uremický syndrom

Střevně patogenní *E. coli*, vzácně se vyskytující ve fekální flóře zdravých hostitelů, mohou způsobovat gastroenteritidy či kolitidu (Kaper et al. 2004). U intestinálních patogenních

*E. coli* se rozlišuje několik patotypů: enteropatogenní *E. coli* (EPEC), *E. coli* produkující Shiga toxin (STEC) (např. enterohemoragická *E. coli* [EHEC]), *Shigella*/enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC), difuzně adherentní *E. coli* (DAEC) a enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) a adherentní invazivní *E. coli* (AIEC) (Croxen et al. 2013). Přehled patotypů a onemocnění s nimi spojených je uveden v tabulce č. 2. Extraintestinální *E. coli* jsou fakultativní patogeny zodpovědné za 80 % infekcí močových cest. Infekce vede k velké části nozokomiálních infekcí močových cest (50 %) a je hlavní příčinou abscesů (Gransden et al. 1990; Nielubowicz & Mobley 2010).

Výskyt *E. coli* v potravinářském výrobku naznačuje mimo jiné možnost výskytu dalších mikroorganismů fekálního původu, včetně patogenních mikroorganismů. Pro hodnocení bezpečnosti potravinářských výrobků znamená přítomnost *E. coli* větší pravděpodobnost nebezpečí než přítomnost jiných koliformních bakterií. Vzhledem k tomu, že *E. coli* je snadno zničena tepelným zpracováním, její přítomnost v tepelně zpracovaných potravinách indikuje kontaminaci způsobenou po zpracování dané potraviny. Ke kontaminaci může dojít z nedostatečně vyčištěného a dezinfikovaného prostředí, od zaměstnanců nebo z kontaminovaných syrových potravin (Mendonca et al. 2020).

#### 3.4.4.2 Stafylokoky

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporující, fakultativně anaerobní, kataláza pozitivní koky, které se shlukují do tvaru hroznů. Rod zahrnuje přes 50 druhů, ve většině nepatogenních a přirozeně se vyskytujících na kůži či sliznicích (Foster 1996).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) je v přírodě široce rozšířený. Jako jeden z mála patří ke koagulázopozitivním stafylokokům a produkuje tedy koagulázu, která přeměňuje fibrinogen na fibrin (Foster 1996). Je schopný růst v prostředí až s 15% obsahem chloridu sodného, a náleží tedy k halotolerantním mikroorganismům. Může růst v rozmezí teplot 7- 48,5 °C s optimem růstu při 30-37 °C a v rozmezí pH 4,2 - 9,3 s optimem růstu 7 - 7,5. Je přirozeně přítomen na kůži (nejčastěji v oblasti nozder a úst) a na sliznici (nejčastěji v oblasti hltanu, intestiálního a urogenitálního traktu) většiny teplotokrevných živočichů včetně všech hospodářských zvířat a člověka. Patří také k přirozené mikrobiotě osídlující vemen. Tento patogen se považuje za oportunní mikroorganismus, a zatímco ve zvířecím hostiteli může existovat jako neškodný komenzál, může rovněž způsobovat širokou škálu onemocnění (Chaibenjawong & Foster 2011; Navrátilová a kol. 2012) počínaje povrchovými infekcemi na kůži. Dále může způsobit závažnější infekce, zejména u osob oslabených chronickým onemocněním, úrazem, popáleninami nebo imunosupresí. Mezi tyto infekce patří pneumonie, hluboké abscesy, osteomyelitida, endokarditida, flebitida, mastitida a meningitida, které jsou častěji spojovány spíše s hospitalizovanými pacienty než se zdravými jedinci (Foster 1996). Současně může být i původcem alimentárního onemocnění (Navrátilová a kol. 2012). Pokud podmínky v potravinách umožní jeho růst přibližně na 10<sup>6</sup> KJT/ ml, může produkovat tepelně stabilní enterotoxin v dostatečné koncentraci, aby způsobil otravu spotřebitele (Mendonca et al. 2020). Stafylokoková enterotoxikóza, způsobena stafylokokovými enterotoxiny, je provázena nauzeou, bolestmi břicha a hlavy, zvracením a průjmem, které odezní během 24-48 hodin. Lze onemocnění preventivně předcházet pasterací, chlazením či odpovídající sanitací. Vysoká

teplota však usmrtí pouze mikroorganismus, toxiny jsou vůči teplotám okolo 100 °C odolné (Navrátilová a kol. 2012).

Nicméně výskyt *S. aureus* v potravinách, které prošly procesy usmrcující patogen, obvykle svědčí o kontaminaci ze strany pracovníků manipulujících s potravinami. V menší míře přispívá ke kontaminaci potravin kontakt zpracovávané potraviny s kontaminovaným zařízením nebo vzduchem. Potraviny kontaminované enterotoxiny produkované kmeny *S. aureus* představují významné riziko pro bezpečnost potravin, protože chybí konkurenční mikroorganismy, které inhibují růst patogenu a produkci toxinů (Mendonca et al. 2020).

*S. aureus* nepředstavuje riziko nejen pro lidský organismus, ale také pro zvíře. Řadí se mezi původce mastitidy, zánětu mléčné žlázy, která je velkou ekonomickou zátěží v mlekárenském průmyslu v důsledku snížené užitkovosti a špatné kvality mléka (Huijps et al. 2008). Mastitidy skotu lze rozdělit do tří tříd podle stupně zánětu, a to na klinické, subklinické a chronické mastitidy. Klinická mastitida skotu je zřejmá a snadno zjistitelná podle viditelných abnormalit, jako je červené a oteklé vemeno a horečka u dojnice. Mléko krávy se jeví jako vodnaté s přítomností vloček a sraženin (Khan & Khan 2006). Klinické mastitidy lze dále dělit na perakutní, akutní a subakutní v závislosti na stupni zánětu (Kibebew 2017). Těžké případy klinické mastitidy mohou být i smrtelné (Gruet et al. 2001). Na rozdíl od klinické mastitidy nevykazuje subklinická mastitida žádné viditelné abnormality ve vemenu nebo mléce, ale produkce mléka se snižuje se zvýšením počtem somatických buněk (nad 300 000 buněk v 1 mL) (Abebe et al. 2016). Ztráty, na kterých se podílí subklinická mastitida, je velmi těžké vyčíslit, ale odborníci se shodují, že způsobuje ve stádě větší finanční ztráty než klinické případy (Zhao & Lacasse 2008; Romero et al. 2018). Naopak chronická mastitida je zánětlivý proces, který trvá několik měsíců, přičemž ke klinickým vzplanutím dochází v nepravidelných intervalech.

Klinická mastitida může být způsobena zejména *Streptococcus uberis* (22,1 %), *Escherichia coli* (16 %) a koagulázopozitivními stafylokoky (15,8 %), zatímco u subklinických mastitid se převážně vyskytují koagulázopozitivní stafylokoky (30,2 %), koagulázonegativní stafylokoky (13,7 %) a *Streptococcus dysgalactiae* (9,3 %). Některé zprávy naznačují, že vhodnými kontrolními postupy jsou segregace a/nebo selektivní vyřazování infikovaných zvířat. Jiní však zjistili, že účinným plánem kontroly je také používání správných postupů dojení. *S. aureus* však představuje 10 až 12 % všech klinických infekcí mastitid (Tenhagen et al. 2009).

Proces infekce mastitidou začíná penetrací do struku strukovým kanálkem, obvykle během dojení, a následným uchycením mikroba ve tkáni mlékojemu. Povrch strukového kanálku je pokryt keratinovou vrstvou vykazující antibakteriální aktivitu (Collins et al. 1998), nicméně poranění struku může znamenat narušení této bariéry a vniknutí nežádoucích mikroorganismů do tkáně zvířete. *S. aureus* často kolonizuje mléčné žlázy a strukové kanálky zejména v oblasti jeho ústí, kde může setrvávat několik týdnů, aniž by penetroval do strukového mlékojemu. Jakmile však *S. aureus* pronikne, v rámci adaptace na nové prostředí se začne množit a uvolňovat toxiny. Tento stav je známý jako mastitida (Schalm et al. 1971; Smith 1977).

Legislativou stanovené limity (Nařízení Komise 1441/2007) se nevztahují přímo na syrové mléko, nýbrž na sýry vyrobené ze syrového mléka, u kterých se udává maximální limit koagulázopozitivních stafylokoků 10 000 KTJ/mL (Nařízení Komise 1441/2007).

### 3.4.4.3 *Salmonella* spp.

*Salmonella* je gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinka z čeledi *Enterobacteriaceae*, schopná růst v přítomnosti i absenci kyslíku. Optimálně roste při teplotě 35 až 37 °C; může však růst v rozmezí teplot 5-46 °C. Pasterizační teploty nepřežívá a je citlivá na nízké pH (4,5 nebo méně). Obecně neroste při aktivitě vody (aW) 0,94 nebo nižší, což se však může u jednotlivých sérovarů lišit na základě přítomnosti určitých faktorů prostředí včetně dostupnosti živin, pH, teploty, plynné atmosféry a antibakteriálních látek. Salmonely mohou přežít v suchém prostředí velmi dlouhou dobu (Bell & Kyriakides 2002). Některé sérovary, jako např. *Salmonella Typhimurium* (*S. Typhimurium*) a *Salmonella Enteritidis* (*S. Enteritidis*) infikují široké spektrum živočišných hostitelů, např. však *Salmonella typhi* je omezena na konkrétní hostitele - člověka (Stevens et al. 2009).

Salmonely jsou v přírodním prostředí široce rozšířeny díky svým četným rezervoárům. Mnoho volně žijících i domácích zvířat, ptáků, plazů a hlodavců je ve skutečnosti primárním zdrojem salmonel díky kolonizaci trávicího traktu. Infikovaní lidé mohou tento patogen přenášet ve svém gastrointestinálním traktu a vylučovat ho ve výkalech ještě dlouho po odeznění onemocnění. *Salmonella* se však neustále vylučuje do životního prostředí i prostřednictvím zvířecích výkalů a může přežít v sušeném výkalu, půdě a vegetaci po delší dobu (Bell & Kyriakides 2002; Waldner et al. 2012). Dlouhodobé přežívání tohoto patogenu zvyšuje jeho šance na infikování zvířecích hostitelů prostřednictvím požití kontaminované vegetace (O'Mahony et al. 1990).

V současné době existuje více než 2600 sérovarů salmonel (Guibourdenche et al. 2010), z nichž *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium* jsou nejčastějšími patogeny z potravin (EFSA 2007). Způsobují salmonelózu, která patří k nejčastěji hlášeným onemocněním z potravin a představuje celosvětový problém veřejného zdraví (CDC 2018). Salmonelóza patří ke gastrointestinálním onemocněním, které se mohou vyvinout v život ohrožující invazivní infekce. Také může způsobit smrt u dětí a osob s oslabenou imunitou (Scallan et al. 2011; CDC 2018). Její klinický obraz zahrnuje průjem, dehydrataci, horečku, anorexii a septikémii. Závažnost onemocnění závisí na virulenci, patogenitě, infekční dávce, imunologickém stavu a věku hostitele. V řadě případů se však jedná o subklinické onemocnění (Kemal 2014).

Salmonely vyskytující se již v nízkém počtu, tj. pouze 15-100 KTJ/ 1ml v potravinách mohou představovat riziko pro veřejné zdraví (Almeida et al. 2013). Nicméně testování mléka a mléčných výrobků na *Listeria* a *Salmonella* se obvykle rutinně neprovádí, pokud to nevyplývá z historických nálezů (Mendonca et al. 2020).

### 3.4.4.4 *Listeria* spp.

Rod *Listeria* je grampozitivní a fakultativně anaerobní mikroorganismus netvořící spory. Roste při širokém rozsahu teplot (1 - 45 °C), přičemž chladírenské či mrazírenské podmínky přežívá, nicméně pasteračními teplotami nad 80 °C dochází k devitalizaci. Tyto bakteriální tyčinky přežívají extrémní podmínky, ať už co se týče pH či přítomnosti soli (Navrátilová a kol. 2012; Halter et al. 2013; Mendonca et al. 2020). Podobně jako např. *S. aureus*, mohou listerie po adhezi na vhodný povrch vytvořit mnohvrstevný biofilm představující závažný problém jak ve zdravotnictví, tak v potravinářském průmyslu. Rizikem

je především vysoká odolnost biofilmů k antimikrobiálním látkám, čistícím a desinfekčním prostředkům a možnost přenosu genů rezistence mezi buňkami biofilmu (Fenlon 1999). Charakteristickým znakem pro tento rod je zároveň produkce katalázy rozkládající peroxid vodíku na H<sub>2</sub>O a O<sub>2</sub>, fermentace glukózy za vzniku organické kyseliny či hydrolýza eskulinu. Rod *Listeria* zahrnuje deset druhů: *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Listeria ivanovii* (*L. ivanovii*), *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii* a *Listeria weihenstephanensis* (Halter et al. 2013). K často skloňovaným a významným patogenům patří *L. monocytogenes*, ohrožující zvířata i člověka (Navrátilová a kol. 2012).

*Listeria monocytogenes* se řadí mezi ubikvitární mikroorganismy. Byla izolována z mnoha zdrojů včetně vody, půdy, bahna, travin na pastvinách, siláže, výkalů domácích a divokých zvířat a rozkládající se vegetace (Swaminathan 2001), přičemž primárním stanovištěm tohoto patogenu je půda a rozkládající se vegetace, kde žije jako saprofyt. Ideální podmínky pro růst *L. monocytogenes* vytváří nedostatečně fermentované nebo plesnivé siláže s pH 5,0 - 5,5 které mohou představovat zdroj infekce u hospodářských zvířat (Fenlon 1986; Navrátilová a kol. 2012). Současně lze nalézt tento patogen i v trávicím traktu zdravého člověka či hospodářských zvířat (Navrátilová a kol. 2012). Nutno neopomenout fakt, že koliformní bakterie a BMK mohou na *L. monocytogenes* působit inhbičně (Navrátilová a kol. 2012; Aragon-Alegro 2021).

Široká škála potravin, včetně mléčných výrobků, jako např. syrové mléko, pasterizované mléko, čokoládové mléko či máslo byly spojeny s výskytem ohnisek lidské listeriózy (Maijala et al. 2001). Listerióza patří k infekčním onemocněním mající různé formy projevu: mírný průběh listeriózy doprovází příznaky podobnými chřipce, gastrointestinální forma se projevuje horečkami, zvracením, průjmem či abdominálními bolestmi a invazivní listerióza se systémovými příznaky může vyústit v meningitidu či encefalitidu a být vážnou hrozbou pro těhotné ženy, novorozence, starší populaci či osoby se sníženou imunitou (Navrátilová a kol. 2012; FDA 2018). Při onemocnění listeriózou v těhotenství může dojít ke spontánnímu potratu, předčasnému porodu, porodu mrtvého dítěte či infekci plodu, kdy dochází k tzv. neonatální listerióze. Ačkoliv některé projevy listeriózy nejsou příznivé, nevyskytuje se tak často, ovšem mortalita dosahuje 20-30 %. Mortalita u neonatální listeriózy bohužel dosahuje obdobných hodnot (CDC 2016). Infekční dávka onemocnění není jednoznačná, u zdravých osob odpovídá 10<sup>8</sup> buněk, u rizikových jedinců 10<sup>2</sup> buněk (Navrátilová a kol. 2012).

Vzácně může *Listeria monocytogenes* způsobit mastitidu u zvířat, jelikož patří k typickým mikroorganismům osídlující povrch mléčné žlázy a struky skrze půdu, podestýlku, výkaly či krmivo. Častější je však sekundární kontaminace syrového mléka při dojení nebo postpasterační kontaminace v potravinářských zařízeních. Základním předpokladem získávání kvalitního mléka a omezení jeho mikrobiální kontaminace je správně provedená toaleta vemene před vlastním dojením, ošetření struků po nadojení, dobrá hygienická úroveň v chovech hospodářských zvířat a zkrmování kvalitních krmiv, zejména řádně prokysaných siláží s hodnotou pH < 4,0, při které listerie dlouhodobě nepřežívají. Zmíněné postupy slouží jako významná profylaxe před onemocněním způsobeným *L. monocytogenes* (Navrátilová a kol. 2012). V souladu se správnou hygienickou a sanitační praxí v potravinářských závodech je zásadní kontrolovat a obnovovat nepatogenní *Listeria* spp., protože ty mohou sloužit jako

indikátorové organismy pro pravděpodobnou přítomnost *L. monocytogenes* (Lakicevic et al. 2010). *L. monocytogenes* by dle ČSN 11290-1 neměla být přítomna ve 25 g zkoumaného vzorku před tím, než potravina opustí bezprostřední kontrolu provozovatele potravinářského podniku, který ji vyrobil. U produktů uvedených na trh během doby údržnosti by počet *L. monocytogenes* neměl přesahovat 100 KTJ/g (ČSN 11290-2).

#### 3.4.4.5 Další patogenní mikroorganismy

K mikroorganismům mající patogenní potenciál a kontaminujících syrové mléko lze řadit i *Clostridium* spp. či *Bacillus cereus*.

*Bacillus cereus* (*B. cereus*) patří ke grampozitivním, pohyblivým, fakultativně anaerobním, sporotvorným tyčinkám, u kterých probíhá sporulace za přítomnosti kyslíku. Buňky a spory *B. cereus* jsou v přírodě široce rozšířené a běžně se nacházejí v prachu, půdě, trávicím traktu zdravých lidí a členovců žijících v půdě (Margulis et al. 1998; Ray & Bhunia 2013). Na pastvě může *B. cereus* kontaminovat vemena krav nebo se dostat k dojnicím prostřednictvím krmiva, podestýlky, půdy, vzduchu či skrze dojící zařízení (Magnusson et al. 2007; Navrátilová a kol. 2012), což následně vede ke kontaminaci mléka. Perzistenci *B. cereus* v prostředí, zejména při zpracování potravin, lze přičítat jeho schopnosti vytvářet biofilmy, které jej chrání před antimikrobiálním působením sanitačních prostředků (Ryu & Beuchat 2005). Velmi výhodné jsou také vysoce adhezivní vlastnosti jeho endospor a schopnost přežít tepelné ošetření (Stenfors Arnesen et al. 2008), čímž se mohou podílet na kažení pasterovaných či sterilovaných mléčných výrobků. Nežádoucí změny mohou způsobovat i v syrovém mléce, a to zejména sladkým srážením mléka (Navrátilová et al. 2012).

Buňky *B. cereus* jsou původci řady toxinů, které produkují během exponenciální nebo stacionární fáze růstového cyklu patogenu nebo ve střevním traktu člověka při lýze patogenu (Ray & Bhunia 2013). Jako příklady toxinů lze jmenovat cytotoxin K, enterotoxin T, enterotoxin FM, emetický (cereulid) a průjmové toxiny. Často dochází k alimentární intoxikaci způsobenou emetickým toxinem, která se nazývá emetický syndrom a je doprovázena nauzeou a zvracením. Průjmové enterotoxiny mohou rovněž často postihnout lidský organismus s příznaky jako vodnatý průjem, nauzea, abdominální bolesti či zvracení (Navrátilová a kol. 2012; Ray & Bhunia 2013).

Mezi další patogenní mikroorganismy kontaminující syrové mléko lze řadit grampozitivní, anaerobní, sporotvorné tyčinky rodu *Clostridium*, jejichž zdrojem je zejména půda, hnůj, voda, odpadní vody a prach. Současně mohou být součástí i lidské či zvířecí mikrobioty. Kontaminace syrového mléka je často zapříčiněna zkrmováním dojnic nekvalitní siláží (Navrátilová a kol. 2012). Mezi hlavní zástupce spjaté s kažením mléčných výrobků lze řadit *Clostridium tyrobutyricum*, *Cl. butyricum* a *Cl. sporogenes*, které způsobují pozdní duření sýrů v důsledku produkce CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, kyseliny máselné a kyseliny octové. Nicméně za patogenní druhy se považují *Cl. perfringens* a *Cl. botulinum*. Prostřednictvím mléka a mléčných výrobků se *Cl. perfringens* dostane do střeva člověka, kde se díky produkci toxinů rozvine akutní zánět doprovázený průjmem a abdominálními bolestmi (Navrátilová a kol. 2012). Konzumace potravin obsahujících potentní neurotoxin *Cl. botulinum* má za následek smrtelné onemocnění z potravin, tzv. potravinový botulismus. Pouze malé množství neurotoxinu (1 ng/kg tělesné hmotnosti) je zapotřebí k těžkému průběhu onemocnění a smrti. Po konzumaci potravin

obsahujících tento toxin se toxin vstřebává trávicím traktem a dostává se do oběhového systému. Poté se šíří do periferních nervů, kde narušuje uvolňování neurotransmiteru acetylcholinu. Současně se dostává do krevního oběhu, kde blokuje nervové impulzy, což má za následek ochrnutí. Botulismus se tedy projevuje neurologickými příznaky, potížení s dýcháním, polykáním, ale i gastroenteritidou (Ray & Bhunia 2013).

### 3.4.5 Mikrobiota sýrů

Pro porovnání zastoupení mikroorganismů v mléce a mléčných výrobců je na místě zmínit mikrobiotu sýrů, které patří k hlavním mléčným produktům vyráběných z buvolího mléka. Mozzarella patří k nejčastěji vyráběným sýrům připravovaných z buvolího mléka, a proto se značné kvantum studií zaměřuje právě na jeho mikrobiální kvalitu. Počet psychrotrofů v sýru Mozzarella vyrobeném v Súdánu odpovídá 5,69 log KTJ/g (Abdalla & Ibrahim 2010), zatímco ve vzorcích buvolího sýra Mozzarella vyrobeného v Itálii byly zjištěny o něco nižší hodnoty jak psychrotrofních bakterií, tak koliformních bakterií, a to 3,15 log KTJ/g a 2,77 log KTJ/g (Losito et al. 2014; Pisano et al. 2016).

Několik studií provedených na buvolí Mozzarelle vyráběné v Itálii ukazuje, že kvasinky představují významnou část přirozené mikrobioty, s celkovými počty v rozmezí 4 až 6 log KTJ/g (Aponte et al. 2010; Pisano et al. 2016). Zastoupeny jsou zejména *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* a *Candida lusitanae* (Aponte et al. 2010). Pokud jde o BMK, De Candia et al. (2007) uvádí poměrně široké rozmezí počtu BMK ve vzorcích sýru Mozzarella vyrobeného v Itálii. Konkrétně zmiňuje, že termofilní laktobacily se vyskytují v množství 5,2-8,4 log KTJ/g, mezofilní laktobacily v množství 2-8,4 log KTJ/g, zatímco streptokoky, laktokoky a enterokoky kolísají nejvíce, a to od 1,8 do 8,8 log KTJ/g. Podle Serraina et al. (2013) je počet BMK ve vyzrálém sýru Mozzarella vyrobeném v Itálii na úrovni 8,1 log KTJ/g a podobné počty uvádí také Losito et al. (2014).

Pomocí vysoce výkonného sekvenování DNA mohl Ercolini et al. (2012) individualizovat mikroorganismy přítomné v sýru Mozzarella z buvolího mléka. Zjistil, že mikrobiota dvou sýrů vyrobených v Salernu (a) a Casertě (b) v Itálii zahrnuje kmeny *L. delbrueckii* (a = 10 %, b = 50 %), *S. thermophilus* (40 % u obou) a *L. lactis* (a = 1 %, b = asi 5 %). Kromě toho byly v sýrech vyrobených v Salernu zjištěny kmeny *Lactobacillus helveticus* (> 20 %) a *L. kefiranofaciens* (10 %), zatímco ve vzorcích z Caserty byly identifikovány psychrotrofní *Acinetobacter spp.* a *Pseudomonas spp.* s nízkým výskytem. Druhovou identifikaci laktobacilů a dalších BMK izolovaných z buvolího sýra Mozzarella studovali také Devirghis et al. (2008) pomocí analýzy ARDRA a sekvenční analýzy genu 16S rDNA. Ze skupiny laktobacilů byly nejčastěji pozorovány *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei* a *L. delbrueckii*. Mikrobiální diverzita BMK izolovaných z brazilského buvolího sýra Mozzarella byla charakterizována pomocí RAPD-PCR a sekvenování genu 16S rDNA. Identifikované bakterie zahrnovaly *S. thermophilus* (5 %), *Enterococcus faecium* (15 %), *E. durans* (35 %), *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (10 %), *L. fermentum* (10 %), *L. casei* (10 %), *L. bulgaricus* (10 %) a *L. helveticus* (5 %) (Silva et al., 2015). Ercolini et al. (2001) zkoumali mikrobiální společenstva přírodních syrovátkových kultur pro výrobu sýra Mozzarella z vodního buvola pomocí polyfázové PCR-DGGE analýzy. Jako hlavní složky

identifikovali *S. thermophilus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *Lactobacillus crispatus*, *L. fermentum* a *E. faecalis*.

### 3.5 Jakostní kritéria mléka

Za syrové mléko se dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 o zvláštních hygienických pravidel pro potraviny živočišného původu považuje mléko, které nebylo podrobena teplotě nad 40 °C. Syrové mléko musí pocházet od zdravých zvířat, která nejvíce známky zranění vemene, nebyla vystavována nepovoleným látkám či přípravkům a jsou z chovu prostého nakažlivých chorob přenosné mlékem na člověka. V případě mikrobiologické jakosti se u buvolího mléka sleduje hlavně celkový počet mikroorganismů a doplňkové znaky jakosti.

Provozovatelé potravinářských podniků musí zajistit, aby celkový počet mikroorganismů (CPM) v syrovém buvolím mléce nepřesahoval 1 500 000 KTJ v 1 mL při 30 °C dle Nařízení EP a Rady (ES) č. 853/2004 a Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006. Jedná se o klouzávkový geometrický průměr a je nutné provádět 2 kontroly měsíčně. V případě, že je mléko určeno pro potravinářské zpracování, které nezahrnuje tepelnou úpravu, musí provozovatelé potravinářských podniků zajistit  $CPM \leq 500\,000$  KTJ v 1 mL při 30 °C. Na rozdíl od mléka kravského se při kontrole mikrobiologické jakosti nezohledňuje počet somatických buněk.

Mikrobiologické znaky jakosti doplňuje sledování psychrotrofních a termorezistentních mikroorganismů, sporotvorných anaerobních a koliformních bakterií, mezofilních a psychrotrofních aerobních sporulátů, které jsou však doprovodně sledovány převážně u kravského mléka. Pro mléko buvolí zatím kritéria stanovena nejsou.

Kvasinky a plísně patří k mikroorganismům schopných se pomnožovat i při teplotách nižších než 10 °C, z toho důvodu spadají pod zástupce psychrotrofních mikroorganismů. Počet psychrotrofních mikroorganismů v mléce by neměl při teplotě 30 °C přesáhnout 50 000 KTJ/mL. Nicméně nutno podotknout, že zmíněný údaj se vyskytoval v ČSN 570529, které skončila platnost v roce 2015 a nebyla nahrazena. Lze ji tedy považovat za orientační.

Koliformní bakterie patří k běžně se vyskytujícím mikroorganismům v lidském i zvířecím intestinálním traktu, ale zároveň slouží jako indikátoři fekálního znečištění mléka a mléčných výrobků (Chatterjee et al. 2006). Jejich přítomnost v mléce indikuje možnou existenci střevních patogenů, které mohou ohrozit lidské zdraví (Gürler et al. 2013). Povolný počet koliformních bakterií může být nejvýše 1000 KTJ v 1 mL při 30 °C (ČSN 570529), přičemž lze brát tuto hodnotu pouze orientačně z důvodu neplatnosti již zmíněné normy.

V Nařízení Komise 1441/2007 je zmíněn limit pro *E. coli*, bohužel však pouze u másla a smetany vyrobených ze syrového mléka. Počet *E. coli* by v těchto mléčných výrobcích neměl přesáhnout 100 KTJ/g u 2 z 5 vzorků.

Koagulázopozitivní stafylokoky jsou limitovány pouze u sýrů vyrobených ze syrového mléka, kde by počet neměl přesáhnout  $10^5$  KTJ/g u 2 z 5 vzorků dle Nařízení Komise 1441/2007.

Bakterie rodu *Salmonella* spp. by v syrovém mléce nebo mléčných výrobcích z něho vyrobených neměla být přítomna vůbec (Nařízení Komise 1441/2007), což napovídá o patogením potenciálu této bakterie, která vyskytující se již v nízkém počtu (15-100 KTJ/1mL) může představovat riziko pro veřejné zdraví (Almeida et al. 2013).



Pro potraviny určené k přímé spotřebě, tedy vyjma syrového mléka, ale včetně mléčných výrobků vyrobených ze syrového mléka, je stanoven limit *L. monocytogenes* na 100 KTJ/g dle Nařízení Komise 1441/2007.

## 4 Metodika

Praktická část diplomové práce se věnovala hodnocení mikrobiologické kvality buvolího mléka. Byly zjišťovány celkové počty aerobních mikroorganismů, počty bifidobakterií, bakterií mléčného kvašení, laktobacilů, kvasinek, plísní, *Escherichia coli*, koliformních bakterií, stafylokoků a *Staphylococcus aureus*. Dále probíhala kvasná zkouška a sledovala se přítomnost patogenů *Listeria monocytogenes* a bakterií rodu *Salmonella* sp. Zmíněné parametry byly sledovány z důvodu častého výskytu a sledovanosti u mléka kravského. Během celé laboratorní práce se pracovalo s aseptickými pomůckami v aseptickém prostředí z důvodu předcházení sekundární kontaminace.

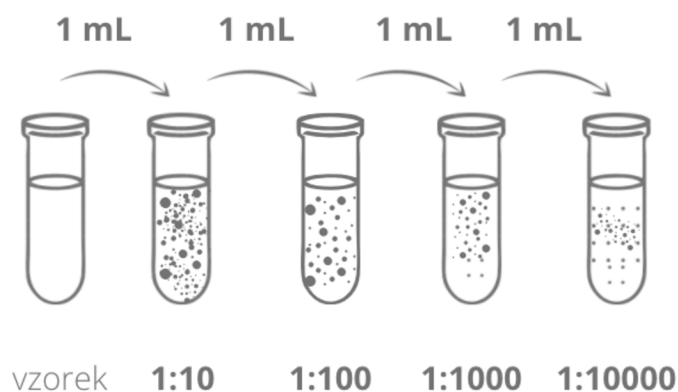
### 4.1 Odběr a skladování vzorků

Celkem bylo analyzováno 10 směsných vzorků buvolího mléka. Odběr vzorků probíhal po dobu 4 měsíců v období listopad 2021 - únor 2022. Během celého období byly analyzovány pouze směsné vzorky od pěti krav. Mléko pocházelo od buvolů chovaných na farmě Ohař, jediné buvolí farmě v České republice, nacházející se nedaleko Příbrami. Vzorky čerstvé nadojeného mléka o objemu 1000 mL byly z farmy převezeny ve sterilních lahvích za chladicích podmínek do Prahy. Na půdě České zemědělské univerzity byly vzorky před samotnou analýzou dále uchovávány při teplotě 4 °C a zpracovány do 6 hodin od odběru. Během jejich transportu, manipulace či skladování nedošlo k tepelnému ohřevu nad 40 °C a analýza tedy proběhla u syrového buvolího mléka.

### 4.2 Ředící řada

Před stanovením jednotlivých počtů mikroorganismů bylo potřeba pro lepší počitatelnost kolonií vzorky naředit pomocí desítkové ředící řady (Obrázek č. 4), při kterém dochází v každém dalším ředění o snížení obsahu sledovaného vzorku o 10 %, a lze tak lépe počítat kolonie vzniklé po inokulaci na plotnách. Vzorky byly ředěny ve sterilním anaerobním ředícím roztoku, který byl připraven z následujících složek:

- Trypton (LP0042, Oxoid) 5 g,
- Nutrient Broth N.2 (Oxoid) 5 g,
- Kvasničný extrakt (LP0021, Oxoid) 2,5 g,
- L-cystein hydrochloride monohydrate (C7880-100G, Sigma-Aldrich) 0,25 g,
- Tween Polysorbate 80 6-066 (Scharlau) 0,5 mL,
- Destilovaná voda 1000 mL.



**Obrázek č.4** – Desítková ředící řada

Ředění bylo provedeno odebráním 1 mL vzorku a převedením do ředícího roztoku o objemu 9 mL. Odtud se po zvortexování odebral opět 1 mL a přenesl do nových 9 mL ředícího roztoku. Tímto způsobem se postupovalo dle potřebného množství ředění pro jednotlivé sledované parametry (tabulka č. 3).

Ředící řada nebyla uplatněná pro průkaznost salmonel, listerií a při provádění kvasné zkoušky. Kompletní mikrobiologický rozbor byl proveden aseptickými kroky s aseptickými pomůckami z důvodu zamezení kontaminace a zkreslení výsledků.

**Tabulka č.3** – Počet zvolených ředění pro jednotlivé sledované parametry

Analyzovaný parametr	Počet ředění
Celkové počty mikroorganismů	0-4
<i>E. coli</i> , koliformní bakterie	0-2
Bakterie mléčného kvašení	0-3
Laktobacily	0-2
Bifidobakterie	0-2
Kvasinky, plísně	0-3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0-3
Rod <i>Staphylococcus</i>	0-3

### 4.3 Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)

Pro stanovení počtu CPM byla použita horizontální metoda provedená dle ČSN 4833. Použité agarové kultivační médium TPCA (Total Plate Count Agar) bylo připraveno z následujících složek:

- Trypton (LP0042, Oxoid) 5 g,
- Kvasničný extrakt (LP0021, Oxoid) 2,5 g,
- D-glukosa monohydrát (14431-43-7, Penta) 1 g,
- Agar technical (LP0012, Oxoid) 9 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Po promíchání a rozpuštění složek v destilované vodě se celý obsah Erlenmeyerovy baňky nechal sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Následně se baňka s obsahem vytemperovala na 44-47 °C ve vodní lázni.

Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci  $10^{-4}$  (ISO 6887) byl vzorek z každého připraveného ředění vnesen po 1 mL na Petriho misku o průměru 90 mm. Následně byly vzorky u každého ředění přelity cca 10 mL neselektivního média a po zatuhnutí inkubovány při 30 °C po dobu 72 hodin za aerobních podmínek. Plotny byly v termostatech uloženy dnem vzhůru.

Počet kolonií se zjistil dle počtu všech narostlých kolonií bez ohledu na jejich tvar, velikost či barvu na plotnách.

#### 4.4 Stanovení počtu koliformních bakterií a *E. coli*

Stanovení počtu koliformních bakterií a *E. coli* probíhalo společně na chromogenní selektivní půdě pro stanovení koliformních bakterií a *E. coli*. Médium použité pro stanovení bylo připraveno smícháním následujících složek:

- T.B.X. Medium (CM0945, Oxoid) 36,6 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Po promíchání a rozpuštění složek v destilované vodě se celý obsah Erlenmeyerovy baňky nechal sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Následně se baňka s obsahem vytemperovala na 44-47 °C ve vodní lázni. Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci  $10^{-2}$  byl vzorek z každého připraveného ředění vnesen po 0,1 mL na již zatuhlé kultivační médium v Petriho miskách (ø 90 mm) a rozetřen sterilní očkovací kličkou. Inkubace všech ředění proběhla za aerobních podmínek v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.

Počet kolonií se vypočítal dle počtu narostlých kolonií na plotnách. Modrozelené kolonie indikují přítomnost  $\beta$ -D-glukuronidázopozitivní *E. coli*. Bakterie *E. coli* je schopná syntetizovat enzym  $\beta$ -D-glukuronidázu, jež štěpí vazby mezi chromoforem 5-bromo-4-chloro-3-indolyl a D-glukuronidem, odštěpením chromoforu dochází k modrozelenému zbarvení kolonií. Bílé kolonie odpovídající velikosti kolonií *E. coli* indikují přítomnost koliformních bakterií.

#### 4.5 Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení (BMK)

Kultivace bakterií mléčného kvašení proběhla za pomoci MRS agarů a tweenu v tomto množství:

- MRS Agar (69964-500G, Sigma-Aldrich) 61,6 g,
- Tween Polysorbate (6-066, Scharlau) 1 mL,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Po smíchání a rozpuštění zmíněných složek v destilované vodě se celý obsah Erlenmeyerovy baňky nechal sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Následně se baňka s obsahem vytemperovala na 44-47 °C ve vodní lázni. Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci  $10^{-3}$  byl vzorek z každého připraveného ředění vnesen po 1 mL na Petriho misky (ø 90 mm) a přelit kultivačním médiem. Inkubace všech ředěných vzorků proběhla za aerobních podmínek při 37 °C po dobu 48 hodin. Narostlé kolonie, typicky

bezbarvé či smetanové barvy s pravidelným tvarem, se počítaly na osvětlené desce s tmavým pozadím.

#### 4.6 Stanovení počtu laktobacilů

Stanovení počtu laktobacilů v buvolím mléce bylo provedeno za pomoci kultivace na Rogosa Agar s kyselinou octovou. Kultivační médium bylo připraveno ze složek:

- Rogosa Agar (610176, Liofilchem) 60 g,
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich) 1,32 mL,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Veškeré složky se smíchaly a nechaly rozvařit v Erlenmeyerově baňce při teplotě 100 °C po dobu 15 min, dokud se z původní nesourodé směsi nestala homogenní směs. Poté se médium nechalo vytemperovat na 44-47 °C ve vodní lázni. Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci  $10^{-2}$  byl vzorek z každého připraveného ředění byly vzorky po 1 mL naneseny na Petriho misky (ø 90 mm), přelity vytemperovaným kultivačním médiem a krouživým pohybem promíchány se vzorkem. Po zatuhnutí média byly plotny přelity ještě jednou pro zachování mikroaerofilních podmínek. Po opětovném zatuhnutí proběhla kultivace při 37 °C. Po 72 hodinách se počítaly narostlé kolonie.

#### 4.7 Stanovení počtu bifidobakterií

Selektivní kultivace bifidobakterií proběhla za podmínek stanovených dle Vlková a kol. (2015). Kultivační médium bylo připraveno z následujících složek:

- Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar (CM0619, Oxoid) 43 g,
- Veggietones GMO-Free Soya Peptone (VG0300, Oxoid) 5 g,
- L-cystein hydrochloride monohydrate (C7880-100G, Sigma-Aldrich) 0,5 g,
- Tween Polysorbate 80 (6-066, Scharlau) 1 mL,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Výše zmíněné složky se promíchaly v Erlenmeyerově baňce a nechaly sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Takto připravené médium se nechalo vytemperovat na 44-47 °C ve vodní lázni. Pro vytvoření selektivního média pro bifidobakterie bylo nutné do agaru po vychladnutí přidat za sterilních podmínek 100 mg mupirocinu (CT0523B, Oxoid), 100 mg norfloxacinu (CT0434B, Oxoid) a 1 mL glaciální kyseliny octové (Sigma-Aldrich) na 1 L média.

Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci  $10^{-2}$  byl vzorek z každého připraveného ředění vnesen po 1 mL na Petriho misky (ø 90 mm), přelit vytemperovaným kultivačním médiem a krouživým pohybem promíchán s médiem. Kultivace všech ředění proběhla při 37 °C po dobu 72 hodin za anaerobních podmínek za použití GENbag anaer (bioMérieux), poté byly kolonie spočítány.

#### 4.8 Stanovení počtu kvasinek a plísní

Kvantitativní stanovení kvasinek a plísní bylo provedeno pomocí Yeast Extract Agar připraveného v tomto množství:

- Yeast Extract Agar (CM0019, Oxoid) 37 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Složky se v Erlenmeyerově baňce promíchaly a nechaly sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Následně se médium dalo do vodní lázně o teplotě 44-47 °C. Poté se přidalo 20 mL oxytetracyklinu selective supplement SR0073A (Oxoid), který byl vytemperovaný na pokojovou teplotu. Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci 10<sup>-3</sup> byl vzorek z každého připraveného ředění po 1 mL inokulován na Petriho misky (ø 90 mm) a přelit připraveným médiem. Krouživým pohybem se Petriho misky promíchaly a nechaly inkubovat za aerobních podmínek při 22 °C. Po 5 dnech se spočítaly narostlé kolonie pomocí osvětlené desky s tmavým pozadím. Kvasinky tvoří typické matné či lesklé kolonie s pravidelným okrajem a smetanovým zabarvením. Plísně tvoří chmýřivé či ploché kolonie obvykle velkých rozměrů s různým zbarvením

#### 4.9 Stanovení počtu stafylokoků

Pro stanovení počtu stafylokoků bylo připravena selektivní půda s použitím anaerobní ředící řady a inkubací. Pro kultivaci bylo zapotřebí připravit agar ze složek v daném množství:

- Staphylococcus Medium (CM0145, Oxoid) 150 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Po smíchání a rozpuštění zmíněného média v destilované vodě se celý obsah Erlenmeyerovy baňky nechal sterilovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Následně se baňka s obsahem vytemperovala na 44-47 °C ve vodní lázni. Připraveným médiem se zalily Petriho misky (ø 90 mm). Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci 10<sup>-3</sup> byl vzorek z každého připraveného ředění očkovan po 0,1 mL na tuhé kultivační médium. Inkubace všech ředěných vzorků proběhla za aerobních podmínek při 37 °C po dobu 48 hodin. Narostlé kolonie se spočítaly na osvětlené desce s tmavým pozadím.

#### 4.10 Stanovení počtu *Staphylococcus aureus*

Stanovení počtu patogenního mikroorganismu *Staphylococcus aureus* proběhlo s použitím půdy podle Baird-Parkera dle ČSN 6888-1.

Ke kvantitativnímu stanovení bylo použité médium složené z:

- Baird Parker Agar (11705-500G, Sigma-Aldrich) 61 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Zmíněné složky média se smíchaly a nechaly sterilovat v Erlenmeyerově baňce v autoklávu 15 min při 121 °C. Po temperaci na 44-47 °C ve vodní lázni se přidal Egg Yolk Telurite Emulsion 75208-1VL (Sigma-Aldrich) o množství 52,5 mL. Za použití desetinásobného ředění vzorku na koncentraci 10<sup>-3</sup> byl vzorek z každého připraveného ředění inokulován po 0,1 mL na již zatuhlé kultivační médium. Plotny byly inkubovány za aerobních podmínek při 37 °C po dobu 48 hodin. Narostlé typické kolonie se na dně misky označily a nechaly inkubovat dalších 24 hodin při 37 °C. Pro konfirmaci bylo vybráno 5 kolonií typických a 5 kolonií atypických, u kterých se provedl konfirmační test pomocí Staphylase test DR0595A (Oxoid) pro potvrzení identifikace *S. aureus*. Spočíval v použití dvou činidel: testovací činidlo obsahovalo ovčí erytrocyty senzibilizované kraličím fibrinogenem a kontrolní činidlo, které

sensibilizováno nebylo. Pomocí kličky se nanesy podezřelé kolonie na vyznačená místa reakční karty a po protřepání obou činidel se přidala 1 kapka od každého činidla. Při mísení obou komponent kličkou by pro potvrzení přítomnosti mělo docházet ke shlukování buněk stafylokoků. Aglutinace je způsobena výskytem vázané koagulázy, jež reaguje s fibrinogenem a přeměňuje jej na fibrin.

#### 4.11 Stanovení přítomnosti salmonel

Stanovení průkazu bakterií rodu *Salmonella* bylo provedeno dle normy ČSN 6579-1 a skládá se ze čtyř po sobě jdoucích kroků (obrázek č. 5). Nejprve byla připravena Pufrovaná peptonová voda (PPV) pro předmnožení v neselektivní půdě. Předmnožení slouží k průkazu nízkých počtů nebo poškozených bakterií rodu *Salmonella*. Peptonová voda se připravila za pomoci:

- Bacteriological peptone (LP 0037, Oxoid) 10 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

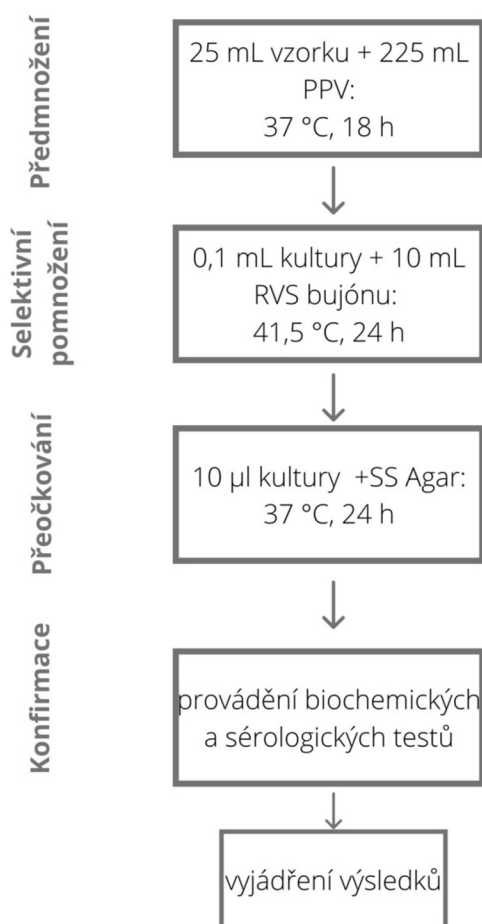
Složky byly promíchány a sterilovány po dobu 15 min při 121 °C v autoklávu. PPV o objemu 225 mL pokojové teploty se inokulovalo vzorkem o objemu 25 mL a nechalo inkubovat 18 hodin při teplotě 37 °C. Získaná kultura byla poté přenesena do půdy podle Rappaporta a Vassiladise se sójou (RVS), která byla připravena do zkumavek pomocí:

- Rappaport-Vassiliadis Soya peptone Broth (CM0866, Oxoid) 30 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

RVS se nechal rozvařit, rozpleněn po 10 mL do zkumavek a sterilován. Získaná kultura o objemu 0,1 mL z PPV se přenesla do zkumavky obsahující RVS bujón. Inkubace proběhla při 41,5 °C během 24 hodin v termostatu. Selektivní půda pro další inokulaci byla připravená smícháním:

- Salmonella, Shigella Agar (CM0099, Oxoid) 57 g,
- Destilované voda 1000 mL.

Následně bylo médium sterilováno v Erlenmeyerově baňce po dobu 15 min při 121 °C v autoklávu a poté se použilo k zalití Petriho misek (Ø 90 mm), které se nechaly zatuhnout. Na tuhou selektivní půdu v Petriho miskách se vyočkovalo 10 µl kultury z RVS pomocí kličky tím způsobem, aby získané kolonie byly dobře izolovány. Plotny se nechaly inkubovat při 37 °C po dobu 24 h. Posléze se v případě přítomnosti černých kolonií provedla confirmace pomocí Salmonella latex test (FT0203A, Oxoid).



**Obrázek č. 5** – Diagram postupu průkazu bakterií rodu *Salmonella*

#### 4.12 Stanovení přítomnosti listerií

Bakterie *Listeria monocytogenes* byly stanovovány pomocí průkazné horizontální metody dle ČSN 11290-1, která sestávala ze 3 po sobě jdoucích kroků (obrázek č. 6): inokulace v tuhé selektivní půdě, přeočkování v tekuté selektivní půdě a inokulace na tuhou selektivní půdu. Z důvodu možného výskytu poměrně velkého počtu doprovodných mikroorganismů bylo nutné použití selektivních suplementů.

Nejprve byla připravena tekutá selektivní půda pro primární pomnožení – poloviční bujón dle Frasiera (angl. half-Fraser broth), který se skládal z:

- Demi-Fraser Broth without ferric ammonium citrate (CM1053, Oxoid) 57,3 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Složky byly promíchány v Erlenmeyerově baňce a sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Vytemperovaná půda o objemu 225 mL se inokulovala 25 mL vzorku a nechala inkubovat při 30 °C po dobu 24 hodin v termostatu. Následovalo přeočkování do



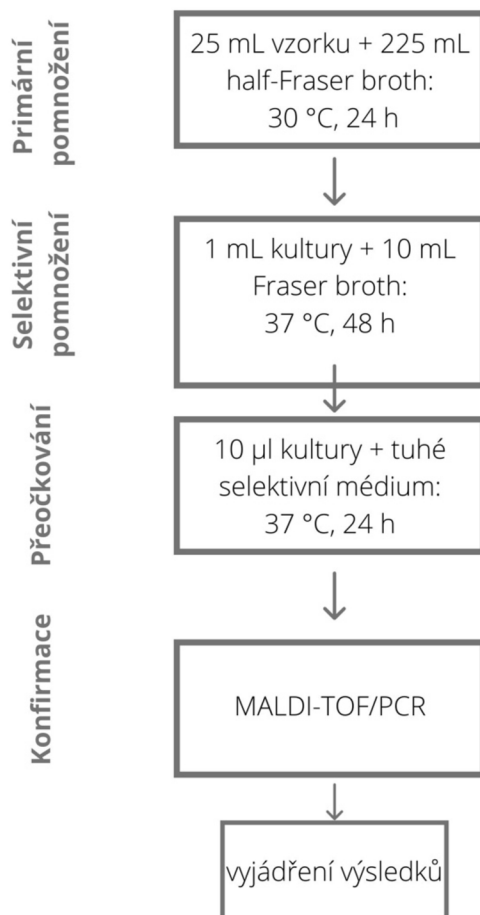
tekuté selektivní půdy (angl. Fraser broth) pro sekundární pomnožení, která byla připravena pomocí:

- Listeria enrichment broth base (CM0863, Oxoid) 54,4 g,
- Lithium chloride (L-8895, Sigma-Aldrich) 3 g,
- Destilované voda 1000 mL.

Složky se promíchaly a nechaly rozvařit při teplotě 100 °C v Erlenmeyerově baňce a následně byly rozlity do zkumavek po 10 mL, které se sterilovaly v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Po vychladnutí a před samotným rozbořem se přidalo 0,2 mL Secondary Selective Enrichment Supplement SR0143E (Oxoid) do zkumavky. Z half Fraser broth bylo přeočkováno 1 mL kultury do připravené zkumavky (Fraser broth) obsahující tekutou selektivní půdu pro sekundární pomnožení. Inkubace proběhla v termostatu o teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Před inokulací na pevné selektivní půdy bylo zapotřebí smíchat:

- Chromogenic Listeria Agar (ISO) Base (CM1084, Oxoid) 72 g,
- Destilovaná voda 1000 mL.

Zmíněný agar se smíchal s destilovanou vodou v Erlenmeyerově baňce a nechal sterilovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 min. Po vychladnutí média bylo přidáno 4,2 mL OCLA (ISO) Selective supplement (SR0226E, Oxoid) a 42 mL Brilliance Listeria Differential Supplement (SR0228E, Oxoid). Poté se médium vylilo na Petriho misku (ø 90 mm) a nechal zatuhnout. Na tuhou selektivní půdu se inokulovalo 10 µl kultury z Fraser broth pomocí kličky tím způsobem, aby získané kolonie byly dobře izolovány. Poté proběhla kultivace při 37 °C během 24 h. V případě přítomnosti charakteristických modrozelených kolonií s haló zónou je nutná confirmace pomocí MALDI-TOF či PCR testů.



**Obrázek č. 6** - Diagram postupu průkazu bakterií *Listeria monocytogenes*

#### 4.13 Kvasná zkouška

Mikroorganismy přítomné v mléce mohou způsobovat změny v konzistenci, které lze sledovat pomocí kvasné zkoušky. Průběh této zkoušky spočíval v inkubaci vzorku ve zkumavce při 37 °C po dobu 24 hodin. Podle povahy vzniklé sraženiny se indikovali převládající mikroorganismy (tabulka č. 4).

**Tabulka č. 4 -Vyhodnocení kultivace kvasné zkoušky**

<b>Jakostní třída</b>	<b>Sraženina</b>	<b>Mikroorganismy (převažující)</b>
I.	Celistvá, porcelánovitá, obsah max 2 plynových bublinek	Bakterie mléčného kvašení (BMK)
II.	Mnoho bublinek a trhlinek, vyvstávání syrovátky	Kontaminace koliformními bakteriemi (případně proteolytické mikroorganismy)
III.	Klkovitá, značná tvorba plynů, nesražené mléko	Přítomnost inhibičních látek, bakteriofágů

#### 4.14 Vyhodnocení výsledků

Narostlé kolonie byly spočítány podle vztahu:

$$P = \frac{(P1 + P2)}{11} * F$$

P1, P2 = počet kolonií po dvou po sobě jdoucích ředěních

F = převrácená hodnota vyššího použitého ředění

Výsledný počet kolonií byl vyjádřen v jednotkách KTJ – kolonie tvořící jednotky.

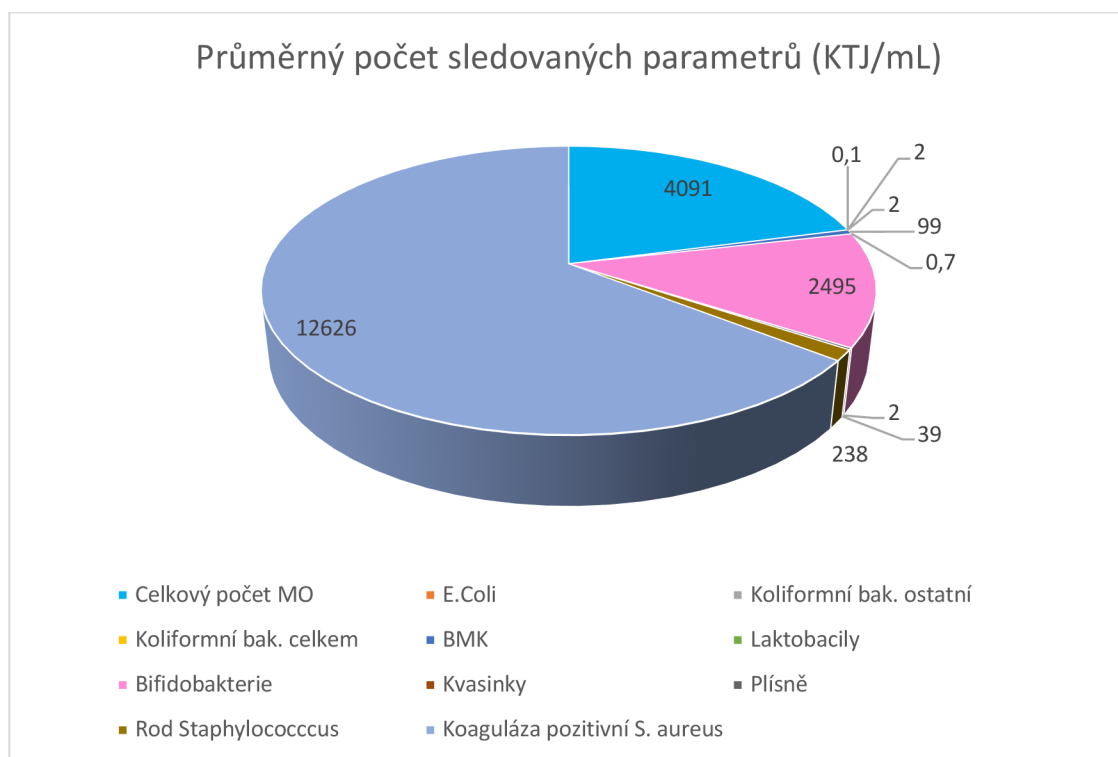
## 5 Výsledky

Kompletní výsledky kultivace jsou uvedeny v příloze (Příloha 1, Příloha 2 a Příloha 3).

### 5.1 Kvantitativní stanovení mikroorganismů

Průměrný počet jednotlivých parametrů, které byly zpozorovány, je zmíněn v tabulce č. 5 a zároveň znázorněn pomocí grafu na obrázku č. 7. Nejvyšších průměrných hodnot dosahoval koagulázopozitivní *S. aureus* s hodnotou 12 626 KTJ/mL. Dále byl následován parametrem CPM s hodnotou 4 091 KTJ/mL, bifidobakteriemi (2 495 KTJ/mL), rodem *Staphylococcus* (238 KTJ/mL), BMK (99 KTJ/mL), plísněmi (39 KTJ/mL), kvasinkami a koliformními bakteriemi s hodnotou 2 KTJ/mL. *E. coli* a laktobacily dosahovaly nejnižších hodnot < 1,00 KTJ/mL. U většiny sledovaných parametrů byl stanoven nejvyšší počet v rámci 8. týdne.

V rámci stanovování počtu koagulázopozitivního *S. aureus* byly ve 2. a 8. týdnu roku 2022 zjištěny vysoké počty tohoto patogenního mikroorganismu (127 a 126126 KTJ/mL) a v důsledku toho proveden Staphylase test. Identifikace byla potvrzena pouze ve 2. týdnu. Snímky vybraných přítomných kolonií mikroorganismů po kultivaci jsou uvedeny v příloze (Příloha 4, Příloha 5, Příloha 6, Příloha 7, Příloha 8, Příloha 9).



**Obrázek č. 7** – Graf zobrazující průměrný počet zjištěných parametrů

Výsledky, které byly statisticky vyhodnoceny jsou zmíněny v tabulce č. 5. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu IBM SPSS Statistics 28.0.0.0. za použití jednovýběrového t-testu a korelační analýzy s 95% spolehlivostí, a to pouze u parametrů dosahujících hodnot, které bylo možné statisticky analyzovat.

**Tabulka č. 5 – Výsledky kultivace a jednovýběrového t-testu**

Sledovaný parametr	Průměrný počet (KTJ/mL)	Limit daný legislativou (KTJ/mL)	Jednovýběrový t-test
Celkový počet MO	4 091	500 000	shoda
<i>E. Coli</i>	< 1,00	-	-
Koliformní bak. ostatní	2	1 000	shoda
Koliformní bak. celkem	2	1 000	shoda
BMK	99	-	-
Laktobacily	< 1,00	-	-
Bifidobakterie	2 496	-	-
Kvasinky	2	50 000	shoda
Plísně	39	50 000	shoda
Rod <i>Staphylococcus</i>	238	-	-
Koagulázopozitivní <i>S. aureus</i>	12 626	10 000	neshoda

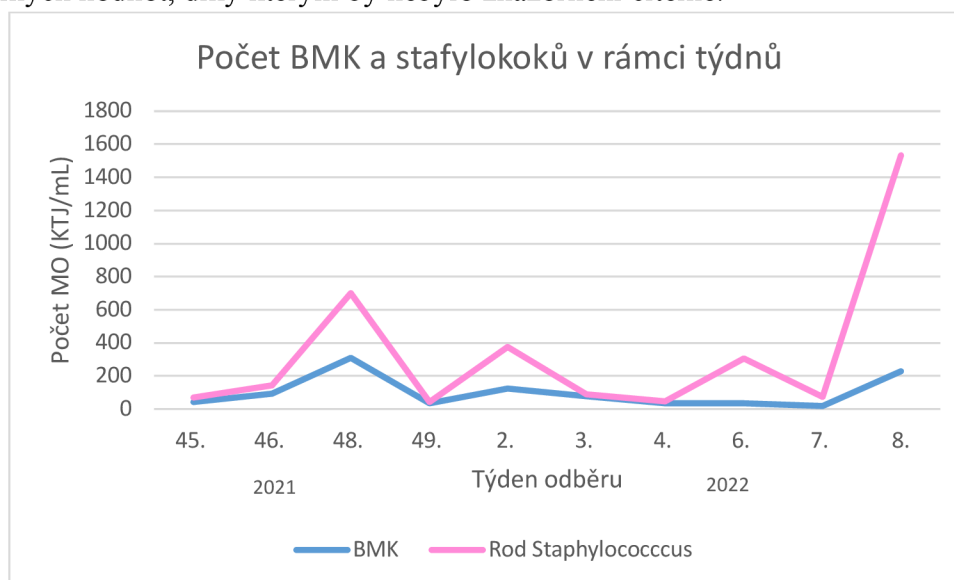
Při porovnání výsledných průměrných hodnot s legislativou za pomoci jednovýběrového t-testu bylo zjištěno, že se celkový počet mikroorganismů shodoval s daným legislativním limitem (CPM = 500 000 KTJ/mL), tedy nebyl překročen, jelikož dosahoval v průměru daleko nižších hodnot s rozdílem 495 909 KTJ/mL. Koliformní bakterie s výsledným počtem 2 KTJ/mL byly rovněž ve shodě s legislativními požadavky (ČSN 570529), které uvádí limit 1 000 KTJ/mL. Rozdíl mezi limitem a skutečným počtem dosahoval 9 998 KTJ/mL. Předpokládaný počet 50 000 KTJ/mL psychrotrofních organismů dle ČSN 570529 se shodoval s výsledným průměrným počtem součtu kvasinek a plísní, tedy nedošlo k překročení limitu s počtem 41 KTJ/mL. Rozdíl mezi limitem a skutečným počtem sledovaného parametru činil 49 959 KTJ/mL. Skutečný počet koagulázopozitivního *Staphylococcus aureus* s hodnotou 12 626 KTJ/mL se neshodoval s legislativou udávající maximální limit 10 000 KTJ/mL (Nařízení Komise 1441/2007). Limit byl překročen o 2 626 KTJ/mL. Počet BMK, bifidobakterií a stafylokoků nebyl porovnáván s legislativou, jelikož tyto parametry nejsou u jakosti syrového kravského či buvolího mléka sledovány.

**Tabulka č. 6 – Závislost mezi jednotlivými parametry**

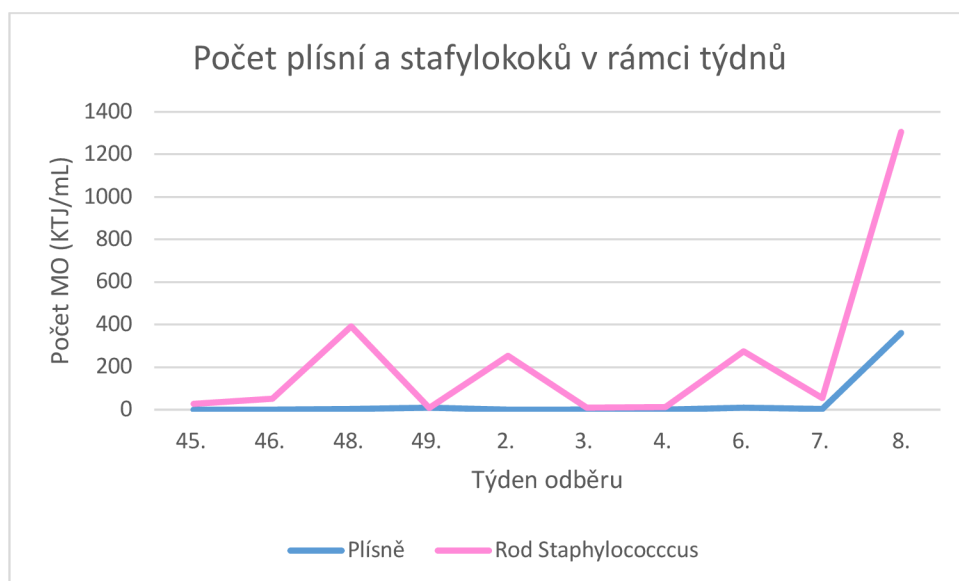
Sledované parametry	BMK	Bifidobakterie	Plísně	Rod <i>Staphylococcus</i>	Koagulázopozitivní <i>S. aureus</i>
BMK	1	žádná	žádná	sřední přímá	žádná
Bifidobakterie	žádná	1	silná přímá	silná přímá	silná přímá
Plísně	žádná	silná přímá	1	silná přímá	silná přímá

Rod	sřední	silná	silná	1	silná přímá
<i>Staphylococcus</i>	přímá	přímá	přímá		
Koagulázopozitivní <i>S. aureus</i>	žádná	silná přímá	silná přímá	silná přímá	1

Mezi výslednými počty jednotlivých parametrů byla rovněž sledována korelace, která je zobrazena v tabulce č. 6 dle závislosti. Na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  byla zjištěna střední přímá závislost BMK a stafylokoků. Graficky znázorněná korelace mezi těmito parametry je na obrázku č. 8. S pravděpodobností 99 % byla sledovaná silná přímá závislost mezi bifidobakteriemi a koagulázopozitivním *S. aureus*, mezi bifidobakteriemi a stafylokoky, mezi bifidobakteriemi a plísněmi, mezi plísněmi a koagulázopozitivním *S. aureus* a mezi plísněmi a stafylokoky, jejichž korelace je znázorněna na obrázku č. 9. U ostatních parametrů sledovaných z důvodu možné korelace nebylo provedeno grafické znázornění z důvodu vysokých rozdílných hodnot, díky kterým by nebylo znázornění čitelné.



**Obrázek č. 8** – Graf sledování korelace mezi BMK a stafylokoků



**Obrázek č. 9** – Graf sledování korelace mezi plísněmi a stafylokoky

## 5.2 Kvalitativní stanovení mikroorganismů

Při stanovování průkaznosti salmonel či listérií nebyla v jediném vzorku sledována přítomnost ani jednoho z patogenních mikroorganismů. Nicméně v případě kvasné zkoušky byly zjištěna změna s nastoupením nového roku (tabulka č. 7). Během 45. – 49. týdne roku 2021 převažovaly kyselinotvorné mikroorganismy (BMK), které byly s novým rokem nahrazeny mikroorganismy proteolytickými. Současně v posledním týdnu měření roku 2022 dle metod kvasné zkoušky byla zjištěna přítomnost inhibičních látek. Snímky výsledků kvasné zkoušky jsou uvedeny v příloze (Příloha 10 a Příloha 11).

**Tabulka č. 7** – Výsledky kvasné zkoušky v průběhu týdnů

Týden	45.	46.	48.	49.	2.	3.	4.	6.	8.	9.
<b>Převažující MO</b>	BMK	BMK	BMK	BMK	PL*	PL*	PL*	PL*	PL*	IL**

\*PL = proteolytické mikroorganismy

\*\*IL = inhibiční látky

## 6 Diskuze

Z důvodu narůstajícího zájmu o buvolí mléko a možným vhodným podmínkám pro chov buvolů se i ve vědecké sféře objevují nové studie zabývající se mikrobiologickou kvalitou buvolího mléka (Gürler et al. 2013; Ling et al. 2016; Bailone et al. 2017). K často sledovaným parametrům patří CPM (Han et al. 2007; Gürler et al. 2013), BMK (Gürler et al. 2013), laktobacily (Gürler et al. 2013), koliformní bakterie (Han et al. 2007; Gürler et al. 2013; Hashmi & Saleem 2015), kvasinky a plísně (Coroian et al. 2010; Gürler et al. 2013; Hashmi & Saleem 2015), *E. coli* (Gürler et al. 2013; Hashmi & Saleem 2015), *S. aureus* (Han et al. 2007; Gürler et al. 2013; Hashmi & Saleem 2015), salmonely (Coroian et al. 2010) a listerie (Rahimi et al. 2014).

Vzorky buvolího mléka analyzované a vyhodnocené v této práci obsahovaly v průměru CPM  $4,1 \cdot 10^3$  KTJ/mL, což lze považovat za velmi nízkou hodnotu při porovnání s výslednými počty jiných autorů. Autoři studie Han et al. (2007) provedené na čínském území zjistili vyšší hodnoty CPM odpovídající  $3,9 \cdot 10^5$  KTJ/mL. Podobný průměrný počet CPM za 4 roky analyzování vzorků sledovaných v brazilském buvolím mléce dosáhl  $4,3 \cdot 10^5$  KTJ/mL, přičemž nejvyšší nárůst s mediánem  $1,7 \cdot 10^6$  KTJ/mL byl sledován během letních měsíců. Vzorky pocházely od buvolů chovaných na 12 různých farmách a byly získané během let 2011-2014 (Bailone et al. 2017). Buvolí mléko zkoumané v Thajsku obsahovalo v průměru  $4,43 \cdot 10^5$  KTJ/mL CPM (Chuaychoo et al. 2013). Gürler et al. (2013) stanovili pomocí kultivace na TPCA agaru  $2,3 \cdot 10^6$  KTJ/mL CPM, které byly izolovány z mléka buvolů chovaných na rodinných farmách v Turecku, majících méně jak 10 buvolů.

Výsledné hodnoty této práce a ze zmíněných studií od Han et al. (2007), Chuaychoo et al. (2013) a Bailone et al. (2017) se pohybují v rámci stanoveného limitu, nicméně počet CPM zjištěný Gürler et al. (2013) již přesahuje limit CPM  $\leq 500\ 000$  KTJ/mL stanovený dle Nařízení EP a Rady (ES) č. 853/2004 a Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006, který je určen pro mléko pro potravinářské zpracování, nezahrnující tepelnou úpravu. V případě tepelného zpracování syrového mléka by výše uvedená hodnota nepřekračovala stanovený limit CPM  $\leq 1\ 500\ 000$  KTJ/mL dle Nařízení EP a Rady (ES) č. 853/2004 a Nařízení Komise (ES) č. 1662/2006. Vysoké počty CPM mohou být způsobeny zejména nesprávnými hygienickými podmínkami v průběhu dojení, získávání a transportu syrového mléka (Gürler et al. 2013). Ačkoliv se mohou zdát některé počty příliš vysoké, existují studie i s početnějšími CPM s hodnotou  $6,6 \cdot 10^9$  KTJ/mL, nicméně zjištěných u kravského mléka (Bereda et al. 2012).

Koliformní bakterie patřící k doplňkovým znakům jakosti kravského mléka, ale sledované i u mléka buvolího, byly u vzorků analyzovaných v této práci přítomny v průměrném počtu 2 KTJ/mL, přičemž narostly pouze během jedné analýzy ve 2. týdnu roku 2022. Zatímco v turecké studii došli k mírně vyšší průměrné hodnotě odpovídající  $8,9 \cdot 10^2$  KTJ/mL (Gürler et al. 2013), současně zaznamenali mírný nárůst koliformních bakterií během letních měsíců. Ke stejnému výsledku dospěli i autoři Hashmi & Saleem (2015) s počtem  $8,9 \cdot 10^2$  KTJ/mL koliformních bakterií sledovaných v Pákistánu. Obdobně nízké počty ( $2,6 \cdot 10^2$  KTJ/mL) byly pozorovány i v mléce buvolů chovaných v Číně (Han et al. 2007). V Rumunsku Coroian et al. (2010) analyzovali mléko pocházející od vodních buvolů plemene Romanian a Murrah, u kterých bylo zjištěno  $5,0 \cdot 10^1$  KTJ/mL a  $4,0 \cdot 10^1$  KTJ/mL koliformních bakterií v mléce, což stále odpovídá v minulosti stanoveným, již neplatným a nenahrazeným, limitům nejvýše



1 000 KTJ v 1 ml při 30 °C (ČSN 570529). Ačkoliv výše zmíněné počty patří k velmi nízkým, během venezuelské studie prováděné Uzcátegui et al. (2018), kteří analyzovali vzorky od 46 buvolů v rámci 2 dní, nevyrostla na Petriho miskách dokonce ani jediná kolonie. Nutno vyzdvihnout fakt, že odběr proběhl pouze během dvou dnů. Přítomnost koliformních bakterií z části indikuje fekální znečištění, avšak ve většině patří ke kontaminantům životního prostředí (Martin et al. 2016).

*Escherichia coli*, jako zástupce koliformních bakterií indikující fekální znečištění, v rámci kvantitativního stanovení této práce byla průměrně sledována v počtu <1,00 KTJ/mL. Jediná detekce 1 KTJ/mL proběhla ve 45. týdnu roku 2021. U zbylých analýz nebylo na Petriho misce nic zpozorováno. Obdobně obstojné hodnoty (1,8 KTJ/mL) byly sledovány v buvolím mléce pocházející od vodních buvolů plemene Murrah z Rumunska (Coroian et al. 2010) Nicméně *E. coli* v syrovém buvolím mléce může být přítomna i v poměrně vyšších počtech, což dokazuje studie provedená Han et al. (2007) s výsledkem  $3,4 \cdot 10^1$  KTJ/mL na čínském území, turecká studie s hodnotou  $1,3 \cdot 10^1$  KTJ/mL (Gürler et al. 2013), ale i indická studie s rovnocenným počtem  $1,3 \cdot 10^1$  KTJ/mL (Hashmi & Saleem 2015). Nízké počty *E. coli* v BM mohou být mimojiné vysvětleny inhibičním působením vybraných laktobacilů (Shafakatullah & Chandra 2014).

V mléce jsou navíc sledovány jako doplňkové znaky jakosti i psychrotrofní mikroorganismy, již jsou zastoupeny kvasinkami, plísněmi, *Listeria* spp., *Pseudomonas* spp. a *Micrococcus* spp. (ČSN 570529). V této práci byl však zkoumán pouze počet kvasinek a plísní a přítomnost bakterií *Listeria monocytogenes*. Kvasinky a plísně zjištěné během desetitýdenní analýzy v rámci této práce byly pozorovány v průměrném počtu  $2,0 \cdot 10^1$  KTJ/mL, kdežto plísně byly zastoupeny v počtu  $3,9 \cdot 10^1$  KTJ/mL a kvasinky 2 KTJ/mL. Turečtí autoři Gürler et al. (2013) zaznamenali mírně vyšší nárůst s hodnotou  $4,3 \cdot 10^2$  KTJ/mL kvasinek a plísní přítomných v mléce, jež bylo odebráno buvolům na rodinných farmách. Ke shodnému počtu  $4,3 \cdot 10^2$  KTJ/mL kvasinek a plísní dospěli i v Indii Hashmi & Salem (2015). Obdobné výsledky s hodnotou  $6,3 \cdot 10^2$  KTJ/mL byly zjištěny Coroian et al. (2010), nicméně i tak spolu s ostatními studii nedošlo k překročení limitu 50 000 KTJ/mL (ČSN 570529). Nutné ovšem zmínit, že byly sledovány pouze kvasinky a plísně, které patří k jedním z mnoha zástupců psychrotrofních mikroorganismů. O detekci kompletní skupiny psychrotrofních mikroorganismů se pokusili Uzcátegui et al. (2018), kteří analyzovali vzorky od 46 buvolů v rámci 2 dní, nicméně jim žádné kolonie nevyrostly.

BMK tvoří dominantní skupinu syrového buvolího mléka, jak naznačují studie v Turecku s počtem  $5,5 \cdot 10^5$  KTJ/mL (Gürler et al. 2013) či v Číně  $4,2 \cdot 10^4$  KTJ/mL (Han et al. 2007). Lze se však setkat i s menším zatoupením BMK, jak ukázali autoři Hashmi & Salem (2015) v indické studii s počtem  $8,9 \cdot 10^2$  KTJ/mL. Skrovné počty v porovnání se studii z Číny a Turecka byly zjištěny i v této práci s průměrnou hodnotou  $9,9 \cdot 10^1$  KTJ/mL. Při konkrétním nahlédnutí na jednotlivé odběry v 8. týdnu roku 2022 narostlo na Petriho miskách větší množství BMK, celkem  $2,3 \cdot 10^2$  KTJ/mL. Zástupce BMK *Lactobacillus* spp. byl v rámci této práce pozorován v průměru < 1,00 KTJ/mL. Jiné pokusy o detekci laktobacilů v BM byly úspěšnější, nicméně nedošlo ke kvantitativnímu hodnocení, nýbrž samotné detekci. V BM převažovaly *Lb. Acidophilus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* (Aziz et al. 2009) a *Lb. Paraplantarum* (Kalhor et al. 2019). Pro představu v kravském mléce se obvykle

laktobacily pohybují v rozmezí  $1.0 \cdot 10^2 - 3,2 \cdot 10^4$  KTJ/mL (Kagkli et al. 2007; Quigley et al. 2013).

Během desetitýdenního analyzování syrového BM byl rod *Bifidobacterium* spp. zjištěn pouze v posledním týdnu odběru, a to 8. týden roku 2022 v počtu  $2,5 \cdot 10^4$  KTJ/mL. Současně byla dokázána silná přímá závislost tohoto bakteriálního rodu s plísněmi, stafylokoky a *S. aureus*, které v posledním týdnu odběru vykazovaly nejvyšší hodnoty za celou dobu analyzování. Přítomnost bifidobakterií byla zjištěna i v syrovém BM v Egyptě, kde přítomné bakterie identifikovali u 51 % vzorků. Současně detekovali majoritní zastoupení *Bifidobacterium dentium* a *Bifidobacterium suis*. V dané studii rovněž potvrdili přítomnost bakterií i u 66 % vzorků kravského mléka (El-Gendi & Ali 2012). Taye et al. (2021) detekovali dokonce  $2,3 \cdot 10^7$  KTJ/mL v kravském mléce. Výskyt bifidobakterií v syrovém mléce indikuje možné fekální znečištění (Delcenserie et al. 2005).

Rod *Staphylococcus* spp. patří k běžně se vyskytující mikrobiotě zdravých buvolů, jak nasvědčují i výsledky v této práci. V každém týdnu analýzy byly bakterie přítomny, přičemž se vyskytovaly v průměrném počtu  $2,4 \cdot 10^2$  KTJ/mL. Jejich přirozený výskyt potvrzuje i studie provedená Catozzi et al. (2017), během které porovnávali mikrobiální zastoupení zdravých buvolů, buvolů s klinickou mastitidou a buvolů postižených subklinickou mastitidou. Mezi mikroorganismy zastoupené v mléce zdravých buvolů byl vždy přítomen rod *Staphylococcus*, kdy jeho zastoupení dosahovalo největší relativní četnosti při přítomnosti  $<100\,000$  somatických buněk v 1 mL. Se zvyšující počtem PSB (počet somatických buněk) se snižovalo zastoupení stafylokoků. Maniruzzaman et al. (2010) detekovali stafylokoky u 32,5 % z analyzovaných vzorků, bohužel však neprováděli kvantitativní stanovení daných bakterií.

Při analyzování vzorků BM v této práci byl zjištěn průměrný počet  $1,3 \cdot 10^4$  KTJ/mL *S. aureus*. Nicméně je nutné zmínit, že pouze v rámci 2. týdne (v roce 2022) odběru byl potvrzen koagulázopozitivní *S. aureus* pomocí Staphylase testu. U ostatních dvou vzorků analyzovaných v jiných týdnech však negativní Staphylase test vyvrátil přítomnost koagulázopozitivních bakterií. Při porovnání s hodnotami zjištěných Han et al. (2017) a Coroian et al. (2010),  $4,8 \cdot 10^1$  KTJ/mL a  $6,3 \cdot 10^1$  KTJ/mL, výsledky této práce dosahují vcelku vysokých čísel. Stále nižší počty *S. aureus* s mírným nárůstem v letních měsících byly zjištěny v rámci studie prováděné na tureckém území, kdy výsledné množství kolonií odpovídalo  $2,9 \cdot 10^2$  KTJ/mL (Gürler et al. 2013). Indická studie provedená Hashmi & Saleem (2015) zjistila stejné množství s počtem  $2,9 \cdot 10^2$  KTJ/mL. O pár let později Uzcátegui et al. (2018) při analyzování vzorků mléka od 46 buvolů chovajících v Panamě zjistili poměrně hojnější zastoupení *S. aureus*, a to u 3 vzorků s množstvím  $1 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^6$  a  $1 \cdot 10^6$  KTJ/mL. Jednak byly zpozorovány typické haló zóny na Petriho miskách a současně byla jejich identifikace potvrzena pozitivním testem na koagulázu. U 40 buvolů již trpících subklinickou mastitidou sledovali El-Razik et al. (2010) přítomnost *S. aureus*, jehož incidence zjištěná pomocí Uni-PCR testu činila 15,6 %. Catozzi et al. (2017) zaznamenali 18,5% zastoupení *S. aureus* u buvolů s klinickou mastitidou a 44,6% zastoupení v případě syrového mléka získaného od buvolů trpících subklinickou mastitidou.

Koagulázopozitivní stafylokoky představují nebezpečí pro člověka, ale i pro zvíře samotné, jelikož patří k původcům klinické mastitidy. Subklinickou mastitidu však mohou zapříčinit jednak koagulázopozitivní stafylokoky, ale i koagulázonegativní zástupci stafylokoků, které patří k převažující mikrobiotě přítomné při probíhajícím zánětu. Některé

zprávy naznačují, že vhodnými kontrolními postupy jsou segregace a/nebo selektivní vyřazování infikovaných zvířat. Jiní však zjistili, že účinným plánem kontroly je také používání správných postupů dojení. *S. aureus* však představuje 10 až 12 % všech klinických infekcí mastitid (Tenhagen et al. 2009). Důležité ovšem zmínit, že ať už vyjde výsledný počet *S. aureus* v mléce jakýkoliv, syrové mléko by mělo být těchto patogenních mikroorganismů prosté (Oliver et al. 2009).

Přítomnost patogenních bakterií rodu *Salmonella* nebyla u vzorků syrového buvolího mléka v této práci prokázána ani v jednom týdnu odběru, což je i v souladu s legislativou (Nařízení Komise 1441/2007). Identifikace salmonel rovněž nebyla potvrzena ani Coroian et al. (2010), kteří analyzovali 50 vzorků mléka v průběhu 4 měsíců u zřejmě zdravých buvolů. Zmíněné výsledky lze považovat jako kladné, jelikož by tyto patogenní bakterie neměly být v syrovém mléce přítomny (Oliver et al. 2009). Bohužel však existují i studie ukazující možný výskyt salmonel, nicméně sledovaných v kravském mléce, s prevalencí 2,2 % (Murinda et al. 2002), 6 % (Jayarao et al. 2006) či 15 % (Houser et al. 2008).

Patogenní *Listeria monocytogenes* nebyla v průběhu analyzování buvolího mléka z farmy Ohař zjištěna v jediném vzorku, a odpovídá tak stanoveným limitům (ČSN 11290-1). Nulový výskyt *L. monocytogenes* lze vysvětlit možným antagonistickým působením koliformních bakterií a BMK vůči tomuto patogenu, což již bylo sledováno v několika studiích (Ortolani et al. 2010; Navrátilová a kol. 2012; Breyer et al. 2020; Aragon-Alegro 2021). Ovšem v syrovém BM v Íránu byla přítomnost *Listeria* spp. potvrzena pomocí PCR testů u 14,7 % vzorků, přičemž populace *L. monocytogenes* zaujímala 2,9 % (Rahimi et al. 2014). Více autorů se zajímalo o přítomnost tohoto patogenního mikroorganismu v kravském mléce, kde jeho prevalence odpovídala 2,8 % (Jayarao et al. 2006), 4,8 % (D'Amico et al. 2008), ale 12,6 % (Hassan et al. 2000).

Díky kvasné zkoušce provedené v této práci bylo zjištěno, že v roce 2021 převažovaly BMK a následně převažovaly proteolytické MO. Nicméně nelze brát tuto, sice jednoduchou, zkoušku jako spolehlivou, jelikož v rámci kultivace BMK provedené současně spolu s kvasnou zkouškou sice BMK byly zastoupeny ve větším počtu v roce 2021, ale nedošlo k nárůstu koliformních MO během roku následujícího. Koliformní bakterie v rámci kultivace na Petriho miskách byly pozorovány pouze v 2. týdnu roku 2022, jinak nedošlo k žádné detekci. K vysvětlení neshody těchto dvou metod by bylo zapotřebí další zkoumání problematiky.

## 7 Závěr

Syrové mléko získané od buvolů chovaných za ekologických podmínek na jediné buvolí farmě v České republice bylo v rámci diplomové práce podrobeno mikrobiologické analýze. Během období listopad 2021 - únor 2022 proběhlo 10 odběrů směsných vzorků buvolího mléka a pokaždé došlo ke stanovení určitých mikrobiologických parametrů. K detekci daných mikroorganismů sloužily převážně plotnové kultivační metody, vyjma provedení kvasné zkoušky.

Z výsledků vyplývajících z mikrobiologického rozboru je nutné vyzdvihnout průměrný počet CPM, který nejenom odpovídal limitům stanoveným pro buvolí mléko, ale současně by se dal zařadit do I. třídy jakosti, která však u jiného, než kravského mléka není dána. Za zmínku stojí i nepřítomnost indikátorového mikroorganismu *E. coli* a absence patogenních salmonel a listerií. Současně byly detekovány koliformní bakterie, kvasinky a plísně ve velmi malém zastoupení, u nichž nebyl překročen limit stanovený v minulosti legislativou. Překvapivě nízké počty byly zjištěny u BMK a laktobacilů, které u buvolího a kravského mléka dosahují běžně vyšších počtů a jsou do určité míry žádoucí. Nicméně BMK jako převažující mikrobiotu buvolího mléka vyhodnotila kvasná zkouška. Rod *Bifidobacterium* spp. byl zjištěn pouze v jednom případě, nicméně jeho výskyt v syrovém mléce indikuje možné fekální znečištění. Přítomnost stafylokoků byla potvrzena při každém odběru, jejich počet však není legislativou regulován. Důležitým zástupcem z tohoto rodu je však *Staphylococcus aureus*, který jako koagulázopozitivní mikroorganismus byl bohužel jednou detekován. Z hlediska možné indikace mastitidy a ohrožení lidského zdraví by bylo vhodné buvoly podrobit podrobnějšímu vyšetření, aby došlo k zamezení šíření zmíněného patogenu.

Závěrem lze zhodnotit kvalitu buvolího mléka, z hlediska zastoupení žádoucích a nežádoucích mikroorganismů, jako velmi příznivou při porovnání s výsledky od jiných autorů, nicméně nutno neopomenout přítomnost *S. aureus*, který by mohl znamenat ohrožení zdraví zvířete i člověka.

## 8 Literatura

- Abd El-Salam MH, El-Dein HF, El-Etriby HM, Al-Khamy AF, Shahin NM. 1996. The use of thrombolastograph to follow acid induced gelation of buffalo milk by glucono-delta-lactone. *Egypt J Dairy Sci* **24**:165–176.
- Abd El-Salam MH and El-Shibiny S. 2011. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk *Dairy Science & Technology*, EDP sciences/Springer **91** (6):663-699.
- Abdalla MOM, Ibrahim NNM. 2010. Chemical and microbiological evaluation of Mozzarella cheese during storage. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **4**:532–536.
- Abebe R, Hatiya H, Abera M, Megersa B, Asmare K. 2016. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Vet Res.* **12**(1):270.
- Ahmad S, Gaucher I, Rousseau F, Beaucher E, Piot M, Grongnet JF, Gaucheron F. 2008. Effect of acidification on physicochemical characteristics of buffalo milk: a comparison with cow milk. *Food Chem* **106**:11–17
- Ahmad S, Piot M, Rousseau F, Grongnet JF, Gaucheron F. 2009. Physico-chemical changes in casein micelles of buffalo and cow milks as a function of alkalisation. *Dairy Sci & Technol* **89**:387–403.
- Almeida C, Cerqueira L, Azevedo NF, Vieira MJ. 2013. Detection of *Salmonella enterica* serovar enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples. *International Journal of Food Microbiology* **161**:16–22.
- Aponte M, Pepe O, Blaiotta G. 2010. Short communication: identification and technological characterization of yeast strains isolated from samples of water buffalo Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* **93**:2358–2361.
- Aragon-Alegro LC, Lima EMF, Palcich G. 2021. *Listeria monocytogenes* inhibition by lactic acid bacteria and coliforms in Brazilian fresh white cheese. *Braz J Microbiol.* **52**(2):847-858.
- Arian HH, Khaskhali M, Arian MA, Soomro AH, Nizamani AH. 2008. Heat stability and quality characteristics of postpartum buffalo milk. *Pak J Nutr* **7**:303–307.
- Aziz T, Khan H, Bakhtair SM, Naurin M. 2009. Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of buffalo, cow and sheep. *Journal of Animal and Plant Sciences* **19**:168–173.
- Bailone R, Borra R, Roça R, Aguiar L, Harris M. 2017. Quality of refrigerated raw milk from buffalo cows (*Bubalus bubalis bubalis*) in different farms and seasons in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **18**: 1-12.
- Barile VL. 2005. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livestock Production Science* **92**:183-194.

- Bell C, Kyriakides A. 2002. *Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods*. Blackwell Science Ltd, London.
- Bereda A, Yilma Z, Nurfeta A. 2012. Hygienic and microbial quality of raw whole cow's milk produced in Ezha district of the Gurage zone, Southern Ethiopia. *Wudpecker Journal of Agricultural Research* **1**(11): 459 - 465
- Bergamo P, Fedele E, Iannibelli L, Marzillo G. 2003. Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chem* **82**:625–631.
- Bezkorovainy A. 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* **73**(2 Suppl):399S–405S.
- Borelli BM, Ferreira EG, Lacerda ICA, Franco GR, Rosa CA. 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World J Microbiol Biotechnol* **22**:1115–1119.
- Borghese A, Moiola B. 2002. Buffalo Husbandry | Mediterranean Region. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 193–197.
- Breyer GM, Arechavaleta NN, Siqueira FM, de Souza da Motta A. 2020. Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **13**:468-483.
- Büchl NR. 2011. Yeasts And Molds. *Yeasts in Milk and Dairy Products*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 744–753.
- Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Crémoux R, Montel M-C. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Syst Appl Microbiol* **30**:547–560.
- Center for Disease Control and Prevention – CDC. 2018. *Salmonella*. CDC. Available from: <http://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html> (accessed March 2022).
- Center for Disease Control and Prevention – CDC. 2018. *Listeria* (Listeriosis). CDC. Available from: <https://www.cdc.gov/listeria/faq.html#:~:text=Listeriosis%20is%20a%20serious%20infection,people%20with%20weakened%20immune%20systems> (accessed March 2022).
- Coroian A, Coroian CO, Vodnar DC, Trif M. 2010. Study of the main microbiological traits in Romanian buffalo milk. *Human and Veterinary Medicine Bioflux* **2** (2):92-98.
- Charaya G, Sharma A, Kumar A, Goel P, Singh M. 2015. Detection of major mastitis pathogens by multiplex polymerase chain reaction assay in buffalo milk. *The Indian Journal of Animal Sciences* **85**:122–125.
- Chuaychoo K, Thempachana O, Ngamwongsatit P, Thanasak J. 2013. A Study on the Composition and Microbiology of Raw Milk from Three Breeds of Buffalo in Thailand. *Buffalo Bulletin* **32** (2): 1311-1315.

- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* **26**(4):822-880.
- Czerniawska-Pitkowska E, Chocilowicz E, Szewcuk M. 2010. Biology of *Bubalus bubalis*. *Annals of Animal Science* **10**:107-115.
- ČSN 570529. 1993. Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO 4833. 1995. Mikrobiologie potravin a krmiv : horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO 6888-1 (560089). 1999. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO 6579-1. 2020. Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu *Salmonella* – část 1: Průkaz bakterií rodu *Salmonella*. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO 11290-1. 2017. Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu a *Listeria monocytogenes* a *Listeria* spp. – část 1: Metoda průkazu. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN EN ISO 11290-2. 2017. Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu a *Listeria monocytogenes* a *Listeria* spp. – část 2: Metoda stanovení počtu. Český normalizační institut, Praha.
- D'Amico DJ, Groves E, Donnelly CW. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J Food Prot* **71**:1580–1589.
- De Candia S, De Angelis M, Dunlea E, Minervini F, McSweeney PL, Faccia M, Gobbetti M. 2007. Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheese. *International Journal of Food Microbiology* **119**:182–191.
- Delcenserie V, Bechoux N, China B, Daube G, Gavini F. 2005. A PCR method for detection of Bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culturebased methods. *J. Microbiol. Methods.* **61**:55–67.
- Desvaux M, Dalmaso G, Beyrouthy R, Barnich N, Delmas J, Bonnet R. 2020. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Front Microbiol.*
- Devirgihis C, Caravelli A, Coppola D, Barile S, Perozzi G. 2008. Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. *International Journal of Food Microbiology* **128**:378–384.

- Drake MA, Karagül-Yüceer Y, Chen WQ, Cadwallader KR. 1999. Characterization of Desirable and Undesirable Lactobacilli from Cheese in Fermented Milk. Department of Food Science and Technology **32**(7):433–439.
- Duangpan W, Suriyaphan O. 2009. Preliminary assessment of microbiological quality of raw buffalo milk commercially produced in Thailand. Asian Journal of Food and Agro-industry **2**:368–373.
- El-Razik KAA, Abdelrahman KA, Ahmed FY, Gomaa AM, Eldebaky HA. 2010. Direct identification of major pathogens of the bubaline subclinical mastitis in Egypt using PCR. Journal of American Science **6**:652–660.
- El-Sharoud WM, Belloch C, Peris D, Querol A. 2009. Molecular identification of yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. J Food Sci **74**:341–346.
- El-Shibiny S, Abd El-Salam MH. 1980. The role of colloidal calcium in rennet coagulation of milk. Egypt J Dairy Sci **8**:35–40.
- Ercolini D, De Filippis F, La Stora A, Iacono M. 2012. “Remake” by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo Mozzarella cheese. Applied and Environmental Microbiology **78**:8142–8145.
- Ercolini D, Mauriello G, Blaiotta G, Moschetti G, Coppola S. 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo Mozzarella cheese. Journal of Applied Microbiology **96**:263–270.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. Systematic and Applied Microbiology **24**:610–617.
- Erickson PS, Kalscheur KF. 2020. Nutrition and feeding of dairy cattle. *Animal Agriculture*, 157–180.
- Escobar-Páramo P, Grenet K, Le Menac’h A, Rode L, Salgado E, Amorin C. 2004. Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates. Appl. Environ. Microbiol. **70**, 5698–5700.
- European Food Safety Authority - EFSA. 2007. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006. EFSA. Available from <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/rn-130> (accessed March 2022).
- Komise Evropských společenství. 2007. Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. 12-29. Belgie.
- Evropský parlament a Rada (ES). 2004. Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 o zvláštních hygienických pravidel pro potraviny živočišného původu. Pages 0055-0205 in Úřední věstník L39. Belgie.



- FDA. 2018. The Dangers of Raw Milk: Unpasteurized Milk Can Pose a Serious Health Risk. FDA. Available from: <https://www.fda.gov/food/buy-store-serve-safe-food/dangers-raw-milk-unpasteurized-milk-can-pose-serious-health-risk> (accessed March 2022).
- Fenlon DR. 1986. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. *The Veterinary Record* **118**(9):240-242
- Fenlon DR. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. Food Science And Technology, New York.
- Food and Agriculture Organization. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Available from [https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf) (accessed March 2022).
- Food and Agriculture Organization. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria Roma, Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. 37-38; 179-180.
- FAO. 2021. Dairy production and products: Buffaloes. FAO. Available from <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/buffaloes/en/> (accessed November 2021).
- Fatouh AS, Singh RK, Koehler PE, Mahran GA, Metwally AE. 2005. Physical, chemical and stability properties of buffalo butter oil fractions obtained by multi-step dry fractionation. *Food Chem* **89**:243–252.
- Fagiolo A, Roncoroni C, Lai O, Borghese A. 2005. Reproductive efficiency in female buffaloes. *FAO Regional Office for Europe Inter-Regional Cooperative Research* **67**: 77-87.
- Foster T. 1996. *Staphylococcus*. Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston.
- Gilmour A, Rowe MT. 1990. Micro-organisms associated with milk. *Dairy Microbiology*. Elsevier Science Publishers **1**:37-114.
- Gransden WR, Eykyn SJ, Phillips I, Rowe B. 1990. Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes. *Rev. Infect. Dis.* **12**:1008–1018.
- Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* **50**(3):245-59.
- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont P, Weill FX. 2010. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. *Res Microbiol.* **161**(1):26-9.
- Gürler H, Kuyucuoglu Y, Pamuk S. 2013. *NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry*. John Wiley & Sons, Weinheim.

- Gürler H, Kuyucuoglu Y, Pamuk S. 2013. Chemical and microbiological quality of Anatolian Buffalo milk. *African Journal of Microbiology Research* **7** (16):1512-1517.
- Halter EL, Neuhaus K, Scherer S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* of a German fresh water pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 641-647.
- Han BZ, Meng Y, Li M, Yang YX, Ren FZ, Zeng QK, Nout MJR. 2007. A survey on the microbiological and chemical composition of buffalo milk in China. *Food Control* **18**:742–746.
- Harper A, Naghibi MM, Garcha D. 2018. The role of bacteria, probiotics and diet in irritable bowel syndrome. *Foods* **7**(2):13.
- Hashmi S, Saleem Q. 2015. An investigation on microbiological and chemical quality of buffalo milk supplies. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **4**:78–83.
- Hassan L, Mohammed HO, McDonough PL. 2000. A crosssectional study on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds. *J Dairy Sci* **83**:2441–2447.
- Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**:6175–6181.
- Houser BA, Donaldson SC, Kehoe SI, Heinrichs AJ, Jayarao BM. 2008. A Survey of Bacteriological Quality and the Occurrence of *Salmonella* in Raw Bovine Colostrum. *Foodborne Pathogens and Disease* **5**(6), 853–858.
- Huijps K, Lam TJ, Hogeveen H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res* **75**:113–120.
- Chaibenjwong P, Foster SJ. 2011. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Microbiol.* **193** (2):125-135.
- Chatterjee SN, Bhattacharjee I, Chatterjee SK, Chandra G. 2006. Microbiological examination of milk in Tarakeswar, India with special references to coliforms. *Afr. J. BIotechncol.* **5**:1383-1385.
- ISO 6887. 2017. Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Standard, Geneva.
- Jayarao BM, Donaldson SC, Straley BA, Sawant AA, Hegde NV, Brown JL. 2006. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J Dairy Sci* **89**:2451–2458.
- Kadooka Y, Sato M, Ogawa A, Miyoshi M, Uenishi H, Ogawa H, Ikuyama K, Kagoshima M, Tsuchida T. 2013. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on

- abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *Br J Nutr* **110**(9):1696–1703.
- Kagkli DM, Vancanneyt M, Hill C, Vandamme P, Cogan TM. 2007. Enterococcus and Lactobacillus contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology* **114**(2), 243–251.
- Kemal J. 2014. A review on the public health importance of bovine salmonellosis. *J Vet Sci Technol.* **5**(02):175-82.
- Khan M, Khan A. 2006. Basic facts of mastitis in dairy animals: a review. *Pak Vet J.* **26**:204–8.
- Khare A, Gaur S. 2020. Cholesterol-lowering effects of Lactobacillus species. *Curr Microbiol* **77**(4):638–644.
- Kibebew K. 2017. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *J Biol Agric Healthc.* **7**:1–14.
- Kim BY, Kinsella JE. 1989. Rheological changes during slow acid induced gelation of milk by D-glucono- D-lactone. *J Food Sci* **54**:894–900.
- Kleerebezem M, Hugenholtz J. 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**:232–237.
- Lakicevic B, Stjepanovic A, Miliijasevic M, Terzic Vidojevic A, Golic N, Topisirovic L. 2010. The presence of *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes* in a chosen food processing establishment in Serbia. *Arch. Biol. Sci.* **62** (4):881-887.
- Le Gall T, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Nassif X, Denamur E. 2007. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol. Biol. Evol.* **24**:2373–2384.
- Ling L, Renye J, Feng L, Zeng Q., Tang Y, Huang L, Ren D and Yang, P. 2016. Characterization of the indigenous microflora in raw and pasteurized buffalo milk during storage at refrigeration temperature by high-throughput sequencing. *Journal of Dairy Science* **99**(9): 7016-7024.
- Maijala R, Lyytikäinen O, Johansson T, Autio T, Aalto T, Haavisto L, Honkanen-Buzalski T. 2001. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. *International Journal of Food Microbiology* **70** (1–2): 97-109.
- Magnusson M, Svensson B, Kolstrup C, Christiansson A. 2007. *Bacillus cereus* in free-stall bedding. *J. Dairy Sci.* **90** (12), 5473-5482.
- Margulis L, Jorgensen JZ, Dolan S, Kolchinsky R, Rainey FA, Lo SC. 1998. The arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc. Nat. Acad. Sci* **95** (3), 1236-1241.
- Martin NH, Trmčić A, Hsieh TH, Boor KJ, Wiedmann M. 2016. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. *Frontiers in microbiology* **7**, 1549.

- El-Gendi MNM, Ali LMT. 2012. Evaluation Of The Hygienic Quality Of Raw Milk Based On The Presence Of Bifidobacteria Spp. As An Indicator Of Faecal Contamination In Assiut City. *Assiut Vet. Med. J.* **58**:389-395.
- Mattera M, Manzi P, Pizzo ferrato L. 2007. Buffalo milk and cheese from animal to human nutrition part 1: the unsaponifiable fraction. *Ital J Anim Sci* **6**:1123–1126.
- Martucciello A, de Mia GM, Giammarioli M, de Donato I, Iovane G, Galiero G. 2009. Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus from Three Water Buffalo Fetuses (*Bubalus Bubalis*) in Southern Italy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **21**:137–140.
- Medhammar E, Wijesinha-Bettoni R, Stadlmayr B, Nilsson E, Charrondiere UR, Burlingame B. 2012. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **92**:445–474.
- Menard O, Ahmed S, Rousseau F, Briard-Bion V, Gaucheron F, Lopez C. 2010. Buffalo vs.cow milk fat globule: size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat membrane. *Food Chem* **120**:544–551.
- Michalski M-C, Camier B, Briard V, Leconte N, Gassi J-Y, Goudéranche FC, Fauquant J. 2004. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and functional properties of Emmental cheese. *Lait* **84**:343–358.
- Mohran MA. 1991. Effect of stage of lactation on whey proteins of buffaloes. *Egypt J Dairy Sci* **19**:77–82.
- Montagna MT, Santacroce MP, Spilotros G, Napoli C, Papa A, Dragoni I. 2004. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheese in Southern Italy. *Mycopathologia* **158**:245–249.
- Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ. 2002. Molecular characterization of *Salmonella* spp. isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. *J Food Prot* **65**:1100–1105.
- Navrátilová P, Králová M, Janštová B, Přidalová H, Cupáková Š, Vorlová L. 2012. *Hygiena produkce mléka. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.* ISBN 978-80-7305-625-4.
- Nielubowicz GR, Mobley HLT. 2010. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**:430–441.
- Ingawale MV, Double RL. 2004. Buffalo reproduction in India: an overview. *Buffalo Bulletin* **23** (1):4–9.
- Ismail AA, El-Deeb SA. 1973. Effect of heat processing, storing and homogenization on the viscosity, opacity and stability of cow and buffalo milks. *Zeit Leben Untersch Forsch* **152**:202–207
- Jainudeen MR. 2002. Buffalo Husbandry - Asia. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 186–193.
- Joshi BC, McDowell RE, Sadhu DP. 1968. Body surface evaporation rates at low and high temperatures in Murrah buffalo. *J. Dairy Sci.* **51** (10):1689–1692.

- Kansal VK, Priyadarshini S. 2002. Lysozyme activity in buffalo milk: effect of lactation period, parity, mastitis, season in India, pH and milk processing treatment. *Asian-Aust J Anim Sci* **15**:895–899.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123–140.
- Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 393–409.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **41**(2):103–125.
- Kumar JS, Kansal VK. 2005. Effect of breed and parity of animals, stage of lactation and processing of milk on the content of conjugated linoleic acid in dairy products. *Milchwissenschaft* **60**:370–372.
- Leclerc H, Mossel DA, Edberg SC, Struijk CB. 2001. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol.* **55**:201-234.
- Losito F, Arienzo A, Bottini G, Priolisi FR, Mari A, Antonini G. 2014. Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. *Journal of Dairy Science* **97**: 46–55.
- Marai IFM and Haebe AAM. 2010. Buffalo's biological functions as affected by heat stress – a review *Livestock Science* **127**: 89–109.
- Mendonca A, Thomas-Popo E, Gordon A. 2020. Microbiological considerations in food safety and quality systems implementation. *Food Safety and Quality Systems in Developing Countries*, 185–260.
- Mohamed KS, Al-Talib WA, Al-Kashab LA. 1990. Some water soluble vitamins in different types of milk and their stabilities towards light and oxygen. *Egypt J Dairy Sci* **18**:37–44.
- Haggag HF, Hamzawi LF, Mahran GA, Ali MM. 1991. Physico-chemical properties of colostrums, clinical and subclinical mastitic buffalo milk. *Egypt J Dairy Sci* **19**:55–63.
- Oliveira AA, Pinheiro Jr. JW, Mota RA, Cunha ML, Lopes CA, Rocha NS. 2011. Phenotype characterization of *Staphylococcus* species strains isolated from buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **23**: 1208–1211.
- Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE. 2009. Food Safety Hazards Associated with Consumption of Raw Milk. *Foodborne Pathogens and Disease* **6** (7): 793–806.
- Ostrý V. 1998. Vlákňité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. SZU, Praha.
- O'Mahony M, Cowden J, Smyth B, Lynch D, Hall M, Rowe B, Teare EL, Tettmar RE, Rampling AM, Coles M. 1990. An outbreak of *Salmonella saint-paul* infection associated with beansprouts. *Epidemiol Infect.* **104**(2):229-35.

- Pandya AJ, Acharya MR, Goel BK, Upadhyay KG. 2004. Heat stability of buffalo milk—a review. *Indian J Dairy Sci* **57**:153–161.
- Pasquini M, Tommei B, Mattii S. 2003. Buffalo milk: proteins electrophoretic profile and somatic cell count. *Ital J Anim Sci* **2**:299–301.
- Pereira-Dias S, Potes ME, Marinho A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *Int J Food Microbiol* **60**:55–63.
- Pisano MB, Scano P, Murgia A, Cosentino S, Caboni P. 2016. Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *Food Chemistry* **192**:618–624.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.* **6**(3):285-306.
- Preethirani PL, Isloor S, Sundareshan S, Nuthanalakshmi V, Deepthikiran K, Sinha AY, Rathnamma D, Nithin Prabhu K, Sharada R, Mukkur TK, Hegde NR. 2015. Isolation, biochemical and molecular identification, and in-vitro antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from bubaline subclinical mastitis in South India. *PLoS One* **10**: e0142717.
- Ortolani MBT, Anderson KY, Moraes PM, Viçosa GN, Nero LA. 2010. Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease* **7**(2), 175–180.
- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**:664–698.
- Rahimi E, Momtaz H, Behzadnia A, Baghbadorani ZT. 2014. Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4**:50–53.
- Ray B, Bhunia A. 2013. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, Boca Raton.
- Razmpoosh E, Zare S, Fallahsadeh H et al (2020) Effect of a low energy diet, containing a high protein, probiotic condensed yogurt, on biochemical and anthropometric measurements among women with overweight/obesity: a randomised controlled trial. *Clin Nutr ESPEN* **35**:194–200.
- Robinson RK. 2005. *Dairy Microbiology Handbook*. John Wiley & Sons, New York.
- Roginski H, Foquay JW, Fox PF. 2003. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, New York.
- Romero J, Benavides E, Meza C. 2018. Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. *Front Vet Sci.* **5**:273.

- Ryu JH, Beuchat LR. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J Food Prot.* **68**(12):2614-22.
- Santos FDS, Mazzoli A, Maia AR, Saggese A, Isticato R, Leite F, Iossa S, Ricca E, Baccigalupi L. 2020. A probiotic treatment increases the immune response induced by the nasal delivery of spore-adsorbed TTFc. *Microb Cell Factories* **19**(1):42.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. *Emerg Infect Dis.* **17**(1):7-15.
- Shafakatullah N, Chandra M. 2014. Screening of raw buffalo's milk from Karnataka for potential probiotic strains. *Res J Rec Sci* **3**:2502.
- Sharafedinov KK, Plotnikova OA, Alexeeva RI, Sentsova TB, Songisepp E, Stsepetova J, Smidt I, Mikelsaar M. 2013. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients: a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutr J* **12**:138.
- Sharma R, Kaur S, Rajput YS, Kumar R. 2009. Activity and thermal stability of indigenous enzymes in cow, buffalo and goat milk. *Milchwissenschaft* **64**:173–175.
- Sharma R, Rajput YS, Dogra G, Tomar SK. 2007. Estimation of vitamin B12 by ELISA and its status in milk. *Milchwissenschaft* **62**:127–131.
- Shi C, Maktabdar M. 2022. Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Against Spoilage Molds in Dairy Products – A Review. *Front. Microbiol.* **12**:819684.
- Sharma GS, Roy NK. 1983. Studies on thermal properties of buffalo milk. I Thermal conductivity. *Indian J Dairy Sci* **36**:141–145.
- Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** (22): 14422–7.
- Schafberg R, Schmidt R, Thiele M, Swalve HH. 2007. Fat globule size distribution in milk of a German buffalo herd. *Ital J Anim Sci* **6**:1080–1083.
- Siró I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite* **51**(3):456-67.
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A, Granum PE. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **32** (4), 579-606.
- Stergiadis S, Nørskov NP, Purup S, Givens I, Lee MRF. 2019. Comparative Nutrient Profiling of Retail Goat and Cow Milk. *Nutrients* **11**(10):2282.

- Stevens MP, Humphrey TJ, Maskell DJ. 2009. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364: 2709-2723.
- Swaminathan B. 2001. *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 2: 383-409.
- Talpur FN. 2007. Fatty acid composition of ruminant milk, meat and dairy products of livestock in Sindh, Pakistan. Ph.D. Thesis, Univ Sindh, Jamshoro, Pakistan.
- Taye Y, Degu T, Fesseha H, Mathewos M. 2021. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *ScientificWorldJournal* 4697445.
- Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:207–217.
- Tenhagen BA, Koster G, Wallmann J, Heuwieser W. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* 89:2542–2551.
- Thomas CS. 2004. Milking management of dairy buffaloes. Doctoral Thesis, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria, 455.
- Uzcátegui D, Candelo S, Gómez J, Mora Y, Vergel C, Lara N, Vielma J. 2018. Microbiological Quality of Raw Milk of *Bubalus bubalis* in a buffalo farm. *Acta Bioclinica* 8 (16): 2244-8136.
- Varricchio ML, Di Francia A, Masucci F, Romano R, Proto V. 2007. Fatty acid composition of Mediterranean buffalo milk fat. *Italian Journal of Animal Science* 6:509-511.
- Vijaya Kumar B, Vijayendra SVN, Reddy OVS. 2015. Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. *J Food Sci Technol* 52(10):6112–6124.
- Vlková E, Salmonová H, Bunešová V, Geigerová M, Rada V, Musilová Š. 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* 34:27-33.
- Waldner LL, MacKenzie KD, Köster W, White From AP. 2012. Exit to Entry: Long-term survival and transmission of *Salmonella*. *Pathogens* 1:128-155.
- Zhao X, Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J Anim Sci.* 86(13):57-65.



## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

BM – buvolí mléko  
BMK – bakterie mléčného kvašení  
CLA – konjugovaná kyselina linolenová  
CN - kasein  
CPM – celkový počet mikroorganismů  
HUS – hemolyticko-uremický syndrom  
KM – kravské mléko  
LAB – lactic acid bacteria  
PSB – počet somatických buněk  
SFA – nasycené mastné kyseliny  
SVP – správná výrobní praxe  
TK – tuková kapénka  
TPC – total plate count  
USFA – nenasycené mastné kyseliny

## 10 Samostatné přílohy

**Příloha 1** – Kompletní výsledky z mikrobiologického rozboru (část I)

Rok	Týden odběru	celkový počet MO	<i>E. Coli</i>	Koliformní bak. Ostatní	Koliformní bak. Celkem	BMK
2021	45	155,89	1	0	0	42,34
2021	46	536,36	0	0	0	93,69
2021	48	819,82	0	0	0	309,09
2021	49	990,99	0	0	0	34
2022	2	1233,12	0	20	20	123
2022	3	131,53	0	0	0	77,48
2022	4	590,91	0	0	0	33,64
2022	6	22727,27	0	0	0	32,73
2022	7	6876,57	0	0	0	18
2022	8	6846,847	0	0	0	227,2727

**Příloha 2** – Kompletní výsledky z mikrobiologického rozboru (část II)

Rok	Týden odběru	Laktobacily	Bifidobakterie	Kvasinky	Plísně	Rod <i>Staphylococcus</i>
2021	45	0	0	0	0	27,3
2021	46	0	0	0	0	50
2021	48	0	0	0	3,64	390,91
2021	49	0	0	0	8,18	8,18
2022	2	1	0	0	0	252,25
2022	3	0	0	0	1	10
2022	4	0	0	0	1	11,82
2022	6	0	0	15,45	9,09	272,73
2022	7	4	0	2,7	4,54	54,05
2022	8	2	24954,95	2,7	360,36	1306

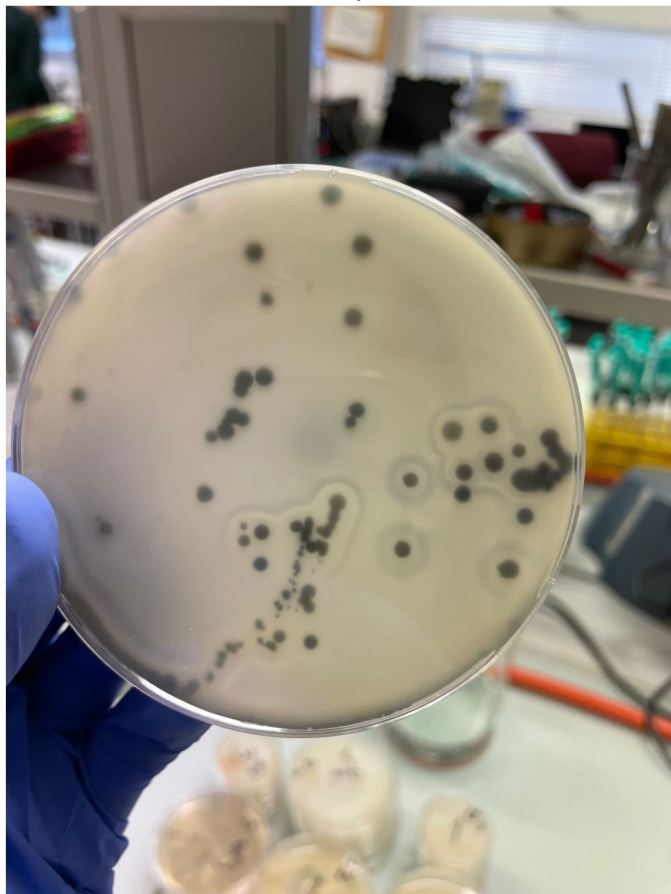
### Příloha 3 – Kompletní výsledky z mikrobiologického rozboru (část III)

rok	týden odběru	Koagulázopozitivní <i>S. aureus</i>	Salmonely	Listerie	Kvasná zkouška
2021	45	4,55**	Negativní	Negativní	Kyselinotvorné
2021	46	0	Negativní	Negativní	Kyselinotvorné
2021	48	0	Negativní	Negativní	Kyselinotvorné
2021	49	0	Negativní	Negativní	Kyselinotvorné
2022	2	127,27*	Negativní	Negativní	Proteolytické
2022	3	0	Negativní	Negativní	Proteolytické
2022	4	0	Negativní	Negativní	Proteolytické
2022	6	0	Negativní	Negativní	Proteolytické
2022	7	0	Negativní	Negativní	Proteolytické
2022	8	126126,1**	Negativní	Negativní	Inhibiční látky

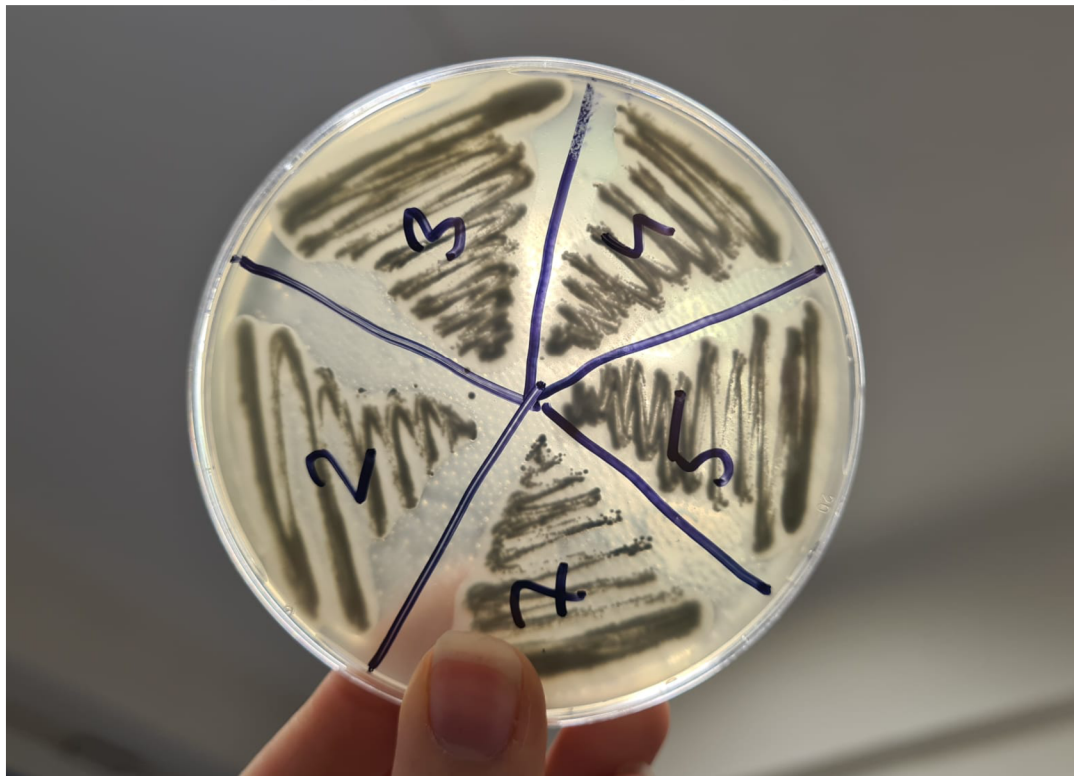
\* Staphylase test pozitivní

\*\* Staphylase test negativní

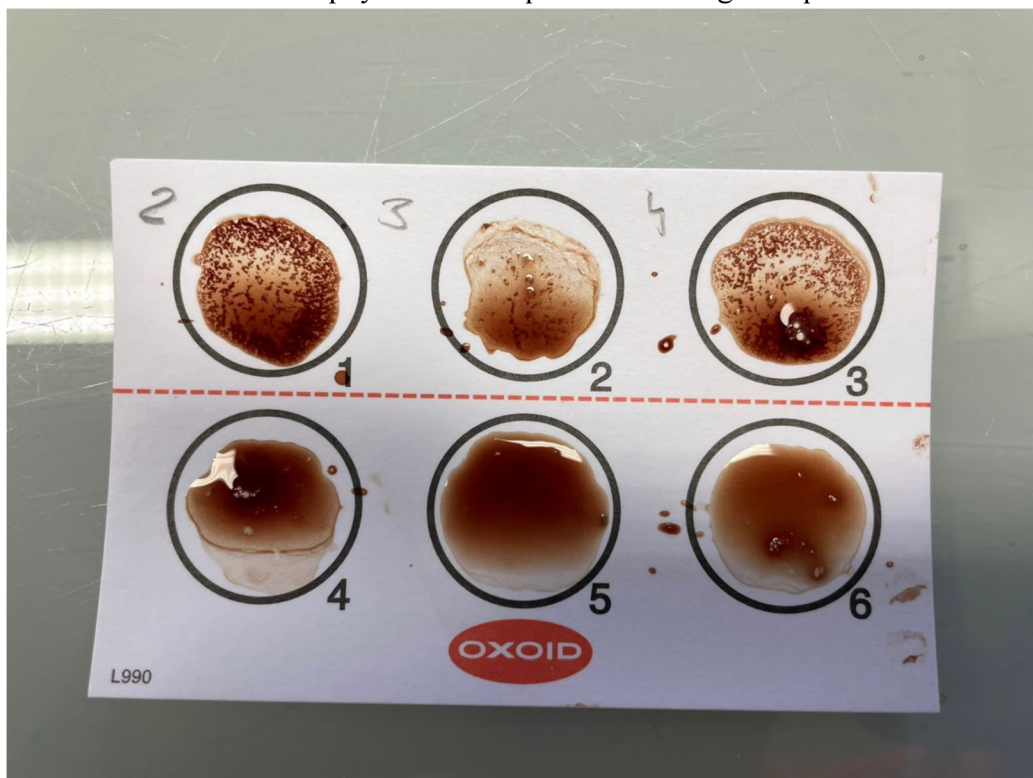
### Příloha 4 – Snímek narostlých kolonií *S. aureus* na Petriho misce



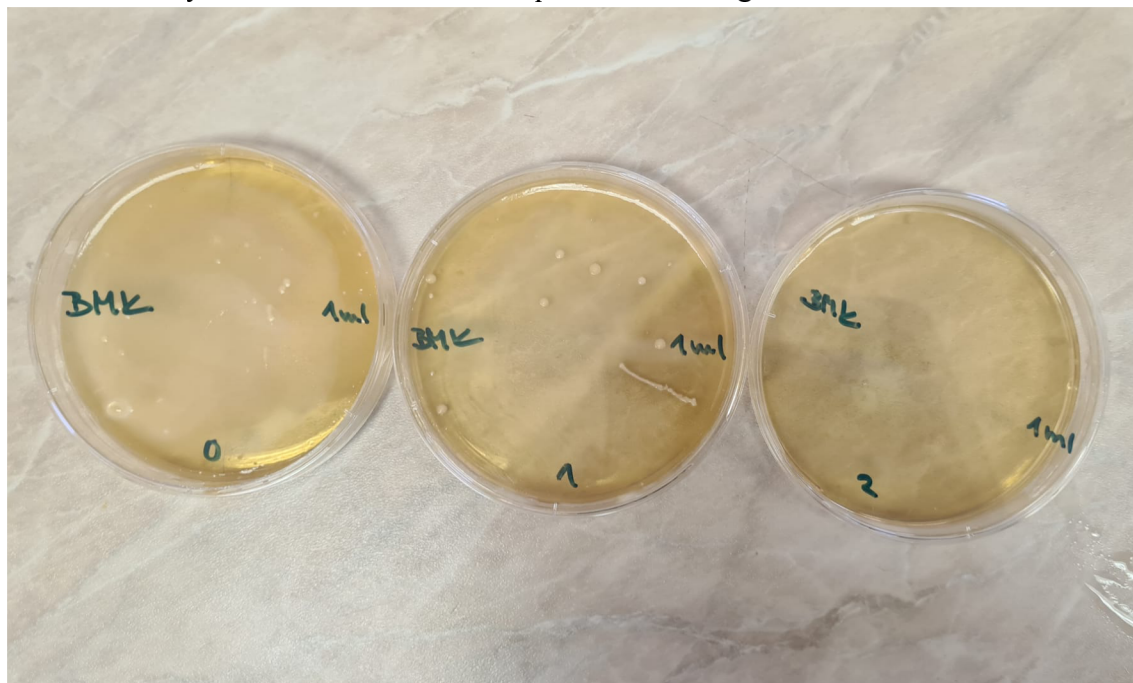
**Příloha 5** – Snímek přípravy na konfirmační test za pomoci přeočkování *S. aureus*



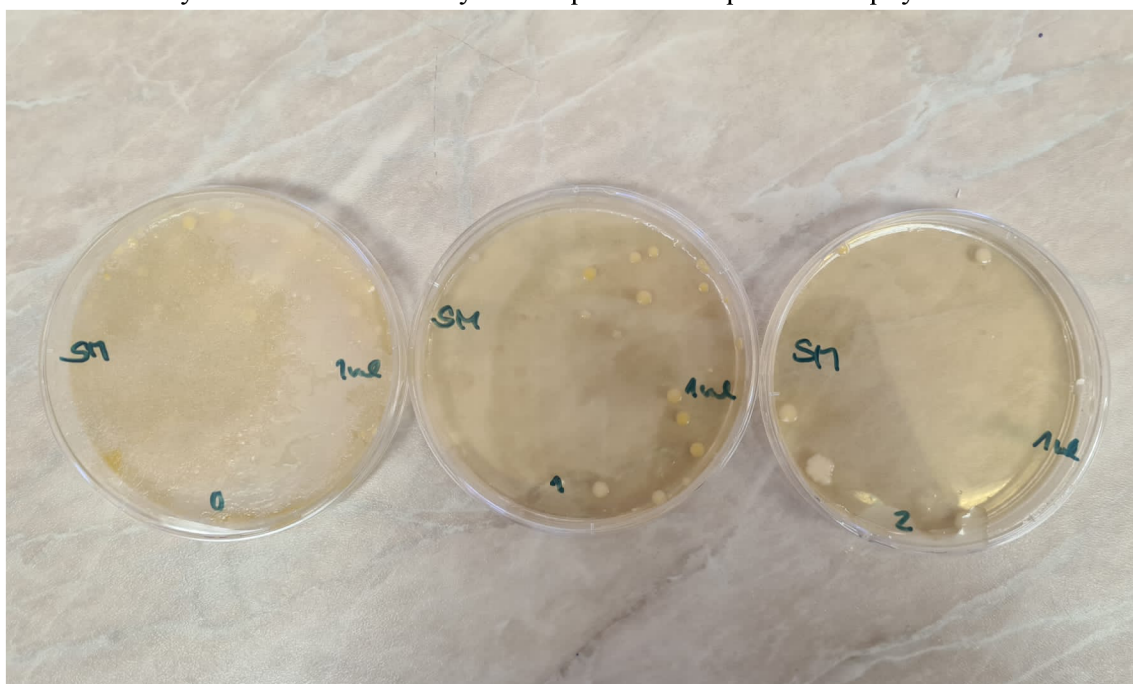
**Příloha 6** – Pozitivní Staphylase test na přítomnost koagulázopozitivní *S. aureus*



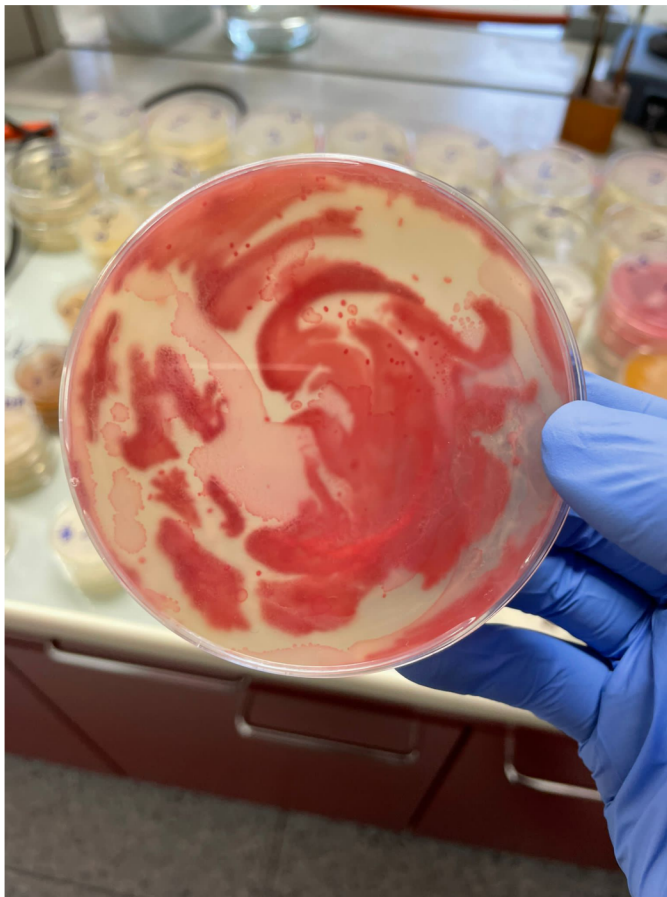
**Příloha 7** – Výsledek kultivace BMK za pomoci MRS Agar



**Příloha 8** – Výsledek stanovení stafylokoků po kultivaci pomocí Staphylococcus medium



**Příloha 9** – Výsledek kultivace CPM s přítomnými bakteriemi rodu *Serratia*



**Příloha 10** – Výsledek kvasné zkoušky s převahou kyselinotvorných bakterií



**Příloha 11** – Výsledek kvasné zkoušky s přítomností inhibičních látek

