

Seznam literatury:

- ABOBATTA W. (2018): Impact of hydrogel polymer in agricultural sector, *Adv. Agric. Environ. Sci.*, 1, (2), s. 59–64.
- BAULI C.R., LIMA G.F., DE SOUZA A.G., FERREIRA R.R., ROSA D.S. (2021): Eco-friendly carboxymethyl cellulose hydrogels filled with nanocellulose or nanoclays for agriculture applications as soil conditioning and nutrient carrier and their impact on cucumber growing, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, 623, 126771, 13 stránek.
- BORKOVÁ M., PEROUTKOVÁ J., ŠALAKOVÁ A., DRBOHLAV J., DUŘPEKOVÁ S., ČECHMÁNKOVÁ J., BĀR L. (2022): Vlastnosti hydrogelů vyrobených z vedlejších produktů mlékárenského průmyslu, *Mlékařské listy* 194, 33, (5), s. 5–10.
- CORTÉS-SÁNCHEZ A.D.J., VALLE-GONZÁLEZ E.R., SALAZAR-FLORES R.D., ASHUTOSH S. (2015): Biotechnological alternatives for the utilization of dairy industry waste products, *Adv Biosci Biotechnol.*, 6, s. 223–235.
- ČECHMÁNKOVÁ J., SKÁLA J., SEDLAŘÍK V., DUŘPEKOVÁ S., DRBOHLAV J., ŠALAKOVÁ A., VÁCHA R. (2021): The synergic effect of whey-based hydrogel amendment on soil water holding capacity and availability of nutrients for more efficient valorization of dairy by-products, *Sustainability*, 13, (19), 10701, 17 stránek.
- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. ÚNMZ, Praha.
- ČSN ISO 6611 (2009): Mléko a mléčné výrobky – Stanovení počtu jednotek vytvářejících kolonie kvasinek a/nebo plísní – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C, ÚNMZ, Praha.
- DURPEKOVA S., FILATOVA K., CISAR J., RONZOVA A., KUTALKOVA E., SEDLARIK V. (2020): A novel hydrogel based on renewable materials for agricultural application, *Int. J. Polym. Sci.*, 2020, 13 stránek.
- NARJARY B., AGGARWAL P., KUMAR S., MEENA M. D. (2013): Significance of hydrogel and its application in agriculture, *Indian Farming*, 62, (10), s. 15–17.
- PEROUTKOVÁ J., BORKOVÁ M., ŠALAKOVÁ A., DRBOHLAV J. (2021): Vlastnosti hydrogelů z kyselé syrovátky a karboxymethylcelulózy s různými síťovacími činidly, *Mlékařské listy* 186, 32, (3), s. 8–13.
- QURESHI M.A., NISHAT N., JADOUN S., ANSARI M.Z. (2020): Polysaccharide based superabsorbent hydrogels and their methods of synthesis: A review, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 1, 100014, 14 stránek.
- ROCHA-MENDOZA D., KOSMERL E., KRENTZ A., GIUSTI M., JIMÉNEZ-FLORES R., GARCÍA-CANO I. (2021): Invited review: Acid whey trends and health benefits, *J. Dairy Sci.*, 104, (2), s. 1262–1275.

Korespondující autor: Ing. Markéta Borková, Ph.D.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

e-mail: borkova@milcom-as.cz

Předáno do tisku: 23. 8. 2023

Lektorováno: 26. 9. 2023

KVANTIFIKACE PŘÍPADNÉHO INTERFERENCE Vlivu KONZERVACE MLÉKA AZIDIOLEM NA VÝSLEDKY REFERENČNÍCH A RUTINNÍCH METOD HYGIENICKO-MIKROBIOLOGICKÝCH ANALÝZ KVALITY MLÉKA

Hana Nejeschlebová¹, Oto Hanuš¹, Lenka Vorlová², Klára Bartáková², Pavlína Navrátilová², Martina Kubínová³, Martina Tišnovská³, Jaroslav Kopecký¹, Radoslava Jedelská¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

² Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

³ Českomoravská společnost chovatelů a.s., Hradištko

Quantification of the possible interfering effect of milk preservation with Azidiol on the results of reference and routine methods of hygienical-microbiologic analyses of milk quality

Abstrakt

Byl hodnocen vliv konzervace mléka Azidiolem na výsledky stanovení počtu somatických buněk (PSB), celkového počtu mikroorganismů (CPM) a počtu koliformních bakterií (PKB) a vliv konzervace Azidiolu a Heeschena činidla na výsledky stanovení přítomnosti reziduí antibiotik (testy Eclipse 50 a Eclipse 4G). Jako referenční sloužily výsledky parametrů vzorků konzervovaných Heeschenovým činidlem (CPM, PKB) a nekonzervovaných vzorků (PSB). Vztahy parametrů PSB, CPM a PKB mléka konzervovaného Azidiolem a mléka referenčních vzorků poskytly významné korelační koeficienty ($P < 0,001$). Systematickou odchylku těchto parametrů bylo možné z hlediska podílu na měřených hodnotách označit pro PSB jako přijatelnou (7,2 %), pro CPM zanedbatelnou (0,03 %) a pro PKB značnou (63,3 %). Kolonie koliformních bakterií při konzervaci Azidiolem vykazaly u některých vzorků netypický vzhled. Testování vzorků mléka prostých antibiotik testem Eclipse 50 poskytlo 100 % správně negativních výsledků, a to jak při konzervaci Azidiolem, tak Heeschenovým činidlem. Eclipse 4 G při tomto testování naopak poskytl pouze 68 % správně negativních výsledků u konzervace Azidiolem a 0 % správně negativních výsledků u konzervace Heeschenovým činidlem. U všech vzorků s přidavkem penicilinu G testy Eclipse 50 a Eclipse 4G poskytly pro konzervaci Azidiolem i Heeschenovým činidlem 100 % správně pozitivních výsledků. Konzervace mléka Azidio-

lem se ukázala jako vhodná pro vzorky mléka určené ke stanovení PSB, CPM a reziduí antibiotik testem Eclipse 50. Heeschenovo činidlo je možné použít pro konzervaci mléka ke stanovení reziduí antibiotik testem Eclipse 50, nikoliv však Eclipse 4G.

Klíčová slova: bazénový vzorek, syrové kravské mléko, Azidiol, Heeschenovo činidlo, počet somatických buněk, celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, rezidua antibiotik

Abstract

The effect of milk preservation with Azidiol on the results of determining the somatic cell count (SCC), the total flora (TF), the number of coliform bacteria (NCB) and the effect of preservation with Azidiol and Heeschen's reagent on the results of the determination of the presence of antibiotic residues (Eclipse 50 and Eclipse 4G tests) was evaluated. The results of parameters of samples preserved with Heeschen's reagent (TF, NCB) and non-preserved samples (SCC) served as a reference. SCC, TF and NCB parameters of Azidiol-preserved milk and parameters of reference samples gave significant correlation coefficients ($P < 0.001$). Giving the proportion in the measured values, the systematic deviation could be evaluated as acceptable for SCC (7.2%), negligible for TF (0.03%) and considerable for NCB (63.3%). Colonies of coliform bacteria showed an atypical appearance in some of the samples preserved with Azidiol. Testing antibiotic-free milk samples with the Eclipse 50 test gave 100% true negative results, both when preserved with Azidiol and Heeschen's reagent. In contrast, the Eclipse 4 G in this testing gave only 68% true negative results for Azidiol preservation and 0% true negative results for Heeschen reagent preservation. For all samples spiked with penicillin G, the Eclipse 50 and Eclipse 4G assays gave 100% true positive results for both Azidiol and Heeschen's reagent preservation. Azidiol milk preservation has been shown to be suitable for milk samples intended for the determination of SCC, TF and antibiotic residues by the Eclipse 50 test. Heeschen's reagent can be used for milk preservation of samples for the determination of antibiotic residues by the Eclipse 50 test, but not Eclipse 4G.

Keywords: bulk tank sample, raw cow milk, Azidiol, Heeschen's reagent, somatic cell count, total flora, coliform bacteria, antibiotic residues

Úvod

Kritickou periodou pro vzorky mléka je jejich transport a skladování od odběru do analýzy. Mléko je vhodným prostředím pro rozvoj mikroorganismů a následnou degradaci jeho organických složek. V mléce postupem času dochází k pomnožování mikroorganismů, degradaci složek metabolismem bakterií a jimi produkovány enzymy (Zájac et al., 2015), redukci PSB (Souza et al., 2005) a poklesu aktivity reziduí antibiotik, pokud jsou

přítomny (Borràs et al., 2013). Nejběžnějším opatřením proti znehodnocení vzorků mléka během skladování a přepravy je jejich úchova v chladovém režimu. Při požadavku na prodloužení času úchovy vzorku nebo nemožnosti dodržení chladírenské teploty je nezbytné použití chemických konzervantů (Molska et al., 1994).

Základním požadavkem na konzervant je jeho schopnost zachovat původní složení vzorku mléka, aniž by při dané analýze působil interferenčně (Kroger, 1985). Řada autorů (Kvapilík a Suchánek, 1974; Buchberger a Kiermeier, 1975; Ardö, 1979, 1982; Ng-Kwai-Hang a Hayes, 1982; Pettipher et al., 1982; Rapp a Münch, 1984; Kroger, 1985; Szijarto et al., 1990; Hanuš et al., 1992; Molska et al., 1994; Benda, 1995; Sánchez et al., 2005; Besse et al., 2008; Borràs et al., 2013; Zájac et al., 2015, 2016) studovala vliv konzervantů (dvojjodnan draselný; azid sodný; bronopol; kyselina boritá) na různé parametry mléka (PSB, CPM, PKB, základní složení, přítomnost reziduí antibiotik) při různých časových a teplotních podmínkách (chladničková a pokojová teplota, zamražení).

V současnosti většina rutinních mlékařských laboratorních systémů využívá ke konzervaci mléka bronopol (v tekuté či tabletované formě) v konečné koncentraci 0,02 až 0,04 %. V některých regionech se využívá konzervace mléka tekutým prostředkem Azidiolem (Borràs et al., 2013; Bucek, 2015), který pro zajištění širšího spektra bakteriostatického účinku využívá jako konzervační složky kromě azidu sodného také chloramfenikol.

Systém referenčních a rutinních mléčných laboratoří hraje významnou roli v podpoře kvality a bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Údaje ze vzorku mléka, jako jsou hlavní složky, počet somatických buněk, močovina a ketolátky, hrají zásadní roli při řízení stáda (Lactanet, 2021). CPM, PSB a nepřítomnost reziduí antibiotik potom představují základní ukazatele hygienické kvality syrového mléka, které musí splňovat požadavky legislativy (nařízení EP a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění pozdějších změn). Uvedené zdůrazňuje potřebu kontroly kvality ošetření a transportu vzorků mléka. Sledování a vyhodnocování kvality syrového mléka pomáhá plnit důležitou společenskou zakázku (Baumgartner et al., 2000). Bezpečnost a kvalita mléčného potravinového řetězce jsou důležitými aspekty ochrany veřejného zdraví.

Cílem této práce bylo, v praktických podmínkách mléčných analytických laboratoří, za daných metodických podmínek, bez ambice kontroly dalších četných variací konzervace, pro konkrétní mléčné ukazatele, posoudit možný interferenční efekt některých způsobů konzervace na věrohodnost výsledků mikrobiologicko-hygienických mléčných ukazatelů.

Materiál a metody

Příprava a měření vzorků

Pro analýzy byly získávány bazénové vzorky mléka dojnic plemen Holštýn a Czech Fleckvieh z komerční kontroly kvality mléka, které byly v chladovém režimu

dopraveny do laboratoře (≤ 8 °C, cca 3 hodiny) a zde rozděleny na alikvoty o objemu 50 ml. V alikvotech vzorků v původním stavu byly následně stanoveny PSB a PKB. Ostatní alikvoty byly pro stanovení jednotlivých parametrů konzervovány dle tabulky 1. Jako konzervanty byly aplikovány Heeschenovo činidlo (Heeschen et al., 1969) a Azidiol (150 μ l na 50 ml mléka; PanReac AppliChem, ITW Reagents, Darmstadt, Německo). Do 10 vzorků určených pro stanovení reziduí antibiotik byl před konzervací navíc přidán penicilin G (penicilin G sodná sůl; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) v konečné koncentraci 5 ppb. Konzervované vzorky byly měřeny cca 24 ± 6 hod. od konzervace. Analýza vzorků byla prováděna duplicitně podle relevantních standardních operačních postupů akreditované laboratoře (zkušební laboratoř 1312.2 akreditována ČIA podle ČSN EN ISO/IEC 17025 (2018), LRM Brno-Tuřany) a podle postupů laboratoře VÚM Praha, pracoviště Šumperk.

Tab. 1 Konzervace vzorků mléka ke stanovení mléčných parametrů

Parametr	Počet vzorků	Úprava alikvotů k analýzám
PSB	60	nekonzervované konzervace Azidiol
CPM	93	konzervace Heeschen konzervace Azidiol
PKB	26	konzervace Heeschen konzervace Azidiol
Rezidua antibiotik – Eclipse 50	110	konzervace Heeschen konzervace Azidiol
Rezidua antibiotik – Eclipse 4G	35	konzervace Heeschen konzervace Azidiol

Použité analytické metody a přístroje a jednotky mléčných ukazatelů

PSB byl stanoven ($10^3 \times \text{ml}^{-1}$) průtokovým cytometrem Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). CPM byl stanoven automaticky přímým počítáním bakteriálních buněk průtokovým cytometrem BactoScan FC (Foss Electric, Dánsko) s následujícím přepočtem relevantní konverzní rovnicí na jednotky KTJ $\times \text{ml}^{-1}$ podle referenční kultivační metody dle ČSN EN ISO 4833-1 (2014). Stanovení PKB (KTJ $\times \text{ml}^{-1}$) bylo provedeno kultivační metodou při 30 °C dle ČSN ISO 4832 (2010).

Rezidua antibiotik v mléce byla stanovována mikrobiologickými širokospektrálními testy Eclipse 50 a Eclipse 4G (Zeulab, Španělsko), které jsou založeny na inhibici růstu spor bakterie *Geobacillus stearothermophilus*. Výsledky testu Eclipse 50 byly odečítány vizuálně dle barevné škály v návodu výrobce, v případě Eclipse 4 G byly výsledky vyhodnoceny čtečkou Comet 32 (Zeulab, Španělsko). Výsledky testů byly hodnoceny jako pozitivní a negativní na přítomnost reziduí antibiotik.

CPM a rezidua antibiotik metodou Eclipse 50 byly stanoveny v akreditované laboratoři (LRM Brno – Tuřany,

Českomoravská společnost chovatelů a.s.). PSB, PKB a rezidua antibiotik metodou Eclipse 4 G byly stanoveny v Mléčné laboratoři VÚM.

Při prováděných analýzách byly rovněž rámcově dodržovány požadavky standardů: ČSN EN ISO/IEC 17025 (2018); ČSN ISO 8196-1 (2016); ČSN ISO 8196-2 (2016); ČSN ISO 8196-3 (2016); ČSN EN ISO 13366-1 (1998); ČSN EN ISO 13366-2 (2007); ČSN EN ISO 7218 (2008).

Statistické vyhodnocení

Pro párové výsledky PSB, CPM a PKB ve vzorcích mléka nekonzervovaných (Nekonz) \times konzervovaných Azidiolem (Konz Azidiol) a konzervovaných Heeschenovým činidlem (Konz Heeschen) \times Konz Azidiol byly vypočteny základní statistické charakteristiky (aritmetický průměr \bar{x} , směrodatná odchylka s_x , variační koeficient v_x). K popisu vztahů Nekonz \times Konz Azidiol a Konz Heeschen \times Konz Azidiol byla použita korelační analýza metodou lineární regrese s výpočtem korelačního koeficientu r a koeficientu determinace R^2 a dále byly vypočteny diferenční statistické parametry pro individuální diference z párových vzorků, přičemž výsledky ukazatelů vzorků Nekonz a Konz Heeschen byly vždy v referenční (nezávislé) pozici. Pro průměrné diference byl dále proveden párový t -test. Významnost korelací a diferencí byla posouzena na konvenčních hladinách pravděpodobnosti intervalu spolehlivosti (nevýznamné ns $P > 0,05$; * (významné s) $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

Výsledky testů stanovení přítomnosti reziduí antibiotik jsou uvedeny jako četnosti pozitivních výsledků pro varianty Konz Azidiol a Konz Heeschen.

Všechna vyhodnocení byla provedena s použitím programu MS Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Ve vyhodnocení byly zohledněny respektované principy (Grappin, 1987).

Výsledky a diskuse

Statistické vyhodnocení vlivu konzervace na výsledky stanovení PSB, CPM, PKB a reziduí antibiotik je uvedeno v Tab. 2 až 3, Obr. 1 až 3.

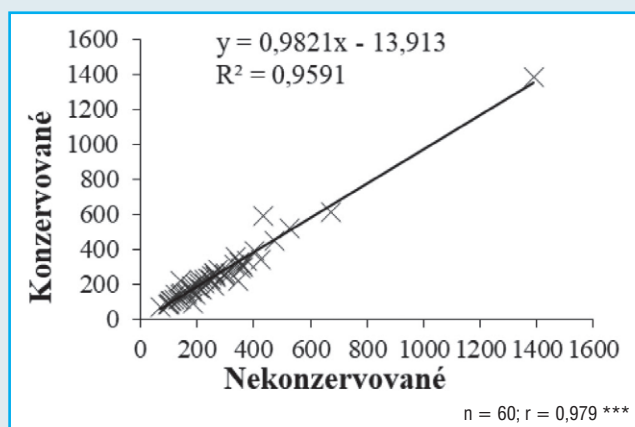
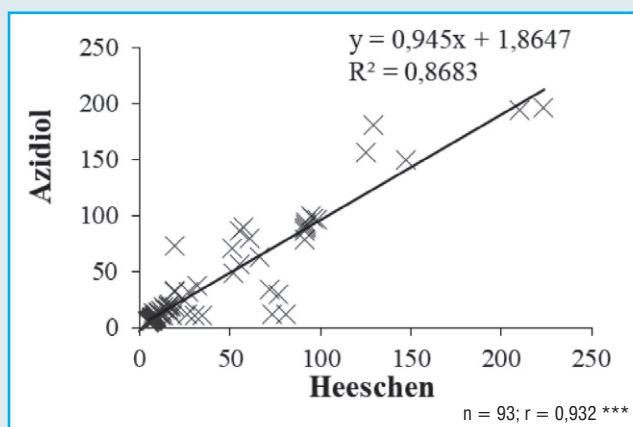
PSB ve vzorcích mléka konzervovaných Azidiolem významně koreloval s PSB ve vzorcích nekonzervovaného mléka. Vztah poskytl významnou systematickou odchylku, kterou však z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách lze pro výsledky průtočné cytometrie považovat za přijatelnou (7,2 %; Tab. 2). Variabilitu PSB v konzervovaných vzorcích bylo možné z 96 % vysvětlit variabilitou PSB v mléce bez konzervace (Tab. 2; Obr. 1). Konzervace vzorků mléka Azidiolem je dle získaných výsledků vhodná pro vzorky mléka ke stanovení PSB.

CPM v mléce konzervovaném Azidiolem významně koreloval s CPM v mléce konzervovaném Heeschenovým činidlem. Systematickou odchylku, která byla

Tab. 2 Statistické vyhodnocení vlivu konzervace vzorků mléka Azidiolem na výsledky měřených mléčných ukazatelů

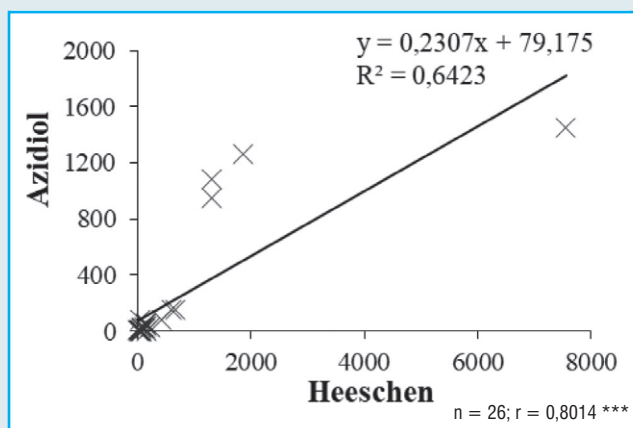
Metoda	Test	Ref.	Ukazatel	n	$\bar{x} \pm s_x$	v_x	$\bar{x} \pm s_x$	v_x	$d \pm sd$	d sig.	D	r	R ²
					Test (y)	%	Ref. (x)	%	Test. – Ref.	%	%	%	
FC (Somacount 300)	AZ	NEK	PSB	60	246 ± 188	76,4	264 ± 188	71,2	-19 ± 38	P < 0,001	7,2	0,979	95,9
FC (BactoScan FC)	AZ	HE	CPM	93	33,8 ± 44,5	131,8	33,8 ± 43,9	129,3	0,01 ± 16,34	P > 0,05	0,03	0,932	86,8
Kultivační metoda při 30 °C (ČSN ISO 4832)	AZ	HE	PKB	26	214 ± 431	201,6	584 ± 1 498	256,5	-370 ± 1 181	P > 0,05	63,3	0,801	64,2

Všechny korelační koeficienty $r = P < 0,001$ (na Obr. = ***); Ref. = reference; n = počet případů; \bar{x} = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka průměru; v_x = variační koeficient; d = průměrná diference; sd = směrodatná odchylka průměrné diference; sig. = významnost; D = absolutní hodnota relativní diference (100 % = Ref.); r = koeficient korelace; x a y = osy lineární regrese; R² = koeficient determinace; FC = průtočná cytometrie; AZ = Azidiol; HE = Heeschenovo činidlo; NEK = nekonzervované; PSB = počet somatických buněk ($10^3 \times \text{ml}^{-1}$); CPM = celkový počet mezofilních mikroorganismů ($10^3 \text{ KTJ} \times \text{ml}^{-1}$); PKB = počet koliformních bakterií ($\text{KTJ} \times \text{ml}^{-1}$).

**Obr. 1** Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu počtu somatických buněk (PSB v $10^3 \times \text{ml}^{-1}$) podle referenčního výsledku (nekonzervované mléko) pomocí průtočné cytometrie na zařízení Somacount 300**Obr. 2** Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu celkového počtu mikroorganismů (CPM v $10^3 \text{ KTJ} \times \text{ml}^{-1}$) podle referenčního výsledku (mléko konzervované Heeschenovým činidlem) pomocí průtočné cytometrie na zařízení BactoScan FC

nevýznamná, lze z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách pro metodu průtočné cytometrie označit za zanedbatelnou (0,03 %; Tab. 2). Variabilita CPM v mléce konzervované Azidiolem byla z 87 % podmíněna variabilitou PSB v mléce konzervované Heeschenovým činidlem (Tab. 2; Obr. 2). Lze tudíž konstatovat, že konzervaci mléka Azidiolem lze použít pro vzorky určené ke stanovení CPM.

PKB v mléce konzervované Azidiolem významně koreloval s PKB v mléce konzervované Heeschenovým činidlem, vztah byl však méně těsný než v případě PSB a CPM. Systematickou odchylku, která byla sice nevýznamná, je nutné z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách považovat za značnou (63,3 %; Tab. 2). Variabilita PKB v mléce konzervované Azidiolem byla navíc pouze z 64 % dána variabilitou PKB v mléce konzervované Heeschenovým činidlem (Tab. 2; Obr. 3). Kolonie koliformních bakterií ze vzorků mléka ošetřených Azidiolem se v některých případech lišily od typického vzhledu kolonií koliformních bakterií, byly bledší fialové barvy a menší velikosti. Na základě uvedeného nelze Azidiol doporučit ke konzervaci mléka, ve kterém má být stanovován PKB. Námi zjištěná zvýšená citlivost koliformních bakterií k Azidiolu může souviset s výsledky práce Torres-Lindarte et al., (2017), kteří zkoumali vliv Azidiolu na uměle zaočkované kultury mastitidních patogenů (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escheri-*

**Obr. 3** Vliv konzervace vzorků mléka Azidiolem na hodnotu počtu koliformních bakterií (PKB v $\text{KTJ} \times \text{ml}^{-1}$) podle referenčního výsledku (mléko konzervované Heeschenovým činidlem) kultivační metodou při 30 °C dle ČSN ISO 4831

chia coli) v mléce po následné 24hodinové inkubaci při 20 °C. Zatímco stafylokoky i *Streptococcus uberis* bylo možné po této době z inokulovaných vzorků izolovat, bakterie *Escherichia coli* vykultivovány nebyly. De Garnica et al. (2011) dále uvádějí průměrný PKB ve vzorcích (n = 10) nekonzervovaného mléka po úchově při 4 °C po 2 hodinách 3,44 log KTJ/ml, u mléka konzervovaného Azidiolem po 2 hodinách úchovy 3,15 log KTJ/ml a po 24 hodinách 2,91 log KTJ/ml.

Tab. 3 Vliv konzervace mléka Heeschenovým činidlem a Azidiolom na výsledky testů stanovení přítomnosti reziduí antibiotik

	Test	Počet vzorků	Počet pozitivních vzorků na stanovení reziduí antibiotik	
			Konzervace Heeschen	Konzervace Azidiol
Vzorky prosté reziduí antibiotik	Eclipse 50	100	0	0
	Eclipse 4G	25	25	8
Vzorky s přídavkem penicilinu G (5 ppb)	Eclipse 50	10	10	10
	Eclipse 4G	10	10	10

Stanovení reziduí antibiotik v mléce bylo prováděno pro konzervaci Azidiol a Heeschenovo činidlo širokospektrálními mikrobiologickými testy Eclipse 50 a Eclipse 4 G. V rámci testování vzorků mléka prostých antibiotik Eclipse 50 poskytl 100 % správně negativních výsledků (100 negativních výsledků na 100 vzorků prostých antibiotik), a to jak při konzervaci Azidiolom, tak Heeschenovým činidlem (Tab. 3). Eclipse 4 G při tomto testování naopak poskytl pouze 68 % správně negativních výsledků (17 správně negativních výsledků na 25 vzorků prostých antibiotik) u konzervace Azidiolom a 0 % správně negativních výsledků u konzervace Heeschenovým činidlem (25 pozitivních výsledků na 25 vzorků prostých antibiotik; Tab. 3). U všech vzorků s přídavkem penicilinu G testy Eclipse 50 a Eclipse 4G poskytly pro konzervaci Azidiolom i Heeschenovým činidlem 100 % správně pozitivních výsledků (10 pozitivních výsledků na 10 vzorků s penicilinem G; Tab. 3). Z uvedeného vyplývá vhodnost použití konzervace Azidiolom a Heeschenovým činidlem pouze pro test Eclipse 50. Získané výsledky tak ukazují, že při testování konzervovaných vzorků mléka mikrobiologickými inhibičními testy existuje riziko falešně pozitivních výsledků. Borràs et al. (2013) uvedli snížení specifity širokospektrálních mikrobiologických testů BRT AiM (z 96,3 % na 90,2 %) a Delvotestu (z 97,7 % na 91,0 %) při konzervaci mléka Azidiolom. Při použití dichromanu draselného došlo k úplné interferenci konzervantu s oběma inhibičními testy.

Závěr

Vhodně zvolená chemická konzervace umožňuje zachovat původní vlastnosti vzorku bez významného interferenčního vlivu na prováděné analýzy. Konzervanty z podstaty svého účelu obsahují komponenty inhibující mikrobiální růst. Jejich použití tak může být problematické především při konzervaci vzorků určených k mikrobiologickým analýzám. Zejména v problematice stanovení reziduí antibiotik v mléce je otázka případného vlivu konzervace vzorku na výsledek velmi významná, neboť při použití mikrobiologických širokospektrálních testů, které jsou velmi citlivé, se může použité konzervans chovat jako inhibiční substance a interferovat do výsledku testu. Tím by mohla konzervace vzorků mléka pro laboratorní kontrolu kvality iniciovat například i falešně pozitivní výsledky komerčních testů stanovení

reziduí antibiotik. Komplikovaná se může rovněž ukázat konzervace vzorků určených ke stanovení některých skupin mikroorganismů, které k danému konzervantu vykazují zvýšenou citlivost. Proto je důležité tyto technologické aspekty analýz kvality mléka v laboratořích metodicky validovat a v případě komerčních testů stanovení přítomnosti reziduí antibiotik v mléce je vhodné konzervaci mléka také konzultovat s výrobcem.

Výsledky ukázaly vhodnost použití Azidiolu pro stanovení počtu somatických buněk metodou průtokové cytometrie za použití přístroje Somacount 300, celkového počtu mikroorganismů průtokovou cytometrií za použití přístroje BactoScan FC a reziduí antibiotik metodou Eclipse 50. Výsledky testů konzervantu Azidiol pro posouzení případného interferenčního efektu na výsledky hygienicko-mikrobiologických analýz mléka se stanou jako přílohy součástí standardních operačních postupů a rozšíří praktické portfolio metod ošetření vzorků mléka pro oficiální účely akreditačních auditů mléčné laboratoře.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektů MZe NAZV Země QK 21010326 a MZe RO 1423.

Seznam literatury

- ARDÖ, Y. (1979): Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, 34, s. 14–16.
- ARDÖ, Y. (1982): Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using Fossomatic. *Milchwissenschaft*, 37, s. 139–142.
- BAUMGARTNER, CH. und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement: Qualitäts (2000): Leitfaden für den Betrieb von Routine – Untersuchungsgeräten in Rohmilch – Prüfungslaboratorien, 1. Ausgabe, Oktober, s. 32.
- BENDA, P. (1995): Vliv některých konzervačních činidel na přirozenou mikroflóru vzorků mléka. The effect of some preservatives on natural microflora in milk samples. *Vet. Med.-Czech*, 40, s. 359–364.
- BESSE N. H., CAUQUIL A., VIGNAUD M. L., BARRE L., DEPERROIS V., VOITOUX E., OBABAKA M. B., LOMBARD B. (2008): Comparative study of different milk samples preservation procedures for bacteriologic examination. *Food Analytical Methods*, 1, s. 36–42.
- BORRÀS M., ROCA M., ALTHAUS R. L., MOLINA M. P. (2013): Effect of storage and preservation of milk samples on the response of microbial inhibitor tests. *Journal of Dairy Research*, 80, s. 475–484.
- BUCEK (2015): Practical aspects in milk recording in Central and Eastern Europe and its effects on the guidelines (online). Staženo 20. 2. 2023. Dostupné z: <https://www.icar.org/wp-content/uploads/2015/09/Bucek-2.pdf> s. 1–42
- BUCHBERGER J., KIERMEIER F. (1975): Über die Eignung von Natriumazid zur Konservierung von Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung* (Kempen Allgäu), F 8, s. 192–194.
- ČSN EN ISO/IEC 17025 (2018): Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří.
- ČSN EN ISO 13366-1 (1998): Mléko – Stanovení počtu somatických buněk – Část 1: Mikroskopická metoda.
- ČSN EN ISO 13366-2 (2007): Mléko – Stanovení počtu somatických buněk – Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje.
- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.
- ČSN EN ISO 7218 (2008): Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologická zkoušení.

- ČSN ISO 4832 (2010): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií – Technika počítání kolonií.
- ČSN ISO 8196-1 (2016): Mléko – Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka – Část 1: Analytické atributy alternativních metod.
- ČSN ISO 8196-2 (2016). Mléko – Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka – Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při analýzách mléka alternativními metodami.
- ČSN ISO 8196-3 (2016): Mléko – Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka – Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních metod pro analýzu mléka.
- DE GARNICA M. L., SANTOS J. A., GONZALO C. (2011): Influence of storage and preservation on microbiological quality of silo ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 94, s. 1922–1927.
- GRAPPIN R. (1987): Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. *Bulletin of the International Dairy Federation*, Doc. 208, IDF Provisional Standard 128, s. 3–12.
- HANUŠ O., GENČUROVÁ V., GABRIEL B., ŽVÁČKOVÁ, I. (1992): Srovnání účinnosti konzervačního přípravku Milkofix s tradičními konzervačními prostředky pro účely stanovení počtu somatických buněk ve vzorcích mléka fluoro-opto-elektronickou metodou. *Veterinární Medicína*, 37, s. 91–99.
- HEESCHEN W., REICHMUTH J., TOLLE A., ZEIDLER H. (1969): Die Konservierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchung. *Milchwissenschaft*, 24, s. 729–773.
- KROGER M. (1985): Milk sample preservation. *Journal of Dairy Science*, 68, s. 783–787.
- KVAPILÍK J., SUCHÁNEK B. (1974): Vliv konzervace vzorků mléka na výsledky rozborů. *Živočišná Výroba*, 19, s. 31–38.
- LACTANET (2021): Milk sampling in Summer Temperatures. *Lactanet*.
- MOLSKA I., ZACHAREWICZ E., ZACHAREWICZ A., PLUTA A. (1994): The use of chemical preservatives for stabilization of milk for microbiological analyses. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 3/44, s. 113–123.
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, ve znění pozdějších předpisů.
- NG-KWAI-HANG K. F., HAYES J. F. (1982): Effects of potassium dichromate and sample storage time on fat and protein by Milko-Scan and on protein and casein by a modified Pro-Milk Mk II method. *Journal of Dairy Science*, 65, s. 1895–1899.
- PETTIPHER G. L., RODRIGUES U. M. (1982): A bacteriostatic mixture for milk samples and its effect on bacteriological, cytological and chemical compositional analysis. *Journal of Applied Bacteriology*, 52, s. 259–265.
- RAPP M., MÜNCH S. (1984): Neuentwicklung von flüssigen Konservierungsmitteln für Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 105, s. 1264–1272.
- SÁNCHEZ A., SIERRA D., LUENGO C., CORRALES J. C., MORALES C. T., CONTRERAS A., GONZALO C. (2005): Influence of Storage and Preservation on Fossomatic Cell Count and Composition of Goat Milk. *Journal of Dairy Science*, 88, s. 3095–3100.
- SOUZA G. N., SILVA M. R., SOBRINHO R. O., COELHO M. A., BRITO M. A. V. P., BRITO J. R. F. (2005): Effects of temperature and storage on somatic cell counts in milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57, s. 830–834.
- SZJARTO L. F., HARDING, F., HILL, A. R., MELICHERCIK J. (1990): Cooling systems for transport of unpreserved milk samples. *Journal of Dairy Science*, 73, s. 2299–2308.
- TORRES-LINDARTE G., VIDAL-ARBOLEDA J., CARABALLO-GUZMÁN A., VARGAS-HOYOS K., OLIVERA-ÁNGEL M. (2017): Effect of the preservative azidol on the detection of mastitis-causing bacteria by microbiological culture. *Veterinaria y Zootecnia*, 11, s. 93–102.
- ZAJÁC P., ČAPLA J., VIETORIS V., ZUBRICKÁ S., ČURLEJ J. (2015): Effect of storage on the major constituents of raw milk. *Potravinářstvo*, 9, s. 375–381.
- ZAJÁC P., ZUBRICKÁ S., ČAPLA J., ZELENÁKOVÁ L., ŽIDEK R., ČURLEJ J. (2016): Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, 61, s. 239–244.

Korespondující autor: Mgr. Hana Nejeschlebová
 Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,
 Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6
 email: hana.nejeschlebova@seznam.cz

Přijato do tisku: 27. 3. 2023
 Lektorováno: 10. 10. 2023

“CO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERAURE”

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

Mléčné fosfolipidy a kompozitní nanosystémy na bázi podmásli pro zvýšenou stabilitu a biologickou dostupnost β -karotenu

Bina Zarif, Saima Shabbir, Abdur Rahman, Tauqir A. Sherazi, Ramla Shahid (2023): Milk phospholipids and buttermilk based composite nanosystems for enhanced stability and bioaccessibility of β -caroten. *International Dairy Journal*, 143, s. 105668.

Biologická dostupnost lipofilního β -karotenu je často narušena. K překonání tohoto problému se považují za účinné koloidní transportní systémy (CDS) na bázi lipidů. V této studii byly vyvinuty kompozitní nanosystémy mléčných fosfolipidů (MPL), sušeného podmásli (BMP) a jejich kombinace s účinností enkapsulace $91 \pm 2,7$ %. Skenování elektronovou mikroskopií ukázalo jejich sférickou morfologii, která byla u BMP mírně nepravidelná. Byly provedeny analýzy dynamického rozptylu světla pro velikost ($172 \pm 5 - 217 \pm 2$ nm) a index polydisperzity (0,24–0,37). Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací potvrdila, že β -karoten byl začleněn do nanosystémů slabou elektrostatickou interakcí. Pokus zjistit kapacitu β -karotenu inhibovat peroxidaci lipidů pomocí thiobarbiturových reaktivních látek (THBARS) přinesl zjištění, že nanosystémy z MPL, BMP a jejich kombinace účinně inhibovaly tvorbu THBARS ($20,6 \pm 2,9 - 50 \pm 4,5$ %). Simulace trávení in vitro ukázala, že chemická stabilita byla $82 \pm 2,4$ % a účinná biodostupnost byla $94,8 \pm 5$ % a $70,5 \pm 3,2$ % u jejich kombinace. Proto lze konstatovat, že koloidní transportní systémy na bázi mléčných složek mohou poskytovat racionální design pro nutriční aplikace se zvýšenou biodostupností β -karotenu.