

# MIKROBIOLOGICKÁ KVALITA MLÉKA Z JIHMORAVSKÝCH MLÉČNÝCH AUTOMATŮ

K. Bogdanovičová<sup>1</sup>, Z. Štástková<sup>1</sup>,  
M. Vyletělová-Klimešová<sup>2</sup>, R. Karpíšková<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>3</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství v.v.i, Brno

## Microbial quality of milk from vending machines in the South Moravian region

### Souhrn

Studie se zabývala mikrobiologickou kvalitou syrového mléka prodávaného prostřednictvím mléčných automatů v letech 2013-2014 na území Jihomoravského kraje. Celkem bylo odebráno 45 vzorků mléka z 9 mléčných automatů pocházejících z 6 farem. Mléko bylo odebíráno do sterilních vzorkovnic a následně analyzováno na přítomnost vybraných skupin a druhů bakterií: celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM), počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, enterokoků, koagulázapozitivních stafylokoků a *Escherichia coli* (*E. coli*). Na základě prováděné studie jsme zaznamenali následující výsledky: CPM bylo zjištěno v rozmezí hodnot  $8,1 \cdot 10^3$  až  $2,4 \cdot 10^5$  KTJ/ml, bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*  $1,0 \cdot 10^1$ - $9,0 \cdot 10^3$  KTJ/ml, enterokoky  $1,3 \cdot 10^1$ - $3,6 \cdot 10^2$  KTJ/ml, *E. coli*  $1,0 \cdot 10^0$ - $5,6 \cdot 10^3$  KTJ/ml koagulázapozitivní stafylokoky  $1,0 \cdot 10^1$ - $4,5 \cdot 10^2$  KTJ/ml. Přítomnost *E. coli* byla zaznamenána u 42 (93,3 %) vzorků a detekovali jsme celkem 47 izolátů *E. coli*. Patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* byla zaznamenána v 30 (66,7 %) případech a bylo detekováno 44 izolátů.

**Klíčová slova:** mléčné automaty, CPM, *Enterobacteriaceae*, enterokoky, koagulázapozitivní stafylokoky, *Escherichia coli*

### Summary

The study focused on the microbiological quality of raw milk sold through milk vending machines in the period of 2013-2014, in the South Moravian region. A total of 45 milk samples collected from 9 milk vending machines coming from 6 farms in South Moravian region were examined. Milk samples were taken into sterile bottles and analyzed for the presence of the following microbial groups: the total number of microorganisms (TNM), *Enterobacteriaceae*, *Enterococci*, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). We have found that the counts of TNM varied from  $8,1 \cdot 10^3$  to  $2,4 \cdot 10^5$  CFU/ml, *Enterobacteriaceae*  $1,0 \cdot 10^1$ - $9,0 \cdot 10^3$  CFU/ml, *Enterococci*  $1,3 \cdot 10^1$ - $3,6 \cdot 10^2$  CFU/ml, *E. coli*  $1,0 \cdot 10^0$ - $5,6 \cdot 10^3$  KTJ/ml coagulase positive staphylococci  $1,0 \cdot 10^1$ - $4,5 \cdot 10^2$  KTJ/ml.

The presence of *Escherichia coli* was observed in 42 (93,3%) samples and also 47 isolates were obtained. The pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* was observed in 30 (66,7%) samples and also 44 isolates were obtained.

**Keywords:** vending machines, TPC, *Enterobacteriaceae*, *enterococci*, coagulase positive staphylococci, *Escherichia coli*

### Úvod

Mléko je potravina s vysokou nutriční hodnotou, obvykle dobře stravitelné a jeho konzumace je odborníky v oblasti výživy podporována. Tradičně je v České republice konzumováno balené pasterované mléko, avšak od roku 2003 byl v České republice povolen přímý prodej syrového mléka ze dvora a od roku 2009 se rozšířil i prodej syrového mléka z mléčných automatů. Tento nový způsob prodeje syrového mléka však přináší i možná zdravotní rizika. Obecně platí, že v mléce zdravých dojníc je uvnitř mléčné žlázy jen minimální bakteriální osídlení. Bakterie však mohou kontaminovat mléko ihned po nadojení. Nejčastějším zdrojem bakteriální kontaminace je v prostředí mléčných farem ovzduší, podestýlka, krmivo, technologické zařízení a pracovníci (Lejeune a Rajala-Schultz, 2009). Dalším možným zdrojem kontaminace je vlastní získávání mléka, jeho skladování a přeprava (Millogo a kol., 2010). Na farmách byla sledována hygienická kvalita syrového mléka (celkový počet mikroorganismů - CPM, počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, enterokoků, koagulázapozitivních stafylokoků a *Escherichia coli*). 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. Hranice pro mikroorganismy rostoucí při 30 °C pro syrové kravské mléko udává Nařízení EP a Rady (ES) č. 853/2004, které stanovuje obsah mikroorganismů při 30 °C  $\leq 100\,000$  v 1 ml (klouzavý geometrický průměr). Od 1. března letošního roku vstoupila v účinnost novelizace Vyhlášky č. 289/2007 Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství, kde byl uveden limit pro výskyt *Staphylococcus aureus* v syrovém mléce, a to v množství  $5 \cdot 10^2$  KTJ/ml. Mikrobiologická kvalita syrového mléka je ovlivňována mnoha faktory, které se vzájemně podmiňují.

Cílem této práce je upozornit na některé z nich a vyhodnotit mikrobiologickou bezpečnost syrového mléka ve sledovaných mlékomatech.

### Materiál a metodika

Odběr vzorků probíhal od dubna 2013 do prosince 2014. Celkem bylo odebráno 45 vzorků mléka z 9 mléčných automatů pocházejících z 6 farem (A-F) v Jihomoravském

kraji. Mléko o objemu 1 litr bylo odebráno do sterilních vzorkovnic a po převozu do laboratoře při teplotě  $4 \pm 1$  °C bylo ihned zpracováno.

U vzorků byl stanoven celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM v KTJ/ml, kde KTJ = kolonie tvořící jednotky), počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (KTJ/ml), počet enterokoků (KTJ/ml), počet koagulázapozitivních stafylokoků a průkaz bakterií *Escherichia coli*.

Hodnoty CPM byly stanoveny podle normy ČSN ISO 4833, pro kultivaci byla použita kultivační půda GTK (HiMedia, IND) a inkubace proběhla při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

Stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* bylo prováděno dle ČSN ISO 21528-1, kultivační půda VČŽG (HiMedia, IND). Konfirmace suspektních izolátů spočívala v negativním průkazu oxidázy (OXItest, Erba-Lachema, ČR) a zkoušce fermentace glukózy.

Počet enterokoků byl stanoven po kultivaci na S-B agar (HiMedia, IND).

Stanovení počtu bakterií *E. coli* bylo prováděno dle metody ČSN ISO 16649-2 tzv. horizontální metodou pro stanovení počtu  $\beta$ -glukuronidázapozitivních *Escherichia coli*, za použití techniky počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukuronidu. Průkaz byl prováděn modifikací metody ČSN ISO 16649-2. Po pomnožení vzorku v pufrované peptonové vodě (Oxoid, VB) při 37 °C po dobu 24 hodin s následnou kultivací na TBX agar (44 °C, 24 h). Konfirmace suspektních izolátů spočívala v negativní reakci na oxidázu (OXItest, Erba-Lachema, ČR) a v pozitivní reakci na tvorbu indolu (COLItest, Erba-Lachema, ČR).

Stanovení počtu koagulázapozitivních stafylokoků bylo prováděno podle ČSN ISO 6888-1, průkaz byl proveden po pomnožení v pufrované peptonové vodě (OXOID, UK). Ke kultivaci bylo použito médium Baird-Parker (OXOID, UK). Identifikace suspektních kolonií byla provedena pomocí biochemického testu volné koagulázy (DENKA SEIKEN Co., LTD., Japan). Konfirmace suspektních kmenů *S. aureus* byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) detekcí specifického úseku SA442 (Martineau a kol., 1998).

## Výsledky a diskuze

Mikrobiologická kvalita syrového mléka je jedním ze základních jakostních kritérií mléka jako suroviny pro zpracovatelský průmysl. Nehygienický systém získávání mléka zvyšuje mikrobiální kontaminaci mléka. Jejimi hlavními zdroji jsou znečištěný povrch mléčné žlázy, ruce a oblečení dojičce, prostředí stáje nebo dojírny, dojící zařízení, voda a také další manipulace s mlékem.

**Tab. 1** Výsledky počtu sledovaných ukazatelů v syrovém kravském mléce z mléčných automatů

| Sledovaný ukazatel           | Hodnoty                     | Farmy               |                     |                     |                     |                     |                     |                      |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
|                              |                             | A                   | B                   | C                   | D                   | E                   | F                   |                      |
| CPM                          | aritmetický průměr v KTJ/ml | 3,8.10 <sup>4</sup> | 6,3.10 <sup>4</sup> | 6,1.10 <sup>4</sup> | 4,0.10 <sup>4</sup> | 5,5.10 <sup>4</sup> | 4,9.10 <sup>4</sup> | 5,10.10 <sup>4</sup> |
| č. <i>Enterobacteriaceae</i> | aritmetický průměr v KTJ/ml | 1,0.10 <sup>2</sup> | 1,1.10 <sup>2</sup> | 1,1.10 <sup>2</sup> | 1,2.10 <sup>2</sup> | 2,1.10 <sup>2</sup> | 8,8.10 <sup>1</sup> | 1,2.10 <sup>2</sup>  |
| Enterokoky                   | aritmetický průměr v KTJ/ml | 6,3.10 <sup>1</sup> | 7,3.10 <sup>1</sup> | 7,3.10 <sup>1</sup> | 6,4.10 <sup>1</sup> | 7,4.10 <sup>1</sup> | 6,6.10 <sup>1</sup> | 6,9.10 <sup>1</sup>  |
| <i>E. coli</i>               | aritmetický průměr v KTJ/ml | 2,0.10 <sup>1</sup> | 2,5.10 <sup>1</sup> | 2,0.10 <sup>1</sup> | 2,3.10 <sup>1</sup> | 2,3.10 <sup>1</sup> | 2,5.10 <sup>1</sup> | 2,3.10 <sup>1</sup>  |
| <i>S. aureus</i>             | aritmetický průměr v KTJ/ml | 1,1.10 <sup>2</sup> | 1,3.10 <sup>2</sup> | 1,1.10 <sup>2</sup> | 1,1.10 <sup>2</sup> | 7,5.10 <sup>1</sup> | 1,1.10 <sup>2</sup> | 1,1.10 <sup>2</sup>  |

CPM - celkový počet mikroorganismů, *E. coli* - *Escherichia coli*, *S. aureus* - *Staphylococcus aureus*, KTJ/ml - kolonie tvořící jednotku/ml

Hlavním důsledkem sekundární kontaminace (zvýšeného počtu CPM, koliformních bakterií, aj.) je snížení kvality syrového mléka s možným negativním vlivem na další zpracování mléka. Podrobné výsledky sledovaných ukazatelů jsou uvedeny v tabulce 1.

Zjištění CPM v syrovém kravském mléce je mikrobiologický parametr, který je stanoven Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení komise (ES) č. 1662/2006 hodnotou do 1,0.10<sup>5</sup> KTJ/ml mléka (klouzavý geometrický průměr). Námi zjištěný celkový počet mikroorganismů se během sledování pohyboval v rozmezí od 8,1.10<sup>3</sup> do 2,4.10<sup>5</sup> KTJ/ml. Limitní hodnoty byly překročeny pouze jednou. Závěry korelují s výsledky autorů Vyletřelová a kol., (2011), kteří sledovali mikrobiologickou kvalitu mléka z jesenických mléčných automatů. V jejich případě se hodnota CPM během sledování pohybovala v rozmezí od 3 do 60 tisíc KTJ/ml. Podrobnější přehled námi detekovaného počtu sledovaných ukazatelů v syrovém kravském mléce z automatů je uveden v Tabulce č. 1.

Nejvyšší nálezy CPM (aritmetický průměr z 5 odebraných vzorků) byly v průměru zaznamenány na farmě B (6,3.10<sup>4</sup> KTJ/ml). V letních měsících nebyly hodnoty CPM v porovnání s chladnějšími obdobími roku zvýšeny.

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* byly zaznamenány v množství od 1,0.10<sup>1</sup> po 9,0.10<sup>3</sup> KTJ/ml. Nejvyšší počty byly opakovaně zaznamenány na farmě E, a to 9,0.10<sup>3</sup> KTJ/ml (aritmetický průměr z 5 odebraných vzorků). Počty bakterií čeledě *Enterobacteriaceae* je považována za indikátor sloužící k ověření hygienických postupů při získávání mléka (Weber a kol., 2009).

Rod *Enterococcus* patří k nejkontroverznější skupině bakterií mléčného kvašení, jejichž významnou vlastností je vyšší termorezistence. Jejich výskyt v mléce je závislý na mnoha faktorech, např. na čistotě zařízení přicházejícího do přímého styku s mlékem, způsobu tepelného ošetření (Görner a Valík, 2004). Námi zjištěné hodnoty v jednotlivých měsících byly vyrovnané a pohybovaly se v rozmezí od 1,5.10<sup>1</sup> do 3,6.10<sup>2</sup> KTJ/ml. Nařízení

Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení komise (ES) č. 1662/2006 nestanovilo pro enterokoky žádný limit. Ukázalo se, že enterokoky mají jako indikátory hygieny při výrobě potravin jen malý význam (Foulquié Moreno a kol., 2006).

V letních měsících nebyly počty sledovaných skupin bakterií zvýšeny, z toho lze usuzovat, že režim chlazení v automatech byl vyhovující v průběhu celého roku.

Přítomnost bakterií *Escherichia coli* byla zaznamenána ve 42 (93,3 %) vzorcích. *E. coli* je běžnou součástí intestinální mikroflóry lidí i teplokrevných zvířat, ale může být i organismem patogenním (Costa a kol. 2009). Kvantitativní vyšetření bakterie *E. coli* prokázalo pouze pět pozitivních případů, kde se počet pohyboval v rozmezí od  $2,0 \cdot 10^1$  do  $5,0 \cdot 10^1$  KTJ/ml. Limitní hodnota tohoto ukazatele není pro syrové mléko zakotvena v žádném evropském nařízení, ale dosud platná norma ČSN 57 0529 stanovuje limitní hodnotu 1 000 KTJ/ml.

Bakterie *Staphylococcus aureus* byly detekovány v 30 (66,7 %) vzorcích. U každého pozitivního vzorku byla provedena izolace dvou kolonií *S. aureus*, a to typické kolonie (kolonie černé nebo černošedé barvy, lesklé a vypouklé, o průměru 1 - 1,5 mm, obklopené zónou projasnění), případně i atypické kolonie (kolonie černé, lesklé, s úzkým bílým okrajem nebo bez něj anebo šedé kolonie bez zóny projasnění). Celkem tak bylo získáno 44 izolátů *S. aureus*. Na žádné z námi testovaných farem nedošlo k záchytu počtu bakterií *S. aureus* nad limitní hodnotu uvedenou ve Vyhlášce č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. Limit pro výskyt *Staphylococcus aureus* v syrovém mléce činí  $5 \cdot 10^2$  KTJ/ml.

## Závěr

Vzorky zkoumané v této studii nepřekročily nařízením stanovené limity a po celou dobu sledování vykazovaly vyrovnané výsledky. I když mléko určené k přímému prodeji je skladováno při 4 °C a musí být prodáno během 48 hodin, což vylučuje možnost intenzivního růstu bakterií, na farmě E byl zjištěn vyšší záchyt bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a enterokoků. Počty celkového množství mikroorganismů byly na této farmě také zvýšeny, avšak nejvyšší počty byly zaznamenány na farmě B, kde došlo i k vyššímu záchytu počtu bakterií druhu *Escherichia coli*. Přestože je spotřebitelům doporučeno mléko před konzumací tepelně ošetřit, mnoho z nich tak nečiní. Spotřebitelé by měli být efektivněji informováni o možných zdravotních rizicích plynoucích z konzumace syrového mléka. Alternativním opatřením je prodej pasteurizovaného mléka v prodejních automatech.

## Poděkování

Tato studie byla finančně podpořena projekty NAZV KUS QJ 1230044, QJ 1210300 a MŠMT LO1218 v programu NPU.

## Literatura

- COSTA D., VINUÉ L., POETA P., COELHO A. C., MATOS M., SÁENZ Y., SOMALO S., ZARAZAGA M., RODRIGUES J., TORRES C. (2009): Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, 138, s. 339-44.
- ČSN EN ISO 4833 - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. ČNI Praha, 2003.
- ČSN EN ISO 21528-1 (560096) - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* - Část 1: Průkaz a stanovení počtu technikou nejvýše pravděpodobného počtu s předpokložením. ČNI Praha, 2006.
- ČSN EN ISO 16649-2 (560079) - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu beta-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* - Část 2: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glukuronidu, ČNI Praha, 2003.
- ČSN EN ISO 6888-1 - 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, 1999.
- ČSN 57 0529 (570529) Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování, 1993
- FOULQUIÉ MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. (2006): The role and application of enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology*, 106, s. 1-24.
- GÖRNER, F., VALÍK, L. (2004): Aplikovaná mikrobiologie požívatin. Malé centrum Bratislava, 528 s.
- LEJEUNE, J. T., RAJALA-SCHULTZ, P. J. (2009): Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat, *Clinical Infectious Diseases*, 48, s. 93-100.
- MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., OULLETTE, M., BERGERON, M. G. (1998): Species-Specific and Ubiquitous DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, s. 618-623.
- MILLOGO, V., SVENNERSTEN SJAUNJA, K., OUÉDRAOGO, G. A., AGENÄS, S. (2010): Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso, *Food Control*, 21, s. 1070-1074.
- NARIŽENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví specifické hygienické předpisy pro potravinu živočišného původu.
- NARIŽENÍ KOMISE (ES) č. 1662/2006 ze dne 6. listopadu 2006, kterým se mění nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potravinu živočišného původu.
- VYHLÁŠKA č. 289/2007 SB., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství, 2007.
- VYHLÁŠKA č. 128/2009 Sb., o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty, 2009.
- VYLETĚLOVÁ, M., ROUBAL, P., KARPÍŠKOVÁ, R., VLKOVÁ, H., HANUŠ, O., BUBÍKOVÁ, M. Mikrobiologická kvalita mléka z jesenických mléčných automatů, *Mlékařské listy*, 126, s. 18-21.
- WEBER, CH., STEPHAN, R., DRUGGAN, P., JOOSTEN, H., IVERSEN, C. (2009): Improving the enrichment procedure for *Enterobacteriaceae* detection, *Food Microbiology*, 26, s. 565-572.

Přijato do tisku 13. 7. 2015

Lektorováno 27. 7. 2015