

- RATHNAYAKE, R. M. C. S., MANGALIKA, U. L. P., ADIKARI, A. M. J. B., NAYANANJALIE, W. A. D. (2016): Changes in Compositional and Keeping Quality Parameters of Cow Milk on Ethanol Stability. *International Journal of Livestock Research*, 6, 4, s. 83-89.
- ROSA, P. P., ÁVILA B. P., ANGELO, I. D. V., SILVA, P. M., CHESINI, R. G., MOTA, G. N., SEDREZ, P. A., FERNANDES, T. A., BUGONI, M., ROLL, V. F. B. (2020): Factors that affect the thermal stability of bovine milk and the use of alcohol test in the milk industry – a review. *Nucleus Animalium*, 12, 2, s. 15-46.
- SAMKOVÁ, E. et al. (CEMPÍRKOVÁ, R., HANUŠ, O., HASONOVÁ, L., HLAVÁČEK, J., JELEN, P., JERÁBKOVÁ, J., KOPÁČEK, J., LUŽOVÁ, T., NAVRÁTILOVÁ, P., SEYDLOVÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., ŠPIČKA, J., VORLOVÁ, L., VYLETĚLOVÁ, M.) (2012): Mléko: produkce a kvalita. Milk: production and quality. Vědecká monografie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. ISBN: 978-80-7394-383-7, s. 240.
- SKÝPALA, M., CHLÁDEK, G. (2008): Složení a technologické vlastnosti mléka získaného z ranního a večerního dojení. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, LVI, 5, s. 187-198.
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., ŘÍHA, J., GENČUROVÁ, V., HULOVÁ, I., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J. (2010 a): Impacts of lactation physiology at higher and average yield on composition, properties and health indicators of milk in Holstein breed. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 1, s. 21-28.
- SOJKOVÁ, K., HANUŠ, O., ŘÍHA, J., YONG, T., HULOVÁ, I., VYLETĚLOVÁ, M., JEDELSKÁ, R., KOPECKÝ, J. (2010 b): A comparison of lactation physiology effects at high and lower yield on components, properties and health state indicators of milk in Czech Fleckvieh. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 41, 2, s. 84-91.
- VARVAŽOVSKÝ, V., KUKAČKA, F., MÁCHA, F., KROULÍK, J. et al. (1985): Sledování příčin výskytu nestandardního mléka v kyselosti pod 6,2 ml a s omezenými prokysávacími schopnostmi v návaznosti na úroveň výživy. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚS), Praha, Závěrečná zpráva 1984 – 1985, s. 21.

**Korespondující autor:** Dr. Ing. Oto Hanuš,  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, e-mail: hanus.oto@seznam.cz

Přijato to tisku: 26. 2. 2021  
Lektorováno: 23. 3. 2021

## POROVNÁNÍ VYBRANÝCH ZMRAZOVACÍCH TECHNIK PRO DLOUHODOBÉ UCHOVÁVÁNÍ KMENŮ *PENICILLIUM* *ROQUEFORTI*

Ladislav Bár, Zuzana Dlouhá  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Tábor

### THE COMPARISON OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUES FOR LONG-TERM STORAGE OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI* STRAINS

#### Abstrakt

Tato práce se zabývá využitím zmrazovacích technik (-70 °C) pro dlouhodobou deponaci kmenů *Penicillium roqueforti*. Bylo vybráno 5 modelových kmenů ze

Sbírký mlékárenských mikroorganismů-Laktoflora®, které byly zmrazeny třemi různými způsoby. Jednalo se o zmrazení na perlitu, v živném médiu s glycerolem a v podobě alginátových pelet. V předem daných intervalech byla hodnocena životaschopnost kmenů a jejich morfologické vlastnosti. Po 18měsíčním sledování se v případě použití živného média s přidavkem glycerolu počet životaschopných spor pro jednotlivé kmeny snížil přibližně o půl až o jeden a půl řádu, ale stále se pohyboval na vyhovující úrovni kolem 10<sup>6</sup> až 10<sup>7</sup> KJTJ/ml suspenze. Možnost použití perlitu a alginátových pelet se rovněž jeví jako vyhovující pro dlouhodobou deponaci kmenů *Penicillium roqueforti*.

**Klíčová slova:** kryoprezervace (-70 °C), *Penicillium roqueforti*, alginátové pelety, glycerol, perlit, sbírka CCDM

#### Abstract

We compared three methods of cryopreservation (-70 °C) for long-term storage of *Penicillium roqueforti* strains. Five model strains were selected from the Collection of Dairy Microorganisms-Laktoflora®. Strains were treated using glycerol enriched nutrient medium, soaked in perlite, and embedded in alginate prills. The viability of the strains and their morphological properties were evaluated at predetermined intervals. After 18 months period the number of viable spores for each strain decreased by one-half to one-and-a-half orders of magnitude in glycerol enriched nutrient media. However, the numbers of viable spores for the monitored strains were still at a satisfactory level of around 10<sup>6</sup> to 10<sup>7</sup> CFU/ml of suspension. Perlite and alginate prills also have the potential for long-term preservation of *Penicillium roqueforti* spores.

**Key words:** cryopreservation (-70 °C), *Penicillium roqueforti*, alginate prills, glycerol, perlite, CCDM collection

#### Úvod

Získání čistých kmenů pro potřeby sbírky mikroorganismů je složitý proces zahrnující izolaci kmenů, případné přečišťování a identifikaci. Je důležité zvolit takový způsob jejich skladování, který, kromě čistoty kultury, zachová v nejvyšší možné míře i jejich životaschopnost a morfologické a genetické vlastnosti. To vše v závislosti na typu mikroorganismu a možnostech laboratoře. Způsobů, jak houbové mikroorganismy uchovávat je celá řada. Mikroorganismy lze uchovávat krátkodobě ve zkumavkách se šikmým živným agarem. Při skladování houbových mikroorganismů tímto způsobem je nutno kmeny jedenkrát ročně přeočkovávat, což je poměrně časově náročné a zároveň se tím zvyšuje riziko kontaminace. Metody dlouhodobého uchovávání tyto nevýhody eliminují. Nakasone a kol. (2004) popisuje celou řadu metod dlouhodobé konzervace, od jednoduchých a lev-

ných, jako je přelití minerálním olejem, uchovávání ve sterilní destilované vodě, na různých organických substrátech a nosičích (dřevo, obilná zrna, půda, písek, silica gel) přes kryoprezervaci až po lyofilizaci. Lyofilizace ale není vhodná pro všechny typy houbových mikroorganismů. Kryoprezervace zahrnuje metody uchovávání mikroorganismů při velmi nízkých teplotách, buď v tekutém dusíku při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (pro řadu pracovišť finančně nedostupný), nebo v hlubokomrazícím boxu při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aby se zabránilo poškození buněk mrazem, přidávají se kryoprotektivní látky (nejčastěji glycerol, dimethylsulfoxid) a důležitou roli hraje také způsob samotného zmrazení (pomalé kontrolované x rychlé). Hlubokomrazené kultury lze skladovat v závislosti na druhu mikroorganismu a použitém způsobu kryoprezervace řadu let. Kultury není vhodné opakovaně zmrazovat, mohlo by dojít k významnému snížení jejich životaschopnosti.

Na pracovišti Sbírký mlékárenských mikroorganismů *Laktoflora*<sup>®</sup> (dále jen sbírka CCDM) je v současné době (kromě jiných kultur) deponováno 37 kmenů *Penicillium roqueforti* (*Eurotiales*, *Eurotiomycetes*, *Ascomycota*). Tato houba se nejvíce využívá v mlékárenském průmyslu jako kultura pro výrobu sýra s modrou plísní v těstě. Zodpovídá zde za jeho specifickou chuť a vůni. Jedná se ale také o široce rozšířený a běžný kontaminant v potravinářství. Optimalizace metod dlouhodobého skladování zvláště startérových kultur má velký praktický význam. Tato práce se zaměřuje na testování životaschopnosti pěti vybraných kmenů *Penicillium roqueforti* zmrazených při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  s využitím tří typů kryoprotektivního média nebo nosiče: v živném bujonu s glycerolem, uložení v perlitu a ve formě alginátových pelet.

## Materiál a metody

### Příprava kultur:

Bylo vybráno 5 modelových kmenů *Penicillium roqueforti* ze Sbírký CCDM (CCDM 294, 296, 287A, 341, 600A). Napěstování fungální biomasy probíhalo v Erlenmeyerově baňce s celulóзовým uzávěrem na půdě MEA (Malt extract agar- příprava dle Samson a kol., 2010) při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 dní. Následně byl proveden splach pomocí fyziologického roztoku s přísadkou Tween 80 (0,05 %, Lach-Ner s.r.o., ČR). Pro vyloučení bakteriální kontaminace byla vzniklá suspenze otestována na médiu GTK-M (Plate count skim milk agar, Sigma-Aldrich; připravováno bylo dle návodu výrobce) s přísadkou pimaricinu (1 ml/100 ml média, roztoku o koncentraci 0,9 g/l) (kultivace 3 dny při  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

100  $\mu\text{l}$  suspenze spor bylo po desítkovém ředění fyziologickým roztokem (0', 4', 5', 5', 6') naočkováno roztěrem na Petriho misky s MEA. Tyto misky byly použity pro získání výchozího počtu kolonií a dále také jako kontrola případné kontaminace jinými houbovými mikroorganismy, které by se na misce projevíly jiným vzhledem kolonií (Samson a kol., 2010).

### Použité metody zmrazení

#### Živný bujon s glycerolem

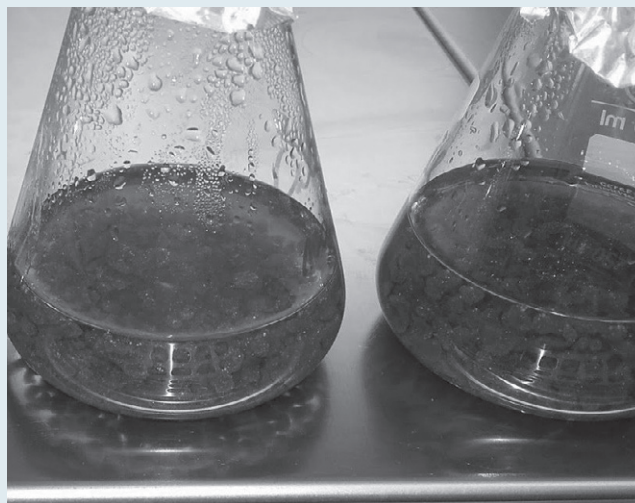
Do kryozkumavky s obsahem 1,3 ml kryoprotektivního média (80 % malt bujonu (Merck) a 20 % neředěného glycerolu, sterilizace  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 15 minut) bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  výchozí suspenze spor a během hodiny několikrát řádně protřepáno. Poté následoval proces postupného zmrazení: 20 minut ve  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 minut při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a teprve pak byly zkumavky přemístěny do hlubokomrazícího boxu ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Pro každý kmen bylo připraveno 15 zkumavek.

#### Perlit

Do kryozkumavek s 200 mg perlitu byl přidán 1 ml živného média s 5 % glycerolu (sterilizace  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 min) a následně byla k obsahu přidána výchozí suspenze spor (200  $\mu\text{l}$ ). Po protřepání byly kultury kultivovány 14 dní při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následně byly tyto zkumavky zmrazeny stejným způsobem jako v případě bujonu s glycerolem. Pro každý kmen bylo připraveno 15 zkumavek. Byla použita metoda vycházející z Gupta a kol. (2013).

#### Alginátové pelety

Pro výrobu pelet byl zvolen modifikovaný postup uvedený v Landa a kol. (2001). 500 ml sterilního 2% roztoku alginátu sodného (REMI M.B. s.r.o., ČR) bylo smícháno s 50 g přesátých a předem sterilizovaných pšeničných otrub (sterilizace  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1,5 h). Druhý den byla tato směs (10 ml) smíchána se suspenzí spor (7 ml) a následně pomalu kapána do koagulační lázně roztoku  $\text{CaCl}_2$  (2%), (obr. 1). Po hodinovém vytvrzení byly vzniklé granule v očkovacím boxu scezeny přes sterilní sítko a vysypány na Petriho misku, kde se do druhého dne nechaly vedle sebe otevřené vyschnout. Možnou kontaminaci jsme zjišťovali pomocí negativní kontroly: otevřené Petriho misky (2 ks) s MEA umístěné mezi misky s peletami a jejich následná kultivace při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 dní. Poté mohly být pelety přesypány do epruvety po cca 100 kusech a umístěny do mrazícího boxu ( $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



Obr. 1 Čerstvě připravené alginátové pelety ve vytvrzovacím roztoku  $\text{CaCl}_2$

### Rozmrazení a kontrola životaschopnosti

U jednotlivých kmenů probíhala v časových intervalech (1 týden, 1 měsíc, 3, 6, 9, 12, 15 a 18 měsíců) kontrola životaschopnosti.

V případě média s glycerolem a perlitem byla použita vždy 1 kryozkumavka. Rozmrazení kryozkumavek probíhalo samovolně při pokojové teplotě, v případě alginátových pelet byly odebrány 3 pelety přímo ze skladovací epruvety a umístěny na povrch živné půdy (tzn. bez rozmrazování). Z kryozkumavek s glycerolem byla rozmrazená suspenze naředěna fyziologickým roztokem s Tween 80 (0,05 %, Lach-Ner s.r.o., ČR) a naočkována roztěrem na Petriho misky s MEA (4', 5', 5', 6'). Po kultivaci byly spočítány kolonie a vyhodnoceno přežití a životaschopnost jednotlivých kmenů. Byly také pozorovány morfologické vlastnosti kolonií, zejména jejich barva.

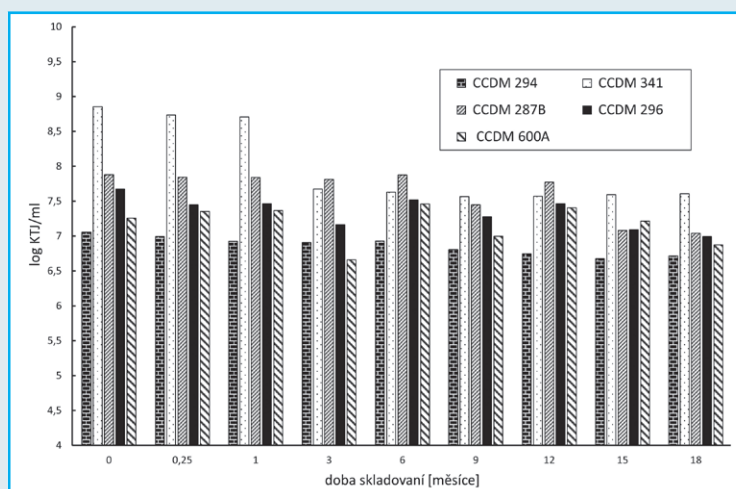
U perlitu a alginátových pelet byly vždy jednotlivé kusy umístěny na Petriho misku s MEA (provedeno 3x). Po kultivaci byl vyhodnocen pozitivní nebo negativní nárůst mycelia. Kultivace probíhala vždy 5 dní při 25 °C.

### Výsledky a diskuse

Vybrané modelové kmeny byly zmrazeny pomocí třech různých postupů a v daných časových intervalech byla testována jejich životaschopnost.

V případě zmrazení v živném mediu s glycerolem byly zjišťovány počty životaschopných spor plotnovou metodou roztěrem na MEA agaru. Z výsledků dosažených během prvních 18 měsíců trvání skladovacího pokusu (obr. 2) je patrný trend pozvolného poklesu životaschopnosti uchovávaných spor. Pokles životaschopnosti spor pro jednotlivé kmeny se pohyboval v rozmezí půl až jeden a půl řádu. U kmene CCDM 294 přežilo 45,4 % spor, u kmene CCDM 600A 41,4 %, CCDM 296 21,0 %, CCDM 287B 14,6 % a CCDM 341 5,7 % spor. Počty životaschopných spor se pro všechny sledované kmeny pohybovaly na vyhovující úrovni kolem  $10^6$  až  $10^7$  KTJ/ml suspenze. Z grafu je patrné kolísání hodnot životaschopných spor a to zejména u kmenů CCDM 296 a 600A, pravděpodobně způsobeno malým počtem opakování. Dále je možné, že v konkrétní kryozkumavce nedošlo k rovnoměrné distribuci výchozí suspenze, případně nebyla dostatečně protřepána před použitím. Metoda zmrazení v živném mediu s glycerolem je snadná na přípravu, kryozkumavky jsou malé, skladné a vzájemně nehrozí jejich kontaminace. Pro častější použití je potřeba připravit větší množství. Glycerol je běžně používané kryoprotektivní médium (Hubálek, 2003). Je používáno v různých koncentracích v kombinacích s řadou zmrazovacích technik (Kitamoto a kol., 2002; Dahmen a kol., 1982).

Ve stejných časových intervalech byly paralelně testovány další dvě metody uchovávání, ve formě alginátových pelet a na perlitu. U těchto metod nebyla životaschopnost spor hodnocena kvantitativně počtem narostlých kolonií,



**Obr. 2** Životaschopnost spor jednotlivých kmenů *Penicillium roqueforti* uchovávaných v -70 °C v živném bujónu s glycerolem v průběhu 18 měsíců

počáteční distribuce spor do alginátových pelet nebo kultivace na perlitu neprobíhá zcela rovnoměrně. Hodnocen byl pouze úspěšný nebo neúspěšný nárůst. Na všech Petriho miskách (tzn. pro obě formy uchování, v případě všech testovaných kmenů i ve všech časových intervalech) byl patrný nárůst zeleného mycelia a kultury byly tedy ve všech případech po 18 měsících skladování životaschopné. Výhoda uchovávání kultur ve formě alginátových pelet spočívá v tom, že lze jednorázově připravit větší množství pelet. Podle potřeby je lze dlouhodobě odebírat a vyhnout se tak častému rozmrazování celého obsahu kryozkumavky. Z praktického hlediska se proto využití alginátových pelet jeví jako nejlepší. Samotná výroba pelet je z testovaných metod časově a procesně nejnáročnější, to se ovšem vrací v pozdější snadné manipulaci s kmenem. Alginátové pelety jsou jako nosiče pro uchovávání houbových mikroorganismů běžně používané (Pereira a Roberts, 1991, Eyal a kol., 1994). Jedná se tedy o ověřenou metodu, vzájemnou kontaminaci jsme vyloučili pomocí negativní kontroly: dvě Petriho misky jsme umístili mezi misky s vysychajícími peletami. Po jejich následné kultivaci jsme nárůst houbových mikroorganismů nezaznamenali. Použití perlitu je z hlediska náročnosti přípravy ze zvolených metod uprostřed a z hlediska praktické manipulace s kmenem nepřinesla oproti zkumavkám s glycerolem žádné výhody. Tato metoda je vhodná pro různé skupiny houbových mikroorganismů (včetně kvasinek), lze použít i pro takové, které nepřežívají rutinnější způsoby uchovávání (Homolka, 2010).

Z hlediska makroskopických vlastností (barva, textura kolonií, posouzení kolonií i ze spodní strany) nedošlo za tuto dobu k žádným zaznamenaným změnám, nicméně je ještě brzy toto hodnotit. Sledování životaschopnosti zmrazených kmenů bude probíhat i nadále.

### Závěr

Závěrem je možno konstatovat, že všechny tři testované varianty zmrazení při -70 °C jsou ve sledovaném časovém

horizontu 18 měsíců pro skladování vhodné, což se potvrdilo v případě všech pěti vybraných sbírkových kmenů *Penicillium roqueforti*. Vhodnost delšího skladování bude nadále sledována. Testované metody mají potenciál pro dlouhodobé uchovávání sbírkových kmenů *Penicillium roqueforti* a ukazují se být vhodnou alternativou k deponaci těchto kmenů na šikmých živných agarech ve zkumavkách, které je nutné znovu obnovovat v intervalech přibližně 12 měsíců, což zvyšuje nejen riziko kontaminace, ale negativně ovlivňuje i jejich vlastnosti.

### Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci programu NPGZM.

**Korespondující autor:** Ing. Zuzana Dlouhá  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Soběslavská 841,  
390 02 Tábor, e-mail: z.dlouha@vum-tabor.cz

### Literatura

DAHMEN H., STAUB T., SCHEINN F. J. (1982): Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. *Phytopathology*, 73, s. 241-246.  
EYAL J., WALTER F. J., OSBORNE L., LANDA Z. (1994): Method for production and use of pathogenic fungal preparation for pest control. United States Patent 5360607

GUPTA V. K., TUOHY M. G., AYYACHAMAMY M., TURNER K. M., O'DONOVAN A. (2013): *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*, Fungal Biology, s 9-16, Springer Science, ISBN 978-1-4614-2355-3  
HOMOLKA L., LISÁ L., EICHLEROVÁ I., VALÁŠKOVÁ V., BALDRIAN P. (2010): Effect of long-term preservation of basidiomycetes on perlite in liquid nitrogen on their growth, morphological, enzymatic and genetic characteristics. *Fungal biology*, 114, s. 929-935.  
HUBÁLEK Z. (2003): Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, s. 205-229.  
KITAMOTO Y., SUZUKI A., SHIMADA S., YAMANAKA K. (2002): A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43, s. 143-149.  
LANDA Z., HORŇÁK P., OSBORNE L.S., NOVÁKOVÁ A., BURSOVÁ E. (2001): Entomogenous fungi associated with spruce bark beetle *Ips typoraphus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in the Bohemian forest. *Silva Gabreta*, 6, s 259-272.  
NAKASONE K. K., PETERSON S. W., SHUNG-CHYNG JONG (2004): Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods* edited by G. Mueller, M. Foster & G. Bills, s 37-47.  
PEREIRA R. M., ROBERTS D. W. (1991): Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of economic entomology*, 84, s 1657-1661.  
SAMSON R. A., HOUBRAKEN J., THRANE U., FRISVAD J. C., ANDERSEN B. (2010): *Food and indoor fungi*. CBS- KNAW Fungal biodiversity centre Utrecht, 481 s., ISBN 978-90-70351-82-3

Přijato do tisku: 18. 1. 2021

Lektorováno: 15. 3. 2021

## “CO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

### VZTAH MEZI KVALITOU MLÉKA A MLÉČNÝCH PRODUKTŮ

#### Somatické buňky mléka a jejich vztah k mléčné užitkovosti a kvalitativním ukazatelům mléka vodních buvolů v Itálii

Costa A. et al. (2020): Milk somatic cell count and its relationship with milk yield and quality traits in Italian water buffaloes. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 5485-5494.

Mléko buvolů (*Bubalus bubalis*) produkované v jižní Itálii je většinou určeno k výrobě sýra Mozzarella di Bufala Campana s chráněným označením původu (CHOP). I přes ekonomickou podporu posledních dvou desetiletí by měl být zemědělský systém dále zdokonalen, aby maximalizoval efektivitu mlékárenského průmyslu, zlepšil výnos a kvalitu mléka a sýrů a usiloval o lepší životní podmínky zvířat. Počet somatických buněk mléka (PSB) se celosvětově používá jako indikátor zdraví vemene a je užitečný pro monitorování hygieny farmy. Vysoký PSB v mléce je navíc spojen se změněným složením a kyselostí a špatnými technologickými vlastnostmi mléka. Avšak platební systém v oblasti CHOP je založen spíše na dodaném množství nežli na kvalitativních charakteristikách mléka a neexistují žádná pravidla týkající se maximálních limitů nebo sankce za zvýšenou hodnotu PSB. Hodnota PSB pro buvolí mléko není ani zakotvena v předpisech EU nebo v protokolech CHOP. Z důvodů zajištění fenotypové charakterizace PSB v populaci a zlepšení znalostí o kvalitě buvolího mléka bylo vyhodnoceno 876 299 údajů z kontroly užitkovosti od 70 156 buvolů. Výsledky odhalily, že přibližně 11 % vzorků vykázalo hodnoty PSB  $\geq 400$  tis./ml (tj. nad povolenou hodnotu stanovenou pro kravské mléko evropskými právními předpisy). Na první, resp. na druhé a vyšších laktacích mělo více než 28 % (resp. 39 %) vzorků PSB  $\geq 200$  tis./ml, a 15 % (resp. 25 %) vzorků PSB  $\geq 300$  tis./ml. Byla prokázána negativní korelace mezi mléčnou užitkovostí a PSB. Pomocí analýzy rozptylu byly sledovány různé faktory (pořadí a stadium laktace, měsíc otelení, aj.) a jejich interakce. Zjištění mohou být cenná pro stanovení spolehlivých a účinných mezních hodnot PSB, které by měly být co nejdříve přijaty, a které by znamenaly snížení hodnot PSB a zvýšení kvality mléka u populace italských buvolů.