



# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

## SLEDOVÁNÍ MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY MLÉKA Z MLÉČNÝCH AUTOMATŮ

AUTOR	Radka Čechová, Ivana Němcová
ŠKOLA	Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, Brno
KRAJ	Jihomoravský
OBOR	Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Brno 2017

Brno 2017

# SLEDOVÁNÍ MIKROBIOLOGICKÉ KVALITY MLÉKA Z MLÉČNÝCH AUTOMATŮ

## MONITORING OF MICROBIOLOGICAL QUALITY MILK OF MILK FROM VENDING MACHINES

AUTOR           Radka Čechová, Ivana Němcová  
ŠKOLA           Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, Brno  
KRAJ             Jihomoravský  
ŠKOLITEL       MVDr. Lenka Necedová Ph.D.  
OBOR            Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní  
                  hospodářství

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou práci na téma Sledování mikrobiologické kvality mléka z mléčných automatů jsme vypracovaly samostatně pod vedením MVDr. Lenky Necidové Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 30. 1. 2017

Podpis:

Brno 2017



Veterinární a farmaceutická  
univerzita Brno



**Jihomoravský kraj**



### **Poděkování**

Děkujeme našim rodinám za jejich pochopení, toleranci a stálou podporu. Další díky patří MVDr. Lence Necedové Ph.D., za její trpělivost s námi a velké pomoci s touto prací, také celému pavilonu profesora Lenfelda za poskytnutí prostoru laboratoří, prohlídku a následnou konzultaci.

Tato práce byla provedena za finanční podpory Jihomoravského kraje.

Brno 2017

## **Anotace**

Tato práce se věnuje sledování mikrobiologické kvality syrového kravského mléka z brněnských prodejních automatů v období květen až prosinec 2016. Sledování bylo zaměřeno na stanovení celkového počtu mikroorganismů a počtů *Staphylococcus aureus*, jejichž množství je u syrového kravského mléka určeného k přímému prodeji limitováno legislativou. Pro stanovení byly použity plotnové metody z řady ČSN ISO. Celkové počty mikroorganismů byly překračovány u jednotlivých vzorků v průběhu celého sledovaného období, počty *S. aureus* byly překročeny u tří vzorků a to v měsíci říjnu a listopadu. Výsledky naší studie potvrdily důležitost a nezbytnost tepelného ošetření syrového kravského mléka před jeho konzumací.

## **Klíčová slova**

Syrové mléko, patogenní mikroorganismy, bezpečnost potravin

## **Annotation**

This work focuses on monitoring the microbiological quality of raw cow's milk from Brno vending machines in the period from May to December 2016. The monitoring was aimed at determining the total number of microorganisms and *Staphylococcus aureus*, whose amount in raw cow's milk intended for direct sale is limited by legislation. For the quantification we used ISO plate count methods. Total numbers of microorganisms were exceeded in particular samples throughout the whole period, the number of *S. aureus* was exceeded in three samples in the months of October and November. The results of our study confirmed the importance and necessity of heat treatment of raw cow's milk prior to its consumption.

## **Keywords**

Raw milk; pathogens; food safety

## Obsah

1	Literární úvod.....	13
1.1	Hygiena získávání mléka .....	13
1.2	Přímý prodej mléka ze dvora .....	16
1.3	Legislativní podklady pro přímý prodej mléka.....	16
1.4	Rizika konzumace syrového mléka .....	18
2	Cíl práce.....	23
3	Metodika .....	24
3.1	Stanovení CPM.....	24
3.2	Stanovení <i>S. aureus</i> .....	25
4	Výsledky .....	27
5	Diskuze .....	29
6	Závěr .....	30
	Literatura .....	31
	Seznam příloh.....	33

# 1 Literární úvod

## 1.1 Hygiena získávání mléka

Mléko je díky svému biochemickému složení, velkému obsahu vody a téměř neutrálnímu pH výborným živným médiem pro růst mikroorganismů (Fernandes, 2009).

**Primární mikroflóra** - dostává se do mléka ještě před dojením, vnitřní cestou (krevním oběhem), nebo vnější cestou (strukovým kanálkem). U zdravých dojnic lze mikrobiální kontaminaci mléka krevním oběhem zanedbat, neboť v krvi přítomné fagocyty a protilátky brání průniku mikroorganismů z povrchu těla a z gastrointestinálního traktu (trávicí soustava) do krve a dále do mléka. Běžnější je průnik mikroorganismů strukovým kanálkem. Obecně nemá primární mikroflóra větší vliv na jakost a trvanlivost mléka, je poměrně brzy potlačena mikroflórou sekundární (Navrátilová et al., 2012).

**Sekundární mikroflóra** - kontaminuje mléko při dojení a během dalšího zpracování. Jako zdroj sekundární mikroflóry mléka bereme povrch těla dojnice (hlavně vemeno a struky), krmivo, stelivo a výkaly, dojící zařízení a úchovné tanky, voda, vzduch a dojiči.

**Mléčná žláza** - mléko získané přímo z mléčné žlázy zdravých dojnic bývá téměř sterilní, počet mikroorganismů uvnitř mléčné žlázy je velmi nízký, jedná se především o grampozitivní koky (streptokoky, stafylokoky, mikrokoky), bakterie mléčného kvašení, korynebakteria, příp. *Pseudomonas* spp. a kvasinky.

**Záněť mléčné žlázy (mastitida)** - mastitidní mléko má změněné senzorycké i fyzikálně-chemické vlastnosti a zvýšený počet somatických buněk a bakterií, především patogenních. Nejčastějšími původci zánětu jsou *Streptococcus agalactiae* a *Staphylococcus aureus*, dále *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* či *Pseudomonas aeruginosa*, vzácně *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*. Patogenní mikroorganismy obvykle pronikají do mléčné žlázy strukovým kanálkem.

**Povrch vemene a struků** - zde bývá zastoupena typická kožní mikroflóra, která je doplněna o mikroorganismy pocházející z půdy, podestýlky, výkalů a krmiva. Jedná se o směs koliformních bakterií, psychotrofních, termorezistentních a sporotvorných mikroorganismů, které při dojení kontaminují mléko. Z patogenních mikroorganismů zde mohou být přítomny salmonely, *Campylobacter* spp. či *Listeria monocytogenes*. V závislosti na způsobu ustájení dojnic kolísají počty a druhy mikroorganismů. Pro získání kvalitního mléka a omezení jeho mikrobiální kontaminace je základním předpokladem správně provedená toaleta vemene před vlastním dojením a ošetření struků po nadojení.

Brno 2017



**Vzduch** - nacházející se ve stáji je poměrně nevýznamným zdrojem kontaminace syrového mléka. Stájové ovzduší obsahuje zejména mikrokoky, koryneformní bakterie a spory *Bacillus* spp., méně zastoupeny jsou streptokoky či gramnegativní tyčinky. Mikroorganismy v ovzduší pocházejí z prachu, suché podestýlky, sena, dalších suchých krmiv nebo z kapének aerosolu vzniklého při močení zvířat nebo manipulaci s vlhkými hmotami. Dále může ke kontaminaci syrového mléka dojít při ručním dojení, při skopnutí strukových nástavců nebo při nasávání vzduchu do mléčného potrubí při dojení (Navrátilová et al., 2012).

**Voda** - má na farmách veliký význam a široké využití, slouží k napájení zvířat, k omývání mléčné žlázy a k výplachům dojícího zařízení a úchovných tanků. Svou kvalitou musí odpovídat požadavkům na pitnou vodu a bývá pravidelně kontrolována. Individuální zdroje pitné vody představují zvýšené riziko, zejména v případě jejich kontaminace fekálními bakteriemi, příp. půdními saprofyty a mikroorganismy z rostlin. V tomto případě se voda stává zdrojem psychrotrofních mikroorganismů (zejména *Pseudomonas* spp.), koliformních bakterií, dále sporotvorných bakterií (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) a enterkoků. Ojediněle se mohou ve vodě vyskytovat i střevní patogeny (např. patogenní kmeny *Escherichia coli* či salmonely).

**Krmivo** - má vliv kromě na senzorké a fyzikálně-chemické parametry také na složení mikroflóry syrového mléka. Za vhodnou stravu dojnice je považováno kvalitní luční seno, louky a pastevní porosty jsou totiž zdrojem žádoucích bakterií mléčného kvašení (mléčných streptokoků a laktobacilů). Mikrobiální jakost mléka naopak zhoršuje zkrmování okopanin, zkaženého krmiva či nekvalitně připravené siláže. Zdrojem aerobních a anaerobních sporulujících bakterií a plisní jsou hlínou znečištěné okopaniny. Zkažené krmivo bývá často kontaminováno koliformními bakteriemi. Nekvalitně připravené siláže mají velký vliv na mikroflóru mléka, především pokud jsou znečištěné hlínou nebo nedostatečně fermentované, tak obsahují velké počty spor *Clostridium* spp. Spory přechází do mléka a jsou příčinou řady vad u mléčných výrobků (zrající sýry, kojenecká a dětská výživa,..). Nedostatečně fermentované siláže jsou často také zdrojem patogenních bakterií *Listeria monocytogenes*, které se v nich úspěšně pomnožují (Navrátilová et al., 2012).

Řada studií dokazuje, že správně provedená sanitace (mechanické čištění a dezinfekce) je primárním faktorem ovlivňujícím úroveň mikrobiální kontaminace syrového mléka.

Zastoupení a počet mikroorganismů v syrovém mléce kolísá v závislosti na úrovni hygieny získávání mléka, ročním období, používaném krmivu a stupni zchlazení mléka po nadojení. V čerstvě nadojeném mléce zdravých dojnic bývá v 1 ml řádově  $10^2$  -  $10^3$  mikroorganismů.

V mléce se nacházejí mikroorganismy, které můžeme rozdělit do tří skupin:

- a) patogenní a toxinogenní mikroorganismy
- b) mikroorganismy působící kažení mléka
- c) mikroorganismy využívané při výrobě fermentovaných mléčných výrobků.

Brno 2017

Některé druhy se mohou současně vyskytovat ve více uvedených skupinách (např. *Bacillus cereus* či bakterie mléčného kvašení). Pro produkci kvalitního syrového mléka je hlavním kritériem nízké zastoupení mikroorganismů způsobujících kažení a absence patogenních mikroorganismů (Navrátilová et al., 2012).

Kažení mléka a mléčných výrobků doprovází výrazná změna sensorických vlastností (změny vůně, chuti, vzhledu a konzistence). Vznikají jednak v důsledku fermentace sacharidů (mléčné, propionové či máselné kvašení), jednak degradací proteinů a tuků účinkem bakteriálních proteolytických a lipolytických enzymů. Mezi nejvýznamější mikroorganismy působící kažení mléka a mléčných výrobků patří gramnegativní tyčinky (*Pseudomonas* spp., koliformní bakterie), grampozitivní sporotvorné bakterie (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.), bakterie mléčného kvašení, koryneformní bakterie, kvasinky a plísňe.

**Psychrotrofní bakterie** - Většina patří do čeledi *Pseudomonaceae* (nejčastěji *Pseudomonas fluorescens*), produkují enzymy, které působí kažení mléka a tepelně ošetřených mléčných výrobků. Při množení psychrotrofních bakterií dochází v mléce k nežádoucím sensorickým změnám (např. hořká a ovocná chuť a vůně).

**Koliformní bakterie** - Nejčastěji přítomny rody *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* a *Citrobacter*. Přímým zdrojem je střevní trakt teplokrevných zvířat. Hrají významnou roli jako indikátory úrovně hygieny získávání mléka a jeho případné fekální kontaminace, mohou indikovat i přítomnost střevních patogenů.

**Termorezistentní bakterie** - Jsou mikroorganismy, které přežívají pasteraci mléka, sporotvorné mikroorganismy (rody *Bacillus* a *Clostridium*) a nesporotvorné (rody *Micrococcus*, *Microbacterium* spp. a *Enterococcus* spp.).

**Bakterie mléčného kvašení** - Nejčastěji zastoupeny rody v mléce jsou *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* a *Enterococcus*. Mohou způsobit nežádoucí kysnutí, sensorické vady a změnu textury mléka a mléčných výrobků.

**Kvasinky a plísňe** - Působí kažení mléčných výrobků. Z kvasinek nejčastěji *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* a plísňe rodu *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* spp.

**Patogenní mikroorganismy** - Jsou schopné vyvolat alimentární infekce či intoxikace. Patří sem *Styphilococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, Viry a Protozoa.

## 1.2 Přímý prodej mléka ze dvora

V posledních letech uvítala řada spotřebitelů v České republice možnost nákupu syrového kravského mléka tzv. „ze dvora“ (přímý prodej mléka na farmách) nebo prostřednictvím prodejních automatů na mléko. Tyto možnosti nákupu otevřely diskusi o bezpečnosti konzumace syrové mléka a nutnosti dostatečně informovat veřejnost o rizicích spojených s nedodržením zásad tepelného opracování zmíněné potraviny.

Přímý prodej mléka od zvířat z vlastního chovu může chovatel realizovat pouze se souhlasem příslušné krajské veterinární správy (KVS). Prodejní automat na mléko musí být umístěn na území kraje, v němž se daný chov zvířat nachází, nebo v krajích sousedících.

V souladu s evropskou i českou legislativou, musí být přímý prodej mléka uskutečňován pouze v místnosti oddělené od stájí, která je vybavena vhodným chladicím zařízením a ve které je na viditelném místě umístěno upozornění „Syrové mléko, před použitím převařit“. Tento nápis musí být viditelně umístěn také na prodejním automatu (Obrázek č. 1). Je tedy pouze na spotřebiteli, zda syrové mléko před konzumací dostatečně převaří či nikoli.

## 1.3 Legislativní podklady pro přímý prodej mléka

Přímý prodej syrového mléka ze dvora byl v České republice povolen od roku 2003 a od roku 2009 se rozšířil i prodej syrového mléka z mléčných automatů (Bogdanovičová et al., 2009). Legislativně je přímý prodej mléka ošetřen v zákoně č. 166/1999 Sb. o veterinární péči a jeho novele č. 308/2011 Sb. S příchodem prodejních automatů na mléko došlo k úpravě legislativy a byla přijata **Vyhláška č. 128/2009 Sb.** umožňující zemědělcům prodej až 35 % jejich produkce formou tzv. mlékomatů, tedy prodejních automatů na mléko. Dále se přímým prodejem syrového mléka zabývá vyhláška č. 289/2007 Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty a její novela č. 11/2015 Sb., která uvádí maximální limit pro *S. aureus* v syrovém mléce.

Oddíl 4 **Zákona o veterinární péči** „Prodej malých množství vlastních produktů z prvovýroby přímo konečnému spotřebiteli“ v § 27 uvádí, že chovatel může v malých množstvích prodávat se souhlasem Krajské veterinární správy (KVS) syrové, mlékárensky neošetřené mléko a syrovou smetanu (dále jen syrové mléko) pocházející od zvířat z vlastního chovu v místě výroby nebo prostřednictvím prodejního automatu, který je umístěn na území kraje, v němž se nachází chov zvířat, z něhož syrové mléko pochází, nebo krajů sousedících, přímo spotřebiteli pro spotřebu v jeho domácnosti. Chovatel zajistí, že syrové mléko požadavky a kritéria stanovená pro prvovýrobu syrového mléka předpisy ES upravujícími zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu (nařízení ES č. 852/2004) a zajistí laboratorní vyšetření mléka stanovená prováděcím předpisem ke zjištění přítomnosti patogenních mikroorganismů ohrožujících zdraví lidí, a to při podání žádosti KVS o souhlas k prodeji syrového mléka a dále při každé změně v chovu zvířat a každé změně způsobu získávání, ošetřování a zpracování mléka, které by mohlo ovlivnit jeho zdravotní nezávadnost, nejméně však jednou ročně.

Za maloobchodní prodejnu se považuje prodejna s odpovídajícím sortimentem živočišných produktů v obci, která je z obcí, v nichž je taková maloobchodní prodejna, nejbližše hospodářství chovatele. Živočišné produkty musejí pocházet od zdravých zvířat a musí být zdravotně nezávadné a bezpečné z hlediska ochrany zdraví lidí i zvířat a nesmí být zdrojem šíření nákaz a nemocí přenosných ze zvířat na člověka. Tyto živočišné produkty nesmějí být dále uváděny na trh. Chovatel, který prodává nebo dodává produkty z prvovýroby, musí zajistit, aby tyto produkty byly vyráběny v čistém prostředí s používáním zařízení a pracovních nástrojů a pomůcek udržovaných v čistotě. Dále tyto produkty musí být chráněny před vlivy, které by mohly nepříznivě působit na jejich zdravotní nezávadnost, zejména před kontaminací.

Chovatel, který prodává syrové mléko je povinen zpracovat a dodržovat provozní a sanitační řád a na požádání jej předložit KVS. Zjistí-li KVS, že chovatel při prodeji postupuje v rozporu s tímto zákonem nebo předpisy EU, souhlas chovateli odejme. Chovatel, který prodává syrové mléko, musí dále zajistit, že syrové mléko prodávané spotřebiteli splňuje kritérium pro obsah mikroorganismů při teplotě 30 °C v syrovém mléce určeném k výrobě mléčných výrobků, což je stanoveno v Nařízení ES č. 853/2004).

**Ve vyhlášce č. 289/2007 Sb.** a její novele č. 11/2015 Sb. se v § 13 uvádí, že chovatel může v malých množstvích prodávat se souhlasem KVS syrové mléko v místě výroby nebo prostřednictvím prodejního automatu přímo konečnému spotřebiteli pro spotřebu v jeho domácnosti. Syrové mléko musí pocházet od zdravého zvířete z hospodářství úředně prostého tuberkulózy a úředně prostého nebo prostého brucelózy, jež nevykazuje žádné příznaky nakažlivého onemocnění přenosného mlékem na člověka. Dále musí být získáváno hygienickým způsobem v hospodářství, v němž jsou dodržovány hygienické požadavky stanovené zákonem a touto vyhláškou.

Přímý prodej syrového mléka v místě výroby musí být prováděn v místnosti oddělené od stájí, vybavené chladicím zařízením, ve které je na viditelném místě upozornění „Syrové mléko, před použitím tepelně opracovat nebo pasterovat“. Je-li z hospodářství dodáváno mléko do sběrného střediska, standardizačního střediska nebo podniku pro ošetření mléka, musí být místnost sloužící k přímému prodeji syrového mléka v místě výroby oddělena od mléčnice.

V případě přímého prodeje syrového mléka prostřednictvím prodejního automatu musí být na viditelném místě na prodejním automatu umístěno upozornění „Syrové mléko, před použitím tepelně opracovat nebo pasterovat“ (obrázek č.1). Přímý prodej syrového mléka konečnému spotřebiteli prostřednictvím prodejního automatu může být prováděn i v mléčnici. Jde-li však o hospodářství, ze kterého je dodáváno mléko do sběrného střediska, standardizačního střediska nebo podniku pro ošetření mléka, musí být prodej zajištěn tak, aby konečný spotřebitel nevstupoval do mléčnice.

Není-li syrové mléko určené k přímému prodeji prodáno do 2 hodin po nadojení, musí být zchlazeno na 8 °C a zchlazené prodáno do 24 hodin po nadojení, nebo musí být zchlazeno na 6 °C a zchlazené prodáno do 48 hodin po nadojení. Chovatel, který prodává syrové mléko dle výše uvedených požadavků, zajistí vyšetření syrového mléka na přítomnost patogenních mikroorganismů ohrožujících zdraví lidí uvedených v příloze této vyhlášky, což je představováno maximálním limitem 500 KTJ/ml

bakterie *S. aureus*.

Z mikrobiologických limitů je tedy pro syrové kravské mléko legislativně stanoven celkový počet mikroorganismů a počty *S. aureus*. Hranice pro mikroorganismy rostoucí při 30 °C pro syrové kravské mléko udává nařízení ES č. 853/2004. Pro syrové kravské mléko svážené z farem platí limit, který stanovuje obsah mikroorganismů při 30 °C méně nebo rovno 100 000 v 1 ml. Jedná se však o hodnotu průměrnou - klouzavý geometrický průměr za dvouměsíční období s alespoň dvěma vzorky z farmy za měsíc. Kritérium pro syrové mléko používané pro výrobu mléčných výrobků je dle požadavků tohoto nařízení třikrát vyšší než kritérium pro syrové mléko svážené z farem – tj. obsah mikroorganismů při 30 °C musí být bezprostředně před zpracováním nižší než 300 000 v 1 ml. Tento limit představuje absolutní hodnotu a jedná se o limit vztahující se k syrovému kravskému mléku v prodejních automatech. Výše tohoto limitu (300 000 bakterií v 1 ml) vychází z předpokladu, že i v případě dodržení požadavků na teplotu skladování mléka po nadojení (maximálně 8 °C a v případě, že svoz není prováděn každý den nejvýše 6 °C), nedojde během přepravy a skladování k úplnému zastavení růstu bakterií.

Novela z roku 2015 Vyhlášky č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství, uvádí limit pro výskyt *S. aureus* v syrovém mléce, a to v množství  $5 \cdot 10^2$  KTJ/ml.

## 1.4 Rizika konzumace syrového mléka

Informace dostupné na internetové síti nebývají pravdivé a často podávají mylné informace. Dokladem je výňatek z propagačních materiálů konzumentům, který uvádí: „... přírodní mléko čistí organismus, proto je hygienické. Cizí bakterie, které by v něm mohly být obsaženy, jsou neškodné. Mléko se nekazí, nehnije, ale zkysá vlivem kyseliny mléčné. Je zbytečné se obávat, když syrové mléko není úplně čerstvé. I tak si zachová plnou výživnou hodnotu. Je schopné očistit střeva od hnilobných a choroboplodných zárodků. Pasterizované mléko podléhá hnilobě a nemá léčivé vlastnosti.“ M.Toro - Università degli studi di Urbino

Mezi hlavní rizika konzumace syrového mléka patří patogenní organismy, kterým se v mléce, díky svému složení a vlastnostem velice daří a způsobují infekce a intoxikace. Různé patogenní organismy se jinak množí, některé rychleji a některé pomaleji a některé dokonce i vůbec. Následně jsou v textu vyjmenovány nejčastější a významné patogeny v mléce.

### Patogenní organismy

#### *Staphylococcus aureus*

Tento druh je z čeledi *Staphylococcus* nejvýznamnějším. Je to fakultativně anaerobní, nepohyblivý, grampozitivní kok, který dokáže vytvářet hroznovité shluky, které jsou pro něj typické. Dostal své druhové jméno díky produkování zlatožlutého pigmentu, která na krevním agaru může způsobovat

Brno 2017

úplnou hemolýzu. Pokud je pozitivní dokáže koagulovat králičí plazmu. Roste už v přítomnosti 10% NaCl, produkuje proteázy, lipázy a esterázy. *S. aureus* je komenzálem hlavně teplokrevných živočichů a i člověka. Hlavně se vyskytuje ve sliznicích respiračního ústrojí, na pokožce i v traktech. Najdeme ho běžně v mikroflóře vemene. Tudíž zdroj kontaminace jsou klinické a subklinické stafylokokové mastitidy. Za vznik intoxikace mohou stafylokokové enterotoxiny, které vznikají v potravinách jako metabolické produkty při množení této bakterie. Při stafylokokové enterotoxikózy se projevuje nevolností, zvracením, bolestmi břicha, průjmem, bolestmi hlavy bez horečky. Příznaky nastupují už po 1-6 hodin po konzumaci intoxikované potraviny a odezní za dalších 24 hodin. Rizikové množství *S. aureus* v potravine je  $10^5$  KTJ.g<sup>-1</sup>. Prevence růstu je působení chladných teplot a použití technologie, která eliminuje množství těchto bakterií v potravinách (pasterace) (Votava, 2003; Bhunia, 2008).

### ***Listeria monocytogenes***

Tato bakterie patří pod rod *Listeria*, která zahrnuje 6 druhů z nich je horní jmenovaná patogenní pro člověka a zvířata. *L. monocytogenes* je fakultativně anaerobní, nesorotvorná krátká grampozitivní tyčinka, která se vyskytuje samostatně nebo ve dvojicích, jen občas tvoří řetízky. Pokud je teplota do 25 °C je pohyblivá, její pohyb je vířivý. Všechny bakterie z rodu *Listeria* produkuje enzym katalázu, fermentují glukózu s tvorbou kyseliny bez produkce plynu a hydrolizují eskulin. Přežívají i v extrémních podmínkách, kdy je koncentrace soli do 10 %. Jsou psychrotrofní a rostou i ve velkém rozmezí teplot 1-45 °C, chladné teploty pro ně nejsou smrtelné, ale naopak příznivé, přežijí i mražení. Množení *L. monocytogenes* inhibují bakteriociny a bakterie mléčného kvašení. Umrtvují ji však vyšší pasterační teploty nad 80 °C. *L. monocytogenes* je mikroorganismus, který se běžně nachází v půdě, povrchových vodách, odpadech i na rostlinách. U zdravého člověka ji najdeme ve střevním traktu, stejně tak u hospodářských zvířat, ptáků, ryb a hlodavců. Kontaminace syrového mléka nastává při dojení, pokud se objeví listeriová mastitida. Listerióza však není časté onemocnění, ale může dopadnout i smrtelně. Má různé formy – první mírná forma chřipkového charakteru, meningitidy, encefalitidy. Velice nebezpečné je tato nemoc pro těhotné ženy, může dojít k infekci i k potratu. Inkubační doba je různá podle imunitního stavu pacienta a taky dávky této bakterie. Prevence je dobrá hygienická úroveň v hospodářských chovech zvířat a kvalitních krmiv pro ně, také zamezení sekundární kontaminaci (Gelbíčová et al., 2009).

### ***Campylobacter spp.***

Všechny rody co pod tuto bakterii spadají vyvolávají potraty a průjmová onemocnění, také patří mezi nejčastěji diagnostikované patogeny, které způsobují u lidí onemocnění. Kamylobaktery jsou mikroaerofilní, nesorulující, gramnegativní tyčinky, které jsou zakřiveny do tvaru S nebo do spirály s charakteristickým vývrtkovým pohybem. Redukují nitráty, ale nefermentují sacharidy. Kamylobaktery se vyskytují v zažívacím traktu zvířat, ptáků a člověka. Tyto bakterie lze izolovat se syrových potravin (hlavně jako ze živočišného původu), zelenin, kde je riziko z hnojení statkovými hnojivy, mořských plodů a vody. V prostorech veřejného stravování nebo v domácnosti je možná křížová kontaminace. Jelikož mají vysoké nároky na růst, tak se běžně v potravinách nemnoží, ale přežívají. Vyšší riziko je infekce u oslabených jedinců a inkubační doba je 1-7 dnů, nejčastěji hlavně 24-48 hodin. Příznakem je infekce závoreň tenkého a tlustého střeva, projevujeme se vodnatým až

krvavým průjmem, který trvá 3-5 dnů, horečkou, nevolností, bolestmi svalů a hlavy a křečemi obdobných jako u slepého střeva. Prevence je důkladné tepelné opracování potravin a zamezení křížové kontaminace v průběhu skladování potravin (Navrátilová et al., 2012; Bhunia, 2008).

### ***Salmonella spp.***

Salmonely jsou anaerobní nesporelující, gramnegativní tyčinky, s výjimkou dvou druhů jsou všechny pohyblivé. Zkvašují glukózu, jsou laktóza negativní. Většina salmonel využívá jako zdroj uhlíku citráty, dekarboxylují lyzin, arginin, a ornitin, produkují sirovodík. Pokud se provádí test s methylčervení tak vyjde pozitivně, oproti tomu V-P test a indol negativní. Nachází se v zažívacím traktu ptáků, plazů, hmyzu, zvířat a člověka. Bakterie je vylučována fekáliemi a kontaminují životní prostředí a potraviny. Některé sérotypy pro člověka jsou příčinou onemocnění např. tyfů a paratyfů a také průvodce salmonelóz-průjmové onemocnění způsobených zoopatogenními kmeny salmonel. Salmonely jsou v současné době společně s kampylobaktery nejčastějším původci střevních nákaz. Ve většině případů jde jenom o klasickou střevní infekci bez komplikací, Inkubační doba salmonelózy je 12 hodin nebo až 5 dnů, nejčastěji opět 24-48 hodin. Nejvíce se vyskytují průjmy bez přítomnosti krve s velkou frekvencí stolic. Občas se může vyskytnout i zvracení a téměř vždy je přítomna horečka. U malých dětí a starších lidí může být smrtelná. K prevenci patří k zamezení sekundární kontaminaci potravin a používat vysoké teploty při zpracování potravin a nízké při uchovávání (Votava, 2003; Bhunia, 2008).

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* je fakultativně anaerobní, nesporetovná, pohyblivá, krátká gramnegativní tyčinka. Fermentuje glukózu a další cukry za tvorby kyselin a plynu, většina z nich i fermentuje laktózu a D-sorbitol. Většina kmenů je nepatogenních a tvoří běžnou součást střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat. Patogenní *E. coli* jsou klasifikovány do 6 virotypů. Primárním zdrojem jsou přežvýkavci zejména skot, najdeme je i také v ostatních domácích zvířatech, volně žijících zvířat, ptáků, hlodavců a hmyzu. Díky výkalům se dostávají do zevního prostředí, kde se množí, kontaminují vodu a půdu, která se poté používá do statkových hnojiv, které potom kontaminují i ovoce a zeleninu. Kontaminací syrového mléka touto bakterií dochází při dojení případně i přímým vylučováním při coli-mastidách. Projevy jsou krvavé průjmy a první symptomy se objevují 3-9 dní po konzumaci kontaminované potraviny nebo mléka a obvykle přetrvávají 4-10 dní. Dávka, která způsobí infekci, je nízká, uvádí se kolem 50-100 bakterií. Mírná forma se projevuje kolitidou později i zvracení. Postupně se z ní může stát hemoragická kolitida, která zahrnuje až krvavě červenou stolicí. U malých dětí může dojít k selhání ledvin, které se musí řešit i případnou transplantací ledvin. Ochrana před onemocněním je dostatečná hygienická úroveň hygieny, dobrý sanitační režim při dojení a správné tepelné ošetření u mléka (Votava, 2003; Bhunia, 2008).

### ***Další zástupci z čeledi Enterobacteriaceae***

Další bakterie, která má významný vztah k mléku a mléčným výrobkům je *Cronobacter sakazakii*, což je oportunní patogen, který hlavně napadá novorozence a slabé jedince. Nachází se hlavně v sušené mléčné kojenecké výživě, jelikož je tam schopna přežít i řadu měsíců. Onemocnění se však vyskytuje vzácně, ale pokud se objeví, mívá závažný a rychlý průběh s vysokou mírou úmrtnosti až 80

%. Příznaky jsou meningitida a enterokolitida. Prevence je tu hlavně o bezpečném nakládání, skladování a používané mléčné výživě.

### **Sporotvorné bakterie**

#### ***Bacillus spp***

To tohoto rodu patří grampozitivní, pohyblivé, anaerobní, sporotvorné tyčinky. Sporulace ale probíhá jenom za přítomnosti kyslíku. Významným původcem kažení potravin je patogenní druh *B. cereus*, který se vyskytuje hlavně v mléčných výrobcích (sladké sražení mléka, hořknutí smetany) Vzhledem k produkování spor, tak se podílí i na kažení pasterizovaných nebo sterilizovaných výrobcích. Kažení umožňují produkce různých enzymů, které umí degradovat základní složky. Spory *B. cereus* se nachází běžně v půdě, prachu, vodě a je součástí střevní mikroflóry člověka. Kontaminuje mléko, maso a potraviny rostlinného původu. Pokud zkonsumujeme takto kontaminovanou potravinu můžou se naskytnout dvě různé formy onemocnění. První emetický syndrom, který je vyvolaný emetickým toxinem po konzumaci. Hlavní symptom je zvracení, to se objevuje 1-6 hodin po konzumaci a netrvají déle než 24 hodin. Druhé je diarhogenní syndrom, produkují jej enterotoxiny v tenkém střevě. Objevuje se 8-16 hodin po konzumaci potraviny a mezi příznaky patří vodnatý průjem, bolesti a příležitostně zvracení. Potíže přetrvávají 12-24 hodina poté odezní (Votava, 2003; Bhunia, 2008).

#### ***Clostridium spp.***

Tyto sporotvorné tyčinky jsou anaerobní, grampozitivní, které se běžně vyskytují v prostředí, trávicím traktu zvířat a silážích. Některé z nich jsou původci kažení mléčných výrobků, zejména zrajících sýrů. Patogenní druhy jsou *Cl. perfringens* a *Cl. botulinum*. *Cl. perfringens* se dostává do střeva prostřednictvím mléka, kde sporuluje a produkuje toxiny. Poté se rozvíjí zánět doprovázený průjmem a bolestmi. Oproti tomu *Cl. botulinum* způsobuje onemocnění nervového systému tzv. botulismus (Votava, 2003).

#### ***Mycobacterium spp.***

Mykobakteria jsou nepohyblivé, nesporující štíhlé tyčinky. Jedním z nejvíce termorezistantních patogenních mikroorganismů, které se v mléce vyskytují je *M. tuberculosis*. Ke kontaminaci dochází buď primárně (při onemocnění zvířete jsou bakterie vylučovány přímo do mléka) nebo sekundárně (z prostředí, či jako fekální kontaminace) (Votava, 2003).

#### **Další bakteriální původci**

V mléce a mléčných výrobcích dobře přežívají bakterie z rodu *Brucella*. To jsou gramnegativní, aerobní krátké tyčinky, které jsou patogenní pro člověka i zvířata. Mezi nejznámější druhy patří *Br. abortus* a *Br. melitensis*. Syrové mléko mohou kontaminovat i rickettsiemi, zejména druh *Coxiella burnetti* – původce Q-horečky, je to drobná, gramnegativní tyčinka. Vysoce odolná vůči vysychání i chemickým dezinfekčním prostředkům. Patří mezi nejvíce termorezistentní patogeny kontaminují syrové mléko. Pokud uvažujeme o grampozitivních bakteriích, tak musíme zmínit rod *Streptococcus*, kteří jsou častými původci mastitid skotu a poté mohou vyvolat i onemocnění u člověka.

Brno 2017



Nejvýznamější druhy jsou *Str. pyogenes*, *Str. agalactiae*, *Str. uberis*.

### **Kvasinky a plísně**

Tyto mikroskopické houby se vyskytují běžně ve vnějším prostředí. Jsou zdrojem kontaminace mléčných žláz a následně i mléka (stelivo, krmivo, výkaly). Patogenní a toxigenní druhy mohou vyvolat onemocnění u člověka, tím že se podílejí na kažení mléka a jeho výrobcích. Z dojnic bylo izolováno hodně druhů kvasinek, ale závažný výskyt je např. *Candida albicans*, která je patogenní jak pro člověka, tak i pro zvířata. Toxinogenní plísně (*Fusarium*, *Penicillium*) jsou z mléka díky tepelnému ošetření vyhubeny. V mléce ale mohou zůstat jejich sekundární metabolity – mykotoxiny, ty se dostávají do mléku buď z krmiva nebo kontaminující plísně v mléce. Mykotoxiny jsou toxické, karcinogenní a mutagenní látky (Navrátilová et al., 2012).

Prevence odstranění patogenních mikroorganismů je dostatečné převaření mléka v domácnosti (Obrázek č. 4).

## 2 Cíl práce

Cílem práce bylo sledování mikrobiologické kvality mléka ze tří prodejních mléčných automatů na území města Brna v období květen – prosinec 2016. Analýzy byly zaměřeny na ukazatele mikrobiologické kvality a bezpečnosti potravin, které mají být u syrového mléka určeného k přímému prodeji sledovány dle požadavků legislativy. Bylo prováděno stanovení celkového počtu mikroorganismů (požadavek Nařízení ES č. 853/2004) a stanovení počtu *Staphylococcus aureus* (požadavek Vyhlášky č. 289/2007 Sb.). Byly vyhodnoceny počty vzorků vyhovujících a nevyhovujících požadavkům legislativy.

# 3 Metodika

## 3.1 Stanovení CPM

V mikrobiologii pojem CPM (celkový počet mikroorganismů) značí počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (bakterie, kvasinky, plísně), které rostou v neselektivních nutričně bohatých médiích nebo tvoří kolonie na nutričně bohatých agarových půdách za aerobních podmínek během inkubace při 30 °C po dobu 72 hodin.

Výsledkem je stanovení počtu KJT - kolonie tvořících jednotek, v 1 ml (popř. g, podle povahy vzorku) vyšetřovaného výrobku, přičemž 1 kolonie může být tvořena i desítkami buněk. V našem případě budeme používat ml, protože jde o mléko.

Stanovení CPM má význam jako základní informace o stupni mikrobiální kontaminace a rekontaminace surovin, hotových výrobků a prostředí provozoven. Z jeho výsledků můžeme usuzovat dodržování technologických postupů a hygienických směrnic při výrobě, přepravě a uskladnění výrobků a surovin. Nelze však použít pro kontrolu potravin, při jejichž výrobě byly použity kulturní mikroorganismy.

Ke stanovení CPM se v praxi využívají 2 metody: plotnová metoda (při použití pevných půd) a stanovení v tekuté půdě (MPN, která určuje nejvyšší pravděpodobný počet).

### **Plotnová metoda - technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C (ČSN ISO 4833).**

Pro stanovení počtu CPM na pevných půdách se používají dvě kultivační techniky: metoda zalití (očkování zaléváním do pevných agarových půd) a metoda roztěru (očkování roztěrem na povrch pevné půdy) (Obrázek č. 5).

Metoda zalití:

- Nejprve odebereme zkušební vzorek mléka (100), ze kterého připravíme desetinásobná ředění ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ ) - připravíme si 4 zkumavky naplněné 9 ml fyziologického roztoku, do první zkumavky přidáme 1 ml ze vzorku mléka (100), tím získáme roztok naředěný jako  $10^{-1}$  (obrázek č. 6), takto postupujeme dále až na již zmiňovaných  $10^{-4}$ , zkumavku vždy při otevření a před uzavřením opálíme pod kahanem (obrázek č. 7) a před dalším ředěním promícháme na vortexu po dobu několika sekund, pro přípravu každého ředění použijeme jinou sterilní špičku.
- Z jednotlivých ředění roztoku odebereme vždy 1 ml a ten vyočkujeme na označené Petriho misky.
- Inokulum v každé Petriho misce přelijeme asi 15 ml GTK agaru (agar s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem) vytemperového na 45,2 °C (Obrázek č. 10). Důkladně krouživým pohybem promícháme a necháme utuhnout.
- Po ztuhnutí agarové půdy Petriho misky obrátíme dnem vzhůru a inkubujeme aerobně v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

Brno 2017

Metoda výpočtu:

- Po ukončení inkubace spočítáme kolonie všech tvarů, barev a velikostí narostlé na Petriho miskách (Obrázek č. 2). Použijeme misky obsahující 10 - 300 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních.
- Počet organismů (N) přítomných ve vzorku se vypočítá jako vážený průměr ze dvou po sobě jdoucích ředění podle následující rovnice:

$$N = \Sigma C / V (n_1 + n_2) d$$

- $\Sigma C$  součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředění, přičemž nejméně jedna z ploten obsahuje alespoň 10 kolonií
- V - objem inokula v ml očkovaného na každou z ploten
- n<sub>1</sub> - počet ploten vybraných k výpočtu z prvního měření
- n<sub>2</sub> - počet ploten vybraných k výpočtu z druhého měření
- d - faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění (např. 10<sup>-2</sup>)
  
- Výsledek se zaokrouhlí na dvě platné číslice tak, aby hodnota KJT (kolonie tvořících jednotek) v ml byla vyjádřena jako číslo 1,0 - 9,9 . 10<sup>x</sup>, např. 6,2.10<sup>3</sup> KJT/ml
  
- např.: Dvě po sobě jdoucí ředění (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>), v každém jedna počítatelná miska  
$$N = (68+7) / (1 (1+0,1) \cdot 10^{-2}) = 75 / (1,1 \cdot 10^{-2})$$
$$= 6818 = 6800 = 6,8 \cdot 10^3 \text{ KJT/ml}$$
  
- Dále mohou nastat situace, kdy je na Petriho miskách méně než 10 kolonií, když nejsou žádné přítomny nebo když je jich nad 300, poté stanovujeme odhad počtu N<sub>E</sub>.

### 3.2 Stanovení *S. aureus*

Pro stanovení *S. aureus* se používají živná média obsahující selektivní složky, které snižují růst doprovodných mikroorganismů (azid sodný, teluricitan draselný, chlorid lithný i některá antibiotika – polymyxin, neomycin). Diagnostickou složkou je však vaječný žloutek, fibrinogen nebo králičí plazma. Pro stanovení počtu se běžně používají plotnové metody. U vzorků s očekávaným nízkým počtem *S. aureus* lze využít metodu MPN. U stanovení stafylokokových enterotoxinů lze využívat nejčastěji imunologické metody.

#### Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera (ČSN EN ISO 6888-1)

Tato metoda, která byla použita při analýzách našich vzorků mléka, slouží ke zjištění počtu koagulázo pozitivních stafylokoků, které zahrnují i enterotoxigenní kmeny. Tento typ se týká hlavně druhu

Brno 2017

*Staphylococcus aureus*. Nejdříve jsme si připravily desetinasobné ředění vzorku. Díky předem předpřipraveným zkumavkám naplněných 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Do první zkumavky jsme přidaly 1 ml syrového mléka a vytvořily tím ředění  $10^{-1}$ . Směs byla promíchána ve vortexu. Pokračujeme dále až vytvoříme postupně ředění  $10^{-4}$ . Takto připravené vzorky byly roztírány na agarovou živnou půdu v Petriho miskách. Právě zde je používán Baird-Parker agar s vaječnou emulzí a teluricitanem draselným. Na agar bylo aplikováno 0,2 ml vzorku ze zkumavky (Obrázek č. 8). Potom se vzorek rovnoměrně rozetřel po agaru (Obrázek č. 9). Misky zaschly při laboratorní teplotě a byly otočeny dnem vzhůru.

Takto inokulované plotny se inkubovaly aerobně při teplotě 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Po uplynutí této doby byl zaznamenán počet typických a atypických kolonií (Obrázek č. 3). Pro hodnocení byly použity misky obsahující méně než 300 kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředění. Alespoň jedna miska musela obsahovat 15 kolonií. Kolonie po 24 hodinách mají charakteristickou morfologii. Setkáváme se s typickou kolonií – kolonie černé nebo černošedé barvy, která je lesklá a vypouklá, o průměru asi 1–1,5 mm, kolem kolonie se vytváří projasněný prstenec; nebo s atypickou kolonií – černé, lesklé, s úzkým bílým okrajem nebo bez, bez projasněného prstence nebo jenom s mírným naznačením nebo šedé kolonie bez projasnění. Po spočtení byly vybrány kolonie pro confirmaci.

Confirmace byla provedena koagulázovým testem – metodou latexové aglutinace na sklíčku. Princip stanovení spočívá ve využití latexových částic senzibilizovaných fibrinogenem a imunoglobulinem G, které specificky reagují se shlukovacím faktorem a proteinem A obsažených v bakteriálních buňkách *S. aureus* a způsobují aglutinaci. Nejprve se na testovací kartičku aplikovala kapka (asi 50  $\mu$ l) senzibilizovaného latexu, bakteriologickou kličkou se nabrala testovaná kolonie a přidala se do kroužku testovací kartičky. Obsah kroužku se promíchal přiloženou tyčinkou, aby vznikla homogenní suspenze. Pak se kartičkou kývalo vpřed a vzad přibližně 20 sekund a pozorovaly jsme, zda se objeví aglutinace. Pokud se aglutinace objevila do 20 sekund, kolonie byla označena jako *S. aureus*.

Následovala confirmace suspektních kmenů *S. aureus* metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) detekcí specifického úseku SA4427 (Martineau et al., 1998). Produkty PCR byly analyzovány gelovou elektroforézou v 2% agaróze (Serva, Německo) s následnou vizualizací na transiluminátoru po obarvení ethidium bromidem.

## 4 Výsledky

Celkově jsme za období našeho zkoumání mléka odebraly 51 vzorků ze tří mlékomatů v Brně. Toto období zahrnovalo měsíce od května do prosince, kdy v každém měsíci jsme odebraly 6 nebo 7 vzorků.

Podrobné výsledky sledovaných ukazatelů jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

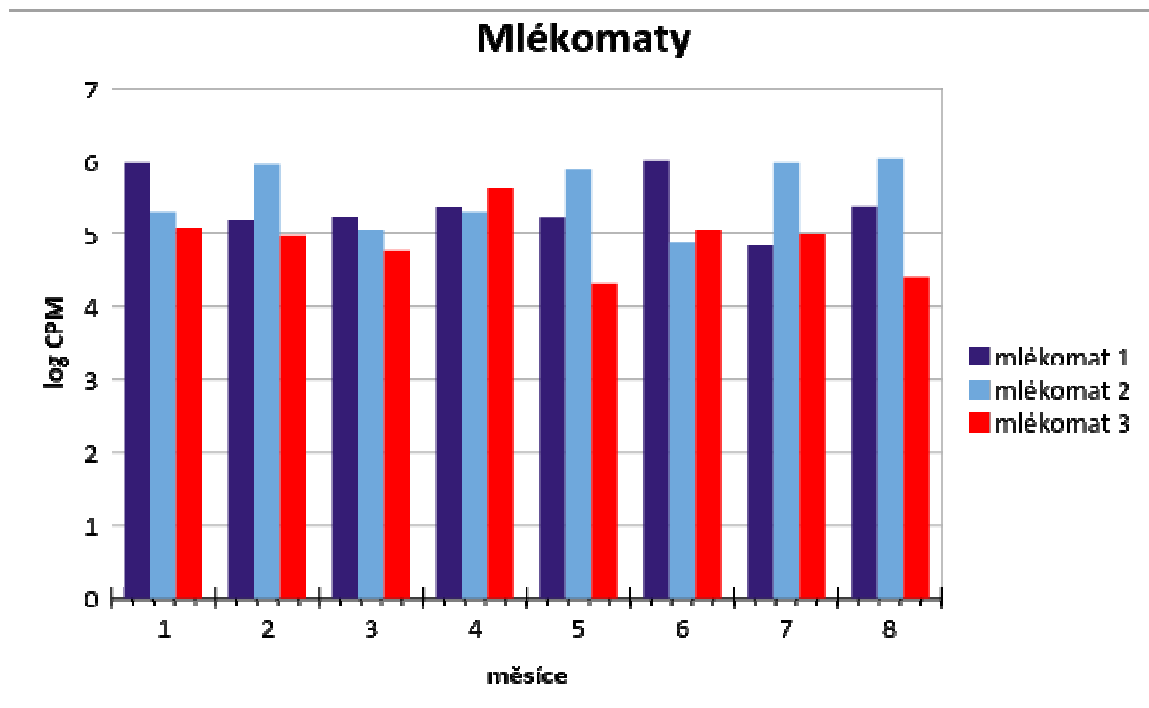
U mlékomatu č. 1 (Nový Lískovec) byly nejvyšší průměrné hodnoty CPM za měsíc zaznamenány v říjnu, u mlékomatu č. 2 (Vinohrady) v prosinci a u mlékomatu č. 3 (Purkyňova) v srpnu. Během celého sledovaného období (8 měsíců) byly limitní hodnoty počtů CPM požadované legislativou (300 000 KTJ.ml<sup>-1</sup>) překročeny u mlékomatu č. 1 dvakrát, u mlékomatu č. 2 čtyřikrát a u mlékomatu č. 3 jedenkrát (Tabulka č. 1). Celkové počty mikroorganismů u jednotlivých mlékomatů také ukazuje Graf č. 1.

Vyšší počty CPM jsou s výjimkou měsíce srpna dosaženy vždy u farmy A, farma B měla vždy nižší počty CPM (Graf č. 2). V letních měsících nebyly počty mikroorganismů v porovnání s chladnějšími obdobími roku 2016 zvýšeny.

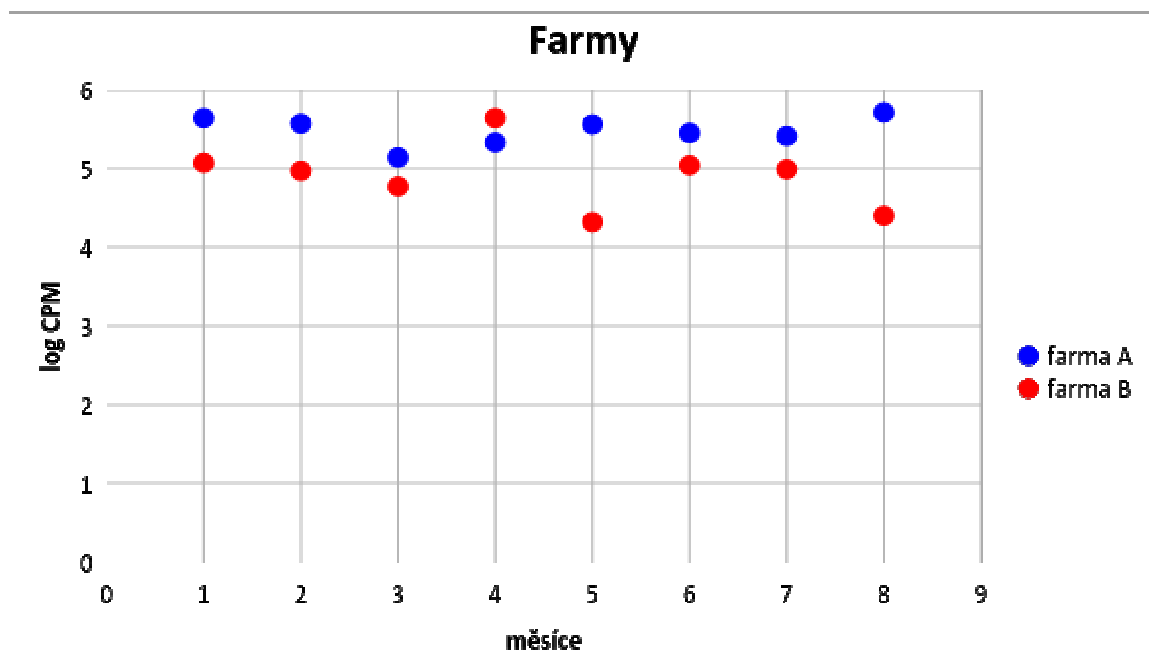
Počty *S. aureus* překročily ve sledovaném období legislativní limit 5.10<sup>2</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup> u 3 vzorků a to v měsíci říjnu a listopadu. V měsíci říjnu byly počty ve dvou případech 7,0.10<sup>2</sup> a 1,1.10<sup>4</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>, v listopadu byl u jednoho vzorku počet 4,5.10<sup>3</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>. Všechny tři vzorky pocházely z farmy B a byly odebrány v prodejním automatu Purkyňova (mlékomat č. 3). Celkem bylo ze všech vyšetřovaných vzorků syrového mléka získáno 8 izolátů *S. aureus*.

	květen	červen	červene c	srpen	září	říjen	listopad	prosine c
farma A	<b>5,64</b>	<b>5,57</b>	5,14	5,33	<b>5,56</b>	5,45	5,41	<b>5,71</b>
farma B	5,07	4,97	4,77	<b>5,64</b>	4,32	5,04	4,99	4,40
mlékomat 1	<b>5,97</b>	5,19	5,24	5,36	5,23	<b>6,02</b>	4,84	5,37
mlékomat 2	5,30	<b>5,95</b>	5,04	5,30	<b>5,88</b>	4,88	<b>5,97</b>	<b>6,04</b>
mlékomat 3	5,07	4,97	4,77	<b>5,64</b>	4,32	5,04	4,99	4,40

Tabulka č. 1 Celkové počty mikroorganismů za jednotlivé měsíce (log KTJ.ml<sup>-1</sup>); tučně vyznačené hodnoty překračují legislativou požadovanou hodnotu 300 000 KTJ.ml<sup>-1</sup>



Graf č. 1 Celkové počty mikroorganismů (průměr za měsíc) u jednotlivých mlékomatů (log KTJ.ml<sup>-1</sup>); 1 = květen, 2 = červen, 3 = červenec, 4 = srpen, 5 = září, 6 = říjen, 7 = listopad, 8 = prosinec



Graf č.2 Celkové počty mikroorganismů za jednotlivé měsíce u vzorků z farmy A a B (log KTJ.ml<sup>-1</sup>)

## 5 Diskuze

Mikrobiologická kvalita syrového mléka je jedním ze základních jakostních kritérií mléka. Mikrobiální kontaminaci mléka zvyšuje především nehygienický způsob získávání mléka. Hlavními zdroji kontaminace jsou znečištěný povrch mléčné žlázy, ruce a oblečení dojičů, prostředí stáje nebo dojírny, dojící zařízení, voda a také další manipulace s mlékem. Hlavním důsledkem zvýšeného počtu mikroorganismů v syrovém mléce je snížení jeho kvality s možným negativním vlivem na další zpracování mléka (Bogdanovičová et al., 2015).

Vývoj CPM u syrového mléka v letech 1994 – 2015 ukazují Grafy č. 3 a č. 4. Nejvyšší nárůst počtu nově spuštěných prodejní mléčných automatů byl zaznamenán v roce 2010 (Graf č. 5). Trvalý nárůst počtu evidovaných prodejců ze dvora ukazuje Graf č. 6 (Hlaváček, 2015).

Od března 2010 do ledna 2011 probíhala v ČR mimořádná kontrolní akce zaměřená na zmapování stupně kontaminace syrového mléka vybranými patogeny a indikátory. Bylo odebráno 711 vzorků syrového mléka prodávaného spotřebitelům. U 6 vzorků byl prokázán *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* u 31 vzorků, *Staphylococcus aureus* u 486 vzorků, z toho byl u 21 vzorků počet *S. aureus* větší než 500 KTJ/ml. Celkový počet mikroorganismů byl vyšší než 300 000 KTJ/ml u 129 vzorků (Hlaváček, 2011).

Studii zaměřenou na mikrobiologickou kvalitu syrového mléka prodávaného prostřednictvím mléčných automatů na území Jihomoravského kraje v letech 2013 – 2014 prováděli Bogdanovičová et al. (2015). Celkem bylo odebráno 45 vzorků mléka z 9 mléčných automatů pocházejících z 6 farem. Celkový počet mikroorganismů byl stanoven v rozmezí hodnot  $8,1 \cdot 10^3$  –  $2,4 \cdot 10^5$  KTJ/ml. Výsledky naší studie zaznamenaly hodnoty CPM v rozmezí  $7,7 \cdot 10^3$  –  $2,5 \cdot 10^7$  KTJ/ml. Bogdanovičová et al. (2015) stanovili počty koagulázapozitivních stafylokoků v rozmezí  $1,0 \cdot 10^1$  –  $4,5 \cdot 10^2$  KTJ/ml. Patogenní bakterie *S. aureus* byla zaznamenána u 66,7 % vzorků. U žádného z testovaných vzorků nebyl překročen legislativní limit  $5 \cdot 10^2$  KTJ/ml. V naší studii byly počty *S. aureus* překročeny ve třech případech.

Výsledky studie zaměřené na kvalitu mléka z jesenických mléčných automatů, prováděné autory Vyleťelová et al. (2011) zaznamenaly CPM v rozmezí od 3 do 60 tisíc KTJ/ml.

Naše výsledky CPM dále potvrdily, že v letních měsících nebyly počty mikroorganismů v porovnání s chladnějšími obdobími roku 2016 zvýšeny. Ke stejnému závěru dospěly i výsledky studie Bogdanovičová a kol. (2015). Z toho lze usuzovat, že režim chlazení mléka po nadojení a v automatech byl vyhovující v průběhu celého roku.

Zvýšené počty *S. aureus* v měsících září, říjen a listopad pravděpodobně korespondují s nástupem chladnějšího počasí a zhoršeným zdravotním stavem dojníc včetně možného výskytu subklinických i klinických mastitid.



## 6 Závěr

Cílem práce bylo sledování mikrobiologické kvality mléka ze tří prodejních mléčných automatů na území města Brna v období květen – prosinec 2016. Celkem bylo odebráno 51 vzorků. Analýzy byly zaměřeny na ukazatele mikrobiologické kvality a bezpečnosti potravin, které mají být u syrového mléka určeného k přímému prodeji sledovány dle požadavků legislativy. Bylo prováděno stanovení celkového počtu mikroorganismů (požadavek Nařízení ES č. 853/2004) a stanovení počtu *Staphylococcus aureus* (požadavek Vyhlášky č. 289/2007 Sb.). Zvýšené hodnoty celkového počtu mikroorganismů v syrovém mléce poukazují na nedodržení zásad hygieny při získávání mléka nebo na nedodržení chladicího řetězce v průběhu skladování syrového mléka. *S. aureus* je významným patogenem mléčné žlázy dojníc a mléko je považováno za rizikovou potravinu z hlediska jeho výskytu. *S. aureus* v případě vyšších počtů v potravinách může vyvolat alimentární onemocnění nazývané jako stafylokoková enterotoxikóza.

Během celého sledovaného období (8 měsíců) byly limitní hodnoty počtů CPM požadované legislativou ( $300\,000\text{ KTJ}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) překročeny u mlékomatu č. 1 dvakrát, u mlékomatu č. 2 čtyřikrát a u mlékomatu č. 3 jedenkrát. Naše výsledky CPM dále potvrdily, že v letních měsících nebyly počty mikroorganismů v porovnání s chladnějšími obdobími roku 2016 zvýšeny. Z toho lze usuzovat, že režim chlazení mléka po nadojení a v automatech byl vyhovující v průběhu celého roku. Počty *S. aureus* překročily ve sledovaném období legislativní limit  $5\cdot 10^2\text{ KTJ}\cdot\text{ml}^{-1}$  u 3 vzorků a to v měsíci říjnu a listopadu.

Výsledky naší studie potvrdily důležitost a nezbytnost tepelného ošetření syrového kravského mléka před jeho konzumací, jak to požaduje evropská legislativa. Bohužel ne všichni spotřebitelé dodrží upozornění, které při nákupu mléka z prodejního automatu obdrží formou psané informace umístěné na mlékomatu, a mléko před konzumací nepřevaří. Nedodržením této zásady tak riskují vznik onemocnění z potravin.

# Literatura

BOGDANOVIČOVÁ, K., ŠTÁSTKOVÁ, Z. VYLETĚLOVÁ-KLIMEŠOVÁ, M., KARPIŠKOVÁ, R. Mikrobiologická kvalita mléka z jihomoravských mléčných automatů. *MLékařské listy*, 2015, roč. 26, č. 151, p. I-III.

Bhunja, A. K. *Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis*. 1<sup>st</sup> ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. 2008. 276 p. ISBN 978-0-387-74536-7

ČSN EN ISO 6888-1 (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. Praha: Český normalizační institut, 1999, 16 s.

ČSN ISO 4833 (2003). Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha: Český normalizační institut, 2003, 16 s.

ČSN ISO 7218 (2008). Mikrobiologie potravin a krmiv - Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení. Praha: Český normalizační institut, 2008, 66 s.

ČSN 56 9609 (2008). Pravidla správné hygienické praxe - mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. Praha: Český normalizační institut, 2008, 40 s.

Fernandes, R. *Microbiology handbook*. Vol. 1: Dairy products. 1<sup>st</sup> ed. Leatherhead, UK: Leatherhead Food International Ltd. 2009. 175 p. ISBN 978-1-905224-62-3

Gelbíčková, T., Karpíšková, R. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food from retail market in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences*, 2009, vol. 27, special issue 2, p. S2-3-S2-7.

Hlaváček, J. Bezpečnost mléka a mléčných výrobků z pohledu dozorového orgánu. Přímý prodej syrového mléka. In *Sborník z odborného semináře Jakost a zdravotní nezávadnost syrového mléka*, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2015.

Hlaváček, J. Výsledky mimořádných kontrolních akcí SVS ČR u mléčných automatů In *Produkce a zdravotní nezávadnost mléka II.*, České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta, 2011, s. 68.

Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Oullette, M., Bergeron, M. G. Species-Specific and Ubiquitous DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998;36:618-623.

Navrátilová, P., Králová, M., Janštová, B., Přidalová, H., Cupalová, Š., Vorlová, L. *Hygiena a produkce mléka*, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2012, vyd. 1., 129 s.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se

**Brno 2017**

stanoví zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu. Úřední věstník Evropské unie, 2004, L 139, s. 14-74.

VOTAVA, M., ČERNOHORSKÁ, L., HEROLDOVÁ, M., HOLÁ, V., MEJZLÍKOVÁ, L., ONDROVČÍK, P., RŮŽIČKA, F., DVOŘÁČKOVÁ, M., WOZNICOVÁ, V., ZAHRADNÍČEK, O. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.

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

Vyhláška č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. Sbírka zákonů 2007; 95; 3970-3986.

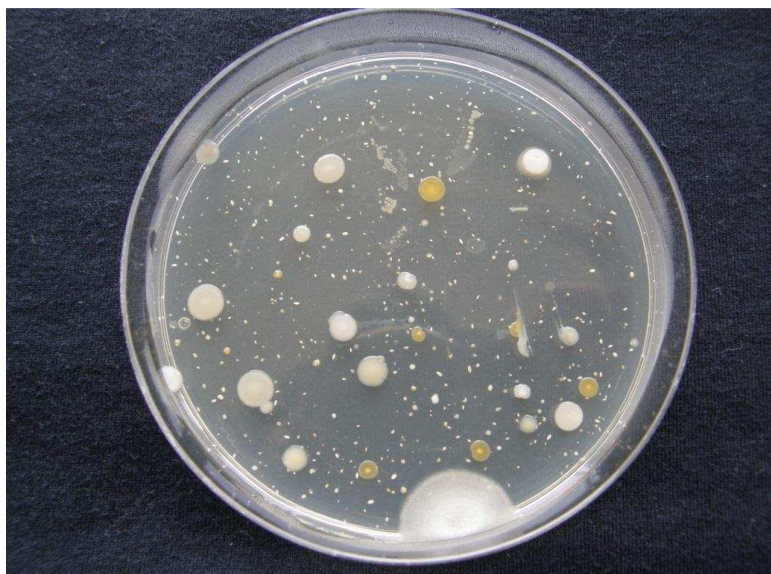
VYLETĚLOVÁ M., ROUBAL, P., KARPÍŠKOVÁ R., VLKOVÁ, H., HANUŠ, O., BUBÍKOVÁ, M. Mikrobiologická kvalita mléka z Jesenických automatů. *Mlékařské listy*, 2011, no. 126, p. 18-21.

Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). Sbírka zákonů 1999; 57; 3122-3150.

# Seznam příloh



Obrázek č. 1 Prodejní automat na syrové kravské mléko s povinnou informací o nutnosti převaření mléka před tepelným opracováním (foto: autoři)



Obrázek č. 2 Kolonie při stanovení celkového počtu mikroorganismů na agaru GTK (foto: autoři)

Brno 2017

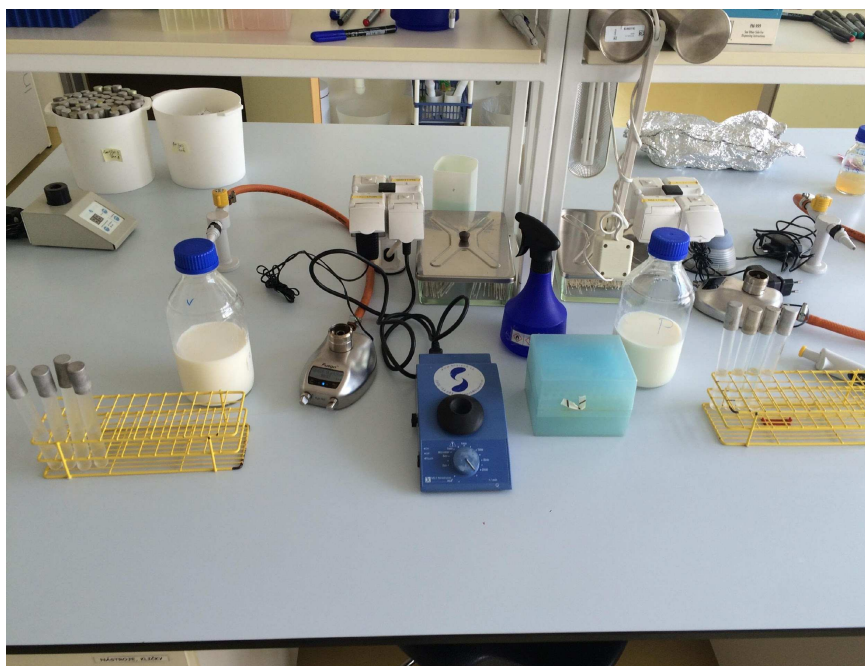


Obrázek č. 3 Kolonie *Staphylococcus aureus* na Baird-Parker agaru (foto: autoři)



Obrázek č. 4 Tepelné opracování syrového mléka je před jeho konzumací nezbytné (foto. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.)

Brno 2017

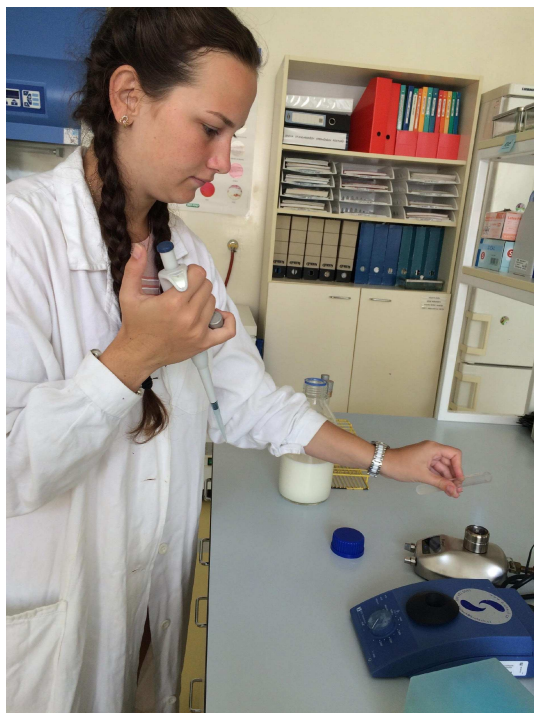


Obrázek č. 5 Připravený pracovní stůl (foto: autoři)



Obrázek č. 6 Ředění mléka (foto: autoři)

Brno 2017

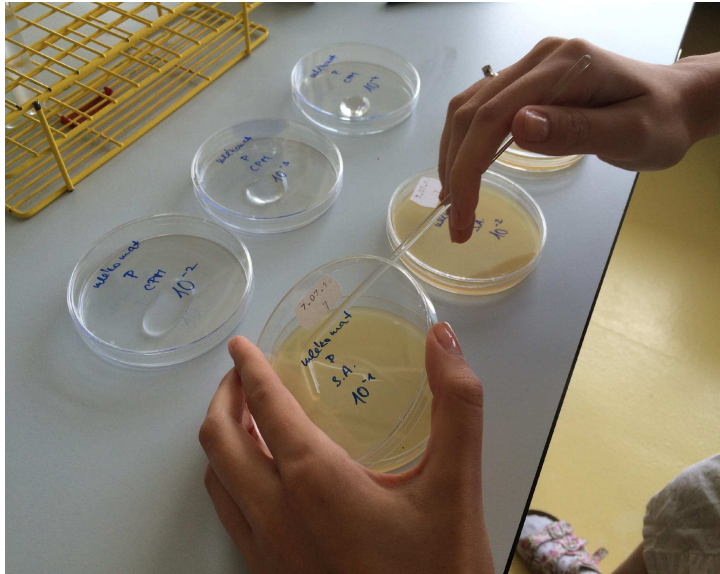


Obrázek č. 7 Opalování zkumavky proti bakteriím (foto: autoři)

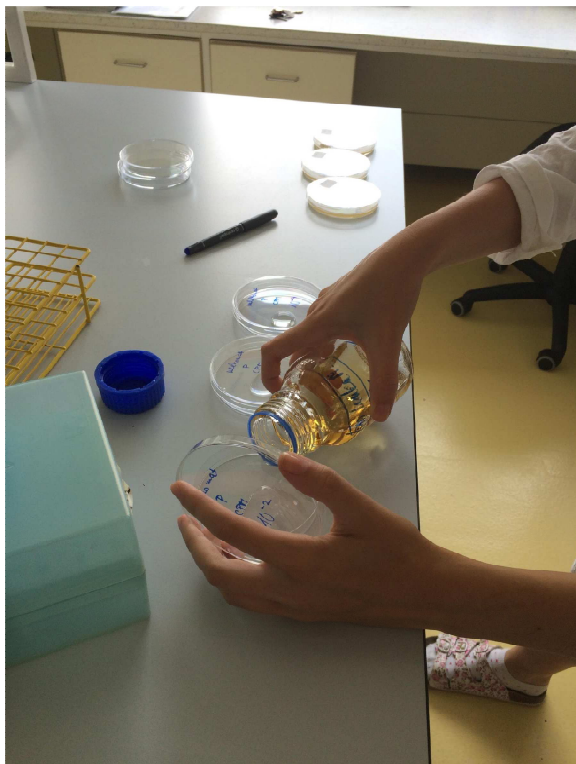


Obrázek č. 8 Aplikace zředěného mléka na agar (foto: autoři)

Brno 2017

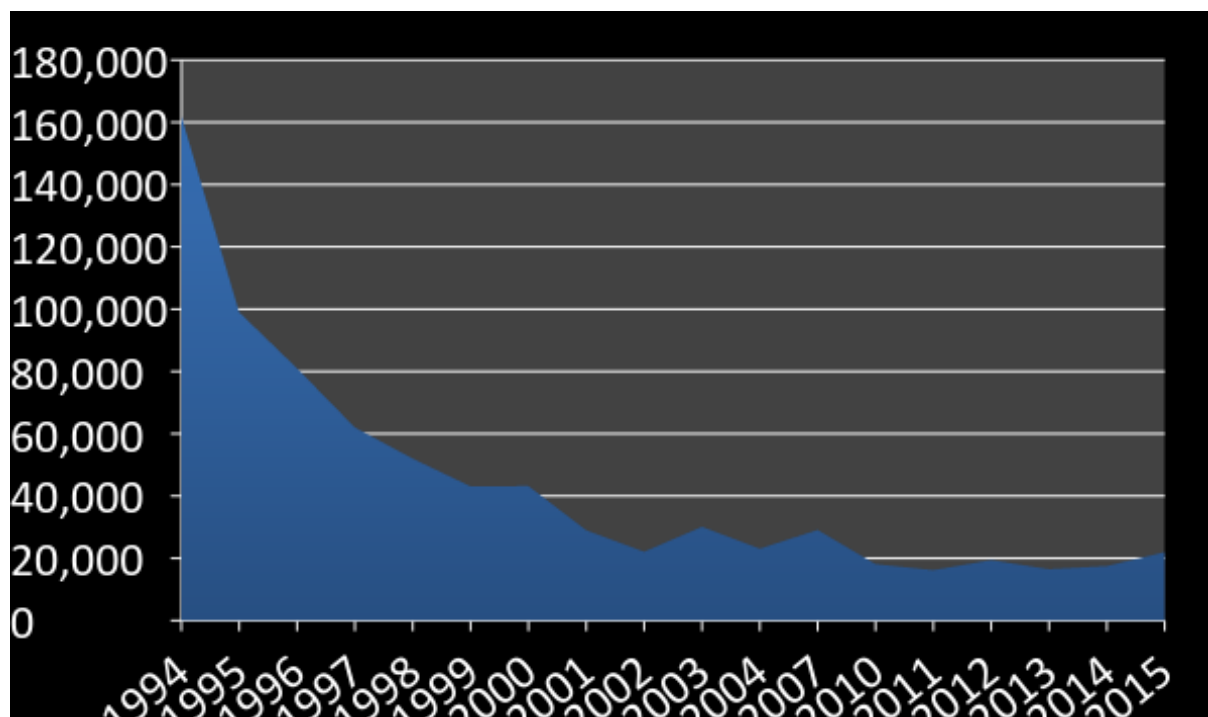


Obrázek č. 9 Roztírání mléka „hokejkou“ (foto: autoři)

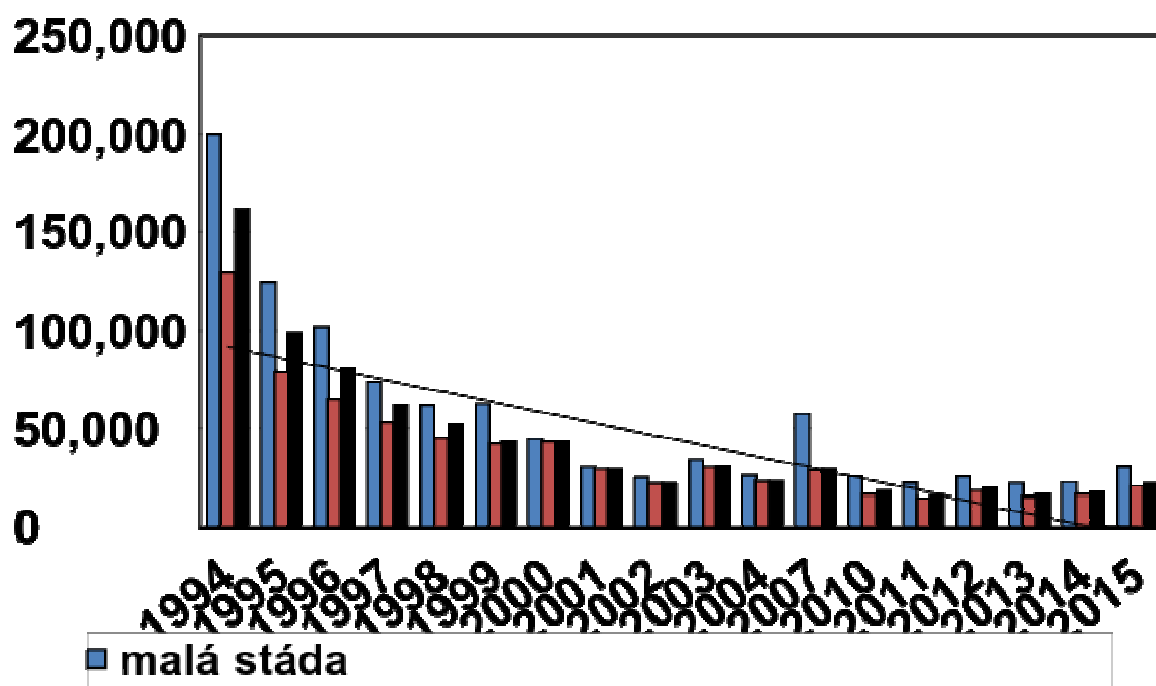


Obrázek č. 10 Zalévání inokula GTK agarem (foto: autoři)



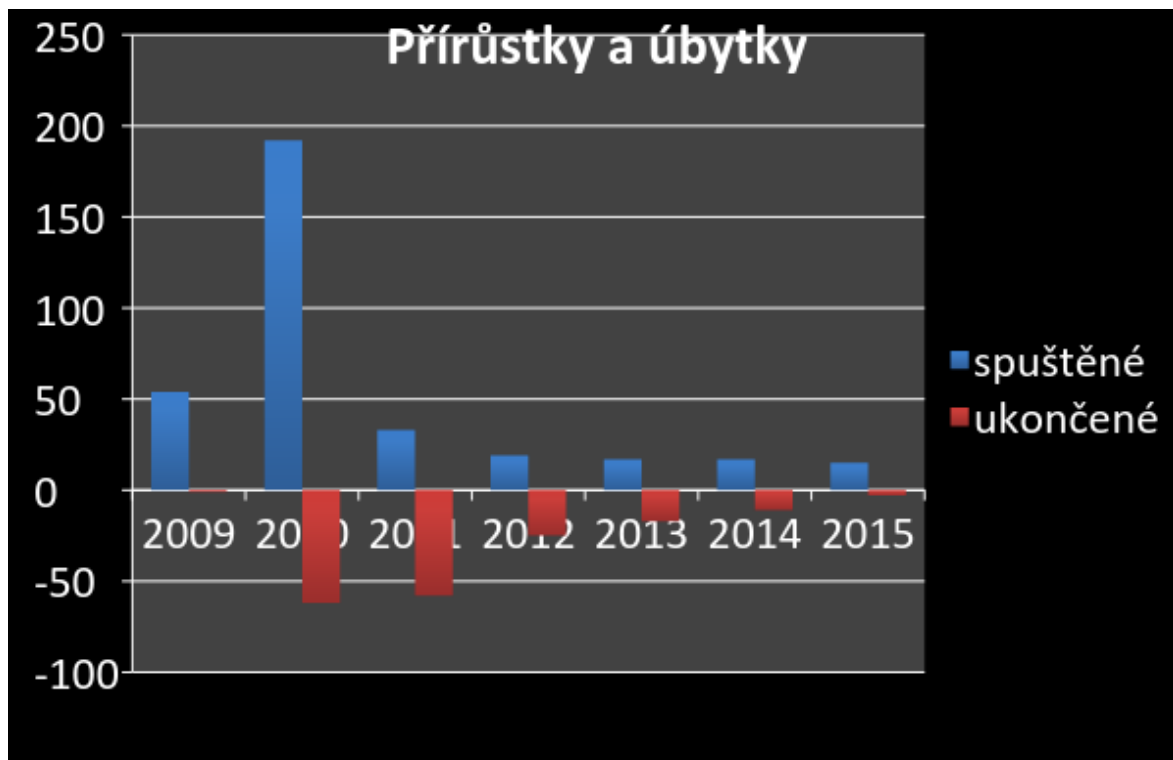


Graf č. 3: Syrové mléko – vývoj celkového počtu mikroorganismů (Hlaváček, 2015)

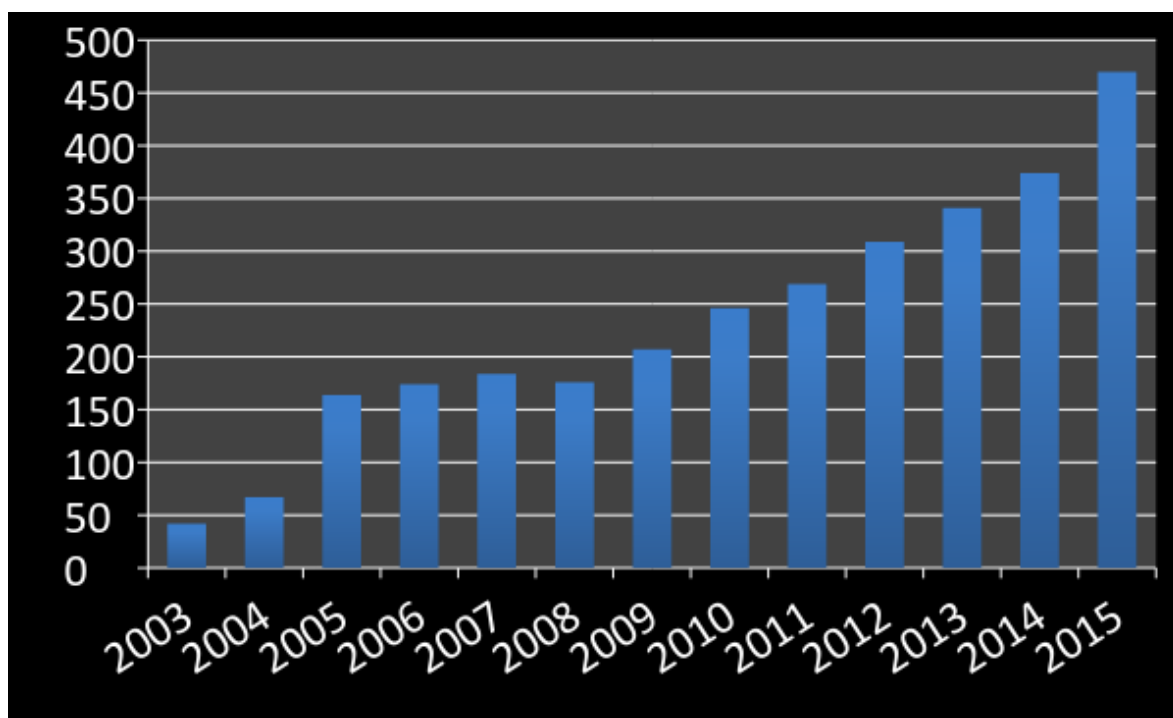


1. Sloupec – malá stáda
2. Sloupec – velká stáda
3. Sloupec – průměr
4. Křivka – trend průměr

Graf č. 4: Syrové mléko – vývoj celkového počtu mikroorganismů s ohledem na velikost stáda (Hlaváček, 2015)



Graf č. 5: Počty automatů v ČR (Hlaváček, 2015)



Graf č. 6: Počty evidovaných prodejců ze dvora (Hlaváček, 2015)

Brno 2017