

CM42_2023
**Eliminace azidiolového vlivu konzervace vzorků
mléka na výsledky referenčních a rutinních
mlékařských analytických metod**

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

Hana Nejeschlebová, Oto Hanuš, Marcela Klimešová, Radoslava Jedelská,
Jaroslav Kopecký, Ludmila Nejeschlebová
Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

ISBN 978-80-88390-07-7 (MILCOM)

Duben 2023

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. vydal MILCOM a.s.,
Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm42_2023.pdf

1. Vydání 2023

ISBN 978-80-88390-07-7 (MILCOM)

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky:

Hana Nejeschlebová (51 %), Oto Hanuš (17 %), Marcela Klimešová (9 %), Radoslava Jedelská (9 %), Jaroslav Kopecký (9 %), Ludmila Nejeschlebová (5 %)

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

- 1) Odborník z daného oboru: Ing. Libor Janů Ph.D., pracoviště: Everstar s.r.o. Šumperk, chemik, odborník na čisticí a dezinfekční roztoky a analýzy mléka, vedoucí laboratoře a technologie výroby;
- 2) Pracovník státní správy: Ing. Zdenka Majzlíková, pracoviště: Česká plemenářská inspekce, Praha – odborník v kontrole užitečnosti zvířat a v mlékařství.

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení podpory na rozvoj výzkumné organizace č. MZe RO 1423.

Projekty a podpory rozvoje instituce (podíly): MZe RO 1423 (100 %).

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení rutinních systémů analytické laboratoře v kontrole kvality mléka k testaci složek a vlastností bazénových vzorků mléka a pro zvýšení věrohodnosti analytických výsledků prostřednictvím kontroly podmínek konzervace vzorků.

I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky CM 42 2023 je podpora kontrolních metod a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních analytických laboratoří v systému kontroly kvality mléka (bazénové vzorky mléka - podpora bezpečnosti mléčného potravinového řetězce) prostřednictvím kontroly podmínek konzervace vzorků a také podpora postupů pro zajištění kladného průběhu relevantních, oficiálních, akreditačních auditů (ČIA).

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky CM 42 2023 je implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího a současného výzkumu a vývoje v rámci řešení projektu MZe RO 1423, do prostředí systému práce rutinní analytické laboratoře kontroly kvality mléka pro podporu spolehlivosti dat ke kontrole bezpečnosti mléčného potravinového řetězce ve fázi kontroly kvality suroviny (syrového mléka). Jedná se fakticky o validační podporu standardních operačních postupů akreditovaných mléčných laboratoří v ČR.

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 03.04.2023.

II) Vlastní popis certifikované metodiky

Eliminace azidiolového vlivu konzervace vzorků mléka na výsledky referenčních a rutinních mlékařských analytických metod

Struktura certifikované metodiky:

1) Úvod – literární podklady a současná situace

Kontrola kvality syrového mléka (KKM);

Ošetření vzorků mléka pro kontrolu kvality;

Významné ukazatele kontroly kvality mléka a obecně metody jejich stanovení;

Výsledky kvality syrového mléka v ČR nyní a v časové dynamice;

Podstata komplexnosti laboratorní kontroly kvality syrového mléka ve vyspělých zemích.

2) Cíl metodiky testu vlivu konzervace bazénových vzorků mléka v kontrole kvality

3) Metodika, výsledky a jejich vyhodnocení při ověření vlivu azidiolové konzervace vzorků mléka na výsledky vybraných, referenčních a rutinních mlékařských analýz

Testovací soubor a jeho analýza

Metody použité pro stanovení parametrů mléka

Výsledky vlivu konzervace mléka Azidiolem na sledované parametry mléka

Doporučení pro konzervaci vzorků mléka Azidiolem

4) Závěr certifikované metodiky ověření vlivu azidiolové konzervace vzorků mléka na výsledky vybraných, referenčních a rutinních mlékařských analýz

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech;

Předchozí tematicky relevantní certifikované metodiky k problematice provedení konzervace vzorků mléka v kontrole kvality mléka a mléčné užitkovosti.

7) Přílohové materiály s podklady pro ověření vlivu azidiolové konzervace vzorků mléka na výsledky vybraných, referenčních a rutinních mlékařských analýz

Nejčastěji použité zkratky:

B = obsah bílkovin;
BMM = bod mrznutí mléka;
CF = průtočná cytometrie;
CPM = celkový počet mezofilních mikroorganismů;
ČR = Česká republika;
ČIA = Český institut pro akreditaci o.p.s, Praha;
ČMSCH a. s. = Českomoravská společnost chovatelů;
B = obsah hrubých bílkovin;
EBMM = ekvivalent bodu mrznutí mléka;
ICAR = Mezinárodní výbor pro kontrolu užítkovosti zvířat;
KAS = kasein;
KFB = koliformní bakterie;
KKM = kontrola kvality mléka;
KTJ = CFU = kolonii tvořící jednotka;
L = obsah laktózy;
LRM = laboratoř rozborů mléka;
M = koncentrace močoviny;
MIR-FT = technologie infraanalýzy mléka s celým spektrem pomocí Michelsonova interferometru a s využitím Fourierových transformací;
PPM = celkový počet psychrotrofních mikroorganismů;
PSB = počet somatických buněk;
PTRB = počet termorezistentních bakterií;
RIL = rezidua inhibičních látek;
SOP = standardní operační postup;
T = obsah tuku;
TRSB = termorezistentní sportující bakterie;
STP = obsah sušiny tukuprosté;
VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku;
VÚM = Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha.

1) Úvod – literární podklady a současná situace

Kontrola kvality syrového mléka (KKM)

Kvalita potravin a potravinových surovin je dlouhodobě a aktuálně významným tématem zejména ve vyspělých zemích. Důležitou ekonomickou roli hraje důvěra veřejnosti v bezpečnost potravinového koše. Kvalita syrového mléka se zjišťuje v bazénových vzorcích mléka a tato činnost hraje zásadní roli v podpoře hygienické bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. 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.

Syrové mléko je významná potravinová surovina. Podle země nebo lokálních podmínek je více nebo méně placeno podle kvality, která je definována normami a v důsledku toho celou řadou mléčných ukazatelů (např. celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk, obsah tuku a bílkovin, bod mrznutí mléka atd.). Podle některých složek a vlastností mléka se také šlechtí mléčný skot (metody populační genetiky) na složení mléka, efektivitu mléčné produkce nebo zdravotní stav krav, resp. jejich rezistenci vůči produkčním chorobám (např. mastitidám). Výsledky referenčních a rutinních analýz mléka jsou tedy konkrétně využívány pro řadu zdravotních a hospodářských účelů a činností:

- pro kontrolu kvality surovin v potravinářství a potravin v humánní výživě, tedy bezpečnost potravinových řetězců;
- pro zpeněžování mléka podle kvality na rozhraní prvovýroby a zpracovatelského průmyslu;
- pro účely řízení zpracovatelských technologických procesů a kontroly jejich výtěžnosti, tedy efektivity;
- pro účely hospodářsky determinované selekce při šlechtění mléčného skotu a následně pro obchod s plemenným materiálem;
- pro kontrolu v rámci prevence nedostatků základní (energeticko-dusíkaté) vyváženosti výživy dojnic i zhoršení jejich zdravotního stavu;
- pro poradenství v prvovýrobě mléka;
- v neposlední řadě i pro stanovení podmínek světového obchodu s mlékem.

Ošetření vzorků mléka pro kontrolu kvality

Významnou činností pro kvalitu výsledků analýz syrového mléka je odběr, ošetření a transport vzorků mléka. Kritickou periodou pro vzorky mléka je doba od odběru do analýzy, obvykle zahrnující i transport, z pohledu času, průběhu teploty a aplikace konzervačního prostředku, které mají zajistit setrvání originálního stavu materiálu (jeho organického složení) pro účely analýzy. Mléko je, jak známo, vhodným prostředím pro vývoj mikroorganismů a následnou degradaci jeho organických složek. Obecně jsou na nárůstové změny nebo destrukční účinky při špatném ošetření vzorků citlivé zejména takové mléčné ukazatele, jako je celkový počet mikroorganismů a počet somatických buněk, který je významným ukazatelem zdravotního stavu mléčných žláz dojnic (z hlediska frekvence výskytu zejména subklinických mastitid), hygieny dojení, ztrát dojivosti a propadu cen za kvalitu mléka (KVAPILÍK et al., 2014, 2015, 2016, 2017 a, b). Proto, pokud neinterferuje výrazně do výsledků analýz, je použití konzervačního prostředku obvyklé, přičemž výhodou je souběžná stabilita nízkých teplot během uložení vzorku a zkrácení času prodlení do analýzy na minimum.

Pořadí náročnosti složek nebo vlastností mléka na podmínky transportu bazénových vzorků v kontrole kvality mléka, podle jejich stability lze, na základě dlouhodobých zkušeností, uvést metodou kvalifikovaného odhadu následovně, v sestupném pořádku: - celkový počet mikroorganismů (CPM); - ostatní mikroorganismy pro kultivační metody; - rezidua inhibičních látek (RIL); - počet somatických buněk (PSB); - volné mastné kyseliny (VMK); - tuk; - bod mrznutí mléka (BMM); - močovina; - laktóza; - bílkoviny; - kasein; sušina tukuprostá (STP). Je přirozené, z hlediska významu, že limitujícím faktorem pro systém transportu vzorků je samozřejmě náročnost CPM.

Důležitým krokem ošetření vzorků mléka je jejich konzervace. Typ a způsob konzervace je nutné adjustovat tak, aby byl efektivně plněn požadavek prodloužit a zachovat vlastnosti vzorku po potřebnou dobu do analýzy. Typ konzervace je třeba vybrat podle principu analytické metody, aby neovlivňoval výsledky analýz. Byly zkoušeny vzorky mléka na stabilitu složení a vlastností (KVAPILÍK a SUCHÁNEK, 1974; BUCHBERGER a KIERMEIER 1975; ANONYM, 1977; ARDÖ, 1979, 1982; PETTIPHER et al., 1982; NG-KWAI-HANG a HAYES, 1982; RAPP a MÜNCH, 1984; BIGGS et al., 1984; KROGER, 1985; SZIJARTO et al., 1990; HANUŠ et al., 1992 a, b, c, 2004, 2006, 2007, 2008 a, b, 2019, 2022; GENČUROVÁ et al., 1993 a, b, 1994; BENDA, 1995; BAUMGARTNER a LANDGRAF, 2005; KLIMEŠOVÁ et al., 2021) po různý čas, bez konzervace a s různými konzervačními prostředky (nejčastěji: dvojchroman draselný; azid sodný; bronopol = 2-Brom-2-Nitropropan-1,3-Diol), v různých teplotách (chladničkové a pokojové) i zamražené, pro různé mléčné ukazatele (nejčastěji: tuk; bílkoviny; laktóza; sušina tukuprostá, počet somatických buněk; celkový počet mikroorganismů, ostatní mikroorganismy, močovina).

Že jsou otázky konzervace vzorků mléka stále aktuální, dokládají práce ZAJÁC et al. (2015, 2016), kde bylo testováno a zjištěno: - účinek různých koncentrací čtyř různých konzervačních látek, dichroman draselný ($K_2Cr_2O_7$), Azidiol (azid sodný, NaN_3), bronopol (2-brom, 2-nitro, 1, 3, propandiol, $C_3H_6BrNO_4$) a Microtabs II (kompozitní prostředek s fortifikací bronopolu); - analýzy mléka pomocí infračervené spektroskopie ve středové oblasti (MIR, MIR-FT); - konečné koncentrace konzervačních látek ve vzorcích syrového mléka činily 0,005 %, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % a 1 %; - čerstvé kravské mléko konzervované 2 a 24 hodin po dojení; - koncentrace konzervačního činidla měla významný účinek ($P < 0,005$) na výsledky laboratorních analýz; - je třeba použít správnou koncentraci pro běžnou konzervaci vzorků.

Významné ukazatele kontroly kvality mléka a obecně metody jejich stanovení

Kontrola kvality syrového mléka v ČR probíhá, pro účely zpeněžování, ve dvou akreditovaných mléčných laboratořích: LRM Brno-Tuřany (ČMSCH a. s.; cca 2/3); Madeta České Budějovice (cca 1/3). Mezi nejvýznamnější sledované ukazatele (v ČR), podle potravinové legislativy EU a nebo příslušných dodavatelsko-odběratelských smluv patří, v pořadí dle důležitosti (pro zisk kvality standard či Q a pro tvorbu ceny): - celkový počet mikroorganismů (CPM); - počet somatických buněk (PSB); - rezidua inhibičních látek (RIL); - bod mrznutí mléka (BMM); - ostatní mikroorganismy pro kultivační metody; - obsah tuku; - obsah bílkovin; - obsah sušiny tukuprosté (STP). Z hlavních ukazatelů kvality mléka EU (CPM, PSB, RIL a BMM) zpravidla mohou ovlivnit cenu CPM, PSB a RIL. Pak, podle smluv farmářů s mlékárnami, jsou důležité obsahy tuku a zejména bílkovin a také prodáváný objem mléka. Tab. 1 uvádí vybrané limitní hodnoty kvality syrového mléka v ČR.

Tab. 1 vymezení limitů standardní kvality syrového kravského mléka podle jednotlivých mléčných ukazatelů (ČSN 57 0529, dnes jen informativní hodnota, harmonizováno s legislativou EU; SAMKOVÁ et al., 2012).

Ukazatel kvality mléka	Jednotka	Povolené limity	Poznámka
Obsah tuku	$\text{g} \times 100\text{ml}^{-1}$	$\geq 3,3$	$3,21 \text{ g} \times 100\text{g}^{-1}$
Obsah bílkovin	$\text{g} \times 100\text{ml}^{-1}$	$\geq 2,8$; základ zpeněžování 3,2	$2,72 \text{ g} \times 100\text{g}^{-1}$; základ zpeněžování 3,11
Bod mrznutí mléka	$^{\circ}\text{C}$	$\leq -0,515$	$-0,520 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (EU)
Titrační kyselost mléka	$\text{ml } (^{\circ}\text{SH})$	$6,2 - 7,8$	$0,25 \text{ mol} \times 100\text{ml}^{-1}$ NaOH
Počet somatických buněk	$10^3 \times \text{ml}^{-1}$	≤ 400	≤ 300 pro kvalitu výběr
Celkový počet mikroorganismů	$10^3 \times \text{ml}^{-1}$	≤ 100	≤ 50 pro kvalitu výběr
Rezidua inhibičních látek	/	negativní	mikrobiologický test, především antibiotika nebo jiná léčiva
Počet psychrotrofních mikroorganismů	$10^3 \times \text{ml}^{-1}$	≤ 50	kultivačně
Počet termorezistentních mikroorganismů	$10^3 \times \text{ml}^{-1}$	≤ 2	kultivačně
Počet koliformních bakterií	$10^3 \times \text{ml}^{-1}$	≤ 1	
Sporotvorné anaerobní bakterie	/	negativní	v 0,1 ml
Látkový obsah volných mastných	$\text{mmol} \times 100\text{g}^{-1}$	$\leq 1,3$	metoda stlukem

kyselin v mléčném tuku		≤ 3,2	metoda titrační
Mechanické nečistoty	/	stupeň II max.	ČSN 57 0530
Kysací schopnost mléka	ml (°SH)	≤ 25	0,25 mol×100ml ⁻¹ NaOH ON 57 0534
Obsah sušiny tukuprosté	g×100g ⁻¹	≥ 8,5	

Zpočátku byla hygienická kvalita mléka posuzována podle kvantity mechanických nečistot, zachycených na testovacím celulózovém filtru, pak se mléko dle dohody řadilo do tříd. Celkový počet mikroorganismů (CPM) v syrovém mléce indikuje podmínky hygieny ustájení, krmení a dojení krav stejně jako uložení mléka. Počet nad 100 tisíc KTJ (CFU) v 1 ml je problematický a musí být ve stáji řešen kontrolou hygienických podmínek, dezinfekcí a sanitací významných úseků technologie, nádob, zařízení a tak podobně. Celkový počet mezofilních mikroorganismů v syrovém mléce je stanoven metodou kultivace vzorku mléka nebo jeho ředění zaočkovaného do média s obsahem kaseinu, kvasničného extraktu, glukózy, agaru a sušeného mléka (např. GTK-M, Milcom Tábor) na Petriho miskách. Výsledkem je počet kolonií vyrostlých za aerobních podmínek při teplotě 30 °C po 3 dnech kultivace (ČSN EN ISO 4833). Snaha byla stanovovat počet mikroorganismů, ovšem náklady na kultivační metody byly vysoké a stanovení bylo časově náročné. Přesto byly v 80. letech zkonstruovány roboty pro provedení kultivačních metod (Spiral Plate Count), které snižovaly nároky na práci a urychlovaly a optimalizovaly (STAHLHUT KLIPP, 1977; ZAPOTOCKY et al., 1980; LACHOWSKY, 1984) odečet CPM na miskách automatizací optického postupu. Mezi tyto patřil např. Petrifoss (Foss Electric). Mezi tím, v 70. a 80. letech byl používán tzv. resazurinový test, kdy mléko bylo zařídováno podle odečtu intenzity barevné reakce, která koresponduje s mikrobiologickou zátěží, kdy test byl rychlý, nenákladný a poměrně spolehlivý. Sodná sůl resazurinu, modř, je redukčně přebarvována na červenou, metabolickou činností mikroorganismů tím intenzivněji, čím více je jich přítomno ve vzorku. Stupeň reakce lze odečítat fotometricky, ale i vizuálně. Ve stejné době (např. v Bavorsku - mléčné laboratoře Milchpruefring Bayern e. V.), v jiném testu, byl počet mikroorganismů v mléce fotometricky automatizovanou průtočnou metodou odhadován na základě pyruvátu (kyseliny pyrohroznové) tvořeného glykolytickou metabolickou činností mikroorganismů z glukózy (součást Krebsova cyklu). Poté, v 80. až 90. letech, již byly vyvíjeny opto-elektronické, automatizované metody stanovení mikroorganismů v mléce metodou průtočné cytometrie (FC; např. IBC a Bactocount - Bentley Instruments; Bactoscan - Foss Electric; HANUŠ et al., 2016 a, b), po barvení buněk akridinovou oranží (3-N,3-N,6-N,6-N-Tetramethylacridine-3,6-diamine), které zrychlily práci a svým výkonem snížily pracovní náklady. Nejdříve se specifickou enzymatickou hydrolyzou a centrifugací v gradientu (mechanicky) odstraní ze vzorku tukové kuličky a somatické buňky, aby nevytvářely interferenční efekty. Bakteriální buňka je za podmínek metody obarvena barvivem (nejčastěji akridinoranž). Buňka po osvětlení emituje specifické záření, které je osciloskopicky registrováno jako impuls, tedy mikrob. Proud vzorku teče v laminárním proudu pufovacích roztoků pod mikroskopem.

Výsledky elektronických bakteriálních impulsů se přepočítávají faktory nebo rovnicemi na výsledky kultivačních metod, tedy na počet mikroorganismů (kolonie formujících (tvořících) jednotek, KTJ) v 1 ml mléka. Pro syrové mléko bývají třeba specifické kalibrace na různé biologické druhy mléka (TOMÁŠKA et al., 2006). U těchto metod (které počítají světelné-elektronické impulsy v optickém (fluorescenčním) mikroskopu, po světelné, případně laserové excitaci, jako mikrobiální buňky) je někdy nezbytné stanovovat konverzní rovnice přepočtu z impulsů na CPM podle výsledků referenčních metod, zejména ve specifických lokalitách. Tyto metody byly déle vyvíjeny pro rozlišovací schopnost v nízkých počtech CPM pod 100 tisíc CFU v ml mléka (SUHREN et al., 1988, 2000, 2001; SUHREN a WALTERE, 1998, 2001; SUHREN a REICHMUTH, 2000; TOMÁŠKA a SUHREN, 2003, 2004; TOMÁŠKA et al., 2006; HANUŠ et al., 2016 a, b). Krátce se také v hodnocení kvality syrového mléka (CPM, ale hlavně koliformy, psychrotrofy a termorezistenty) objevila metoda statistického vyhodnocování růstových křivek impedanční, zrychlené, kultivační metody typu BacTrac (BANCALARI et al., 2016).

Počet somatických buněk (PSB) v mléce indikuje zdravotní stav dojnic s ohledem na výskyt mastitid (poruch sekrece mléka). Zdravá mléčná žláza má počet do 100 tisíc v ml mléka. 300 tisíc již může značit subklinickou mastitidu u zvířete, klinická má hodnotu i vyšší, až několik milionů. Hygienický limit EU a ČR je do 400 tisíc v ml mléka, ovšem ve světě je to někdy i více, do 750 tisíc v ml (některé státy USA). To značí ztráty na dojivosti krav v důsledku subklinických mastitid 10 až 20 %. PSB je zvyšován aktivitou patogenů v mléčné žláze, ale i stresem, stadiem a pořadím laktace. Metoda přímé mikroskopie PSB je metodou referenční (CSN EN ISO 13366–1). Buňky v určitém objemu mléka jsou za podmínek metody rozetřeny po definované ploše podložního sklíčka, fixovány organickými roztoky, vysušeny a obarveny organickými barvivy. Preparát pod optickým mikroskopem musí být počítán v mnoha oddělených zorných polích po ploše celého nátěru a také opakovaným vyšetřením (více nátěrů) pro určení referenční hodnoty vzorku. Osoba provádějící čítání somatických buněk musí být zkušená v cytologii a diferenciaci krevních a epiteliálních buněk pohledem podle jejich morfologických vlastností. Fluorooptoelektronická metoda průtočné cytometrie (CSN EN ISO 13366–2) pro stanovení počtu somatických buněk musí být kalibrována na výsledky referenční přímé mikroskopické metody (ČSN EN ISO 13366-1), i když sama metoda má charakter metody přímé. Je však automatizována (přístroje Somascope, Somacount, IBC nebo Fossomatic; Bentley Instruments a Foss Electric). Buněčné jádro je za podmínek metody obarveno barvivem (nejčastěji ethidiumbromid) a to, vázáno na desoxyribonukleovou kyselinu, po osvětlení emituje specifické záření, které je osciloskopicky registrováno jako impuls, tedy buňka. Proud vzorku teče v laminárním proudu pufrovacích kapalin pod mikroskopem. Předchozí modely z 80. let pracovaly s nekonečným filmem vzorku na obvodu rotujícího disku z nerezové oceli pod mikroskopem a osvětlení světlem v rámci viditelného spektra (zelená barva, emise impulsu byla červená). Výsledky jsou podobné přímé mikroskopii, možných interferenčních efektů je principiálně méně a mnohdy nejsou pro syrové mléko třeba ani specifické kalibrace na různé biologické druhy mléka. Existují i semikvantitativní odhady PSB na principu různých viskozimetrických metod, ovšem ty nejsou používány oficiálně ke kontrole kvality syrového mléka, nýbrž jen k posouzení zdravotního stavu mléčné žlázy jednotlivých krav.

Výskyt reziduí inhibičních látek (RIL) může ohrozit technologickou zpracovatelnost mléka (fermentační technologie), kvalitu mléčného potravinového řetězce a zdraví konzumenta (LEE et al., 2001; NEJESCHLEBOVÁ et al., 2022). Mléko antibioticky léčených krav v ochranné lhůtě nesmí být dodáváno do mlékárny (HASOŇOVÁ et al., 2022). Inhibiční látky za podmínek mikrobiologické metody blokují růst testovacího mikroorganismu, obvykle spóry *Geobacillus*

stearotherophilus varieta *calidolactis* v agaru. Tento je extrémně citlivý zejména na přítomnost betalaktamových antibiotik z léčiv (NAVRÁTILOVÁ, 2002; NAVRÁTILOVÁ et al., 2013, 2016; JUŠČÁKOVÁ a KOŽÁROVÁ, 2017; PAŽOUT et al., 2017). Před analýzou je třeba vzorky syrového mléka tepelně ošetřit při 85 °C k inaktivaci případně přítomných přirozených inhibičních látek, např. gamaglobulinů nebo fytoestrogenů. V mikroskopu s agarem a suspenzí spór, po přidání laktózy a vzorku mléka, je iniciováno klíčení spór a růst mikroorganismů jejich vložením do termostatu při 63 °C (3,5 hodiny). Během růstu je štěpena laktóza na kyselinu mléčnou (změna kyselosti pH) a růst tak mění původní barvu indikátoru. Změna (obvykle žlutá barva) znamená růst bakterií a tedy nepřítomnost reziduí inhibičních látek, zatímco neměnnost barvy (obvykle fialová) systému značí inhibici růstu (klíčení spór a růstu vegetativní formy) bakterie a přítomnost nějaké inhibiční látky. Změna barvy může být i redukční a jsou známy metody RIL, vedle mikrobiologických (plotnové metody) i enzymatické a ELISA. Nyní nejčastěji používané testy RIL jsou Delvotest, Eclipse, BR test, TwinSensor, MilkSafe™. Před těmito mikrodestičkovými mikrobiologickými testy, v 80. letech, byla pro odhad RIL v mléce používána také metoda stanovení kysací schopnosti mléka (jogurtový test; ON 57 0534). Pozitivní nález je třeba potvrdit opakovaným vyšetřením vzorku mléka. Tyto testy mají řadu modifikací. Pro určení skupiny případně podezřelých látek nebo identifikaci konkrétní podezřelé látky v případě pozitivního nálezu ve vzorku mléka je pak třeba provádět nákladnější chromatografické nebo elektroforetické postupy (CHRISTOFORIDOU et al., 2020).

Deprese bodu mrznutí mléka je určena hlavně koncentrací osmoticky aktivních složek v mléce. Těmi jsou zejména laktóza, obsah iontů anorganických (NaCl, KCl) a organických (fosfáty a citráty jako pufrací systém mléka) solí a koncentrace močoviny. Vliv dalších složek (tuk, bílkoviny) je pak malý. Bod mrznutí mléka (BMM) ovlivňuje zejména zdravotní stav (mastitidy), stadium a pořadí laktace a výživa a krmění dojnice. Hlavním vlivem však může být technologické zvodnění mléka (zhoršení, res. zvýšení). Proto je hodnota BMM používána k průkazu přídavku cizí vody a tím ke kontrole kvality mléčného potravinového řetězce. Kryoskopické metody (CryoStar, Gerber-Funke) jsou převážně používány jako přímé měření deprese bodu mrznutí mléka (ČSN 57 0538). V této metodě se jedná o nalezení plata na klesající křivce bodu mrznutí, po jejím krátkodobém vzrůstu při mechanicky iniciovaném uvolnění krystalizačního tepla a to pomocí snímání termistorovou sondou. Možné jsou i automatizované odhady metodou MIR-FT (MilkoScan, DairySpec, Bentley Instruments a Foss Electric) z látkového složení (regresní rovnice zejména se zohledněním obsahu laktózy) za použití hodnot elektrické konduktivity mléka.

Výsledky kvality syrového mléka v ČR nyní a v časové dynamice

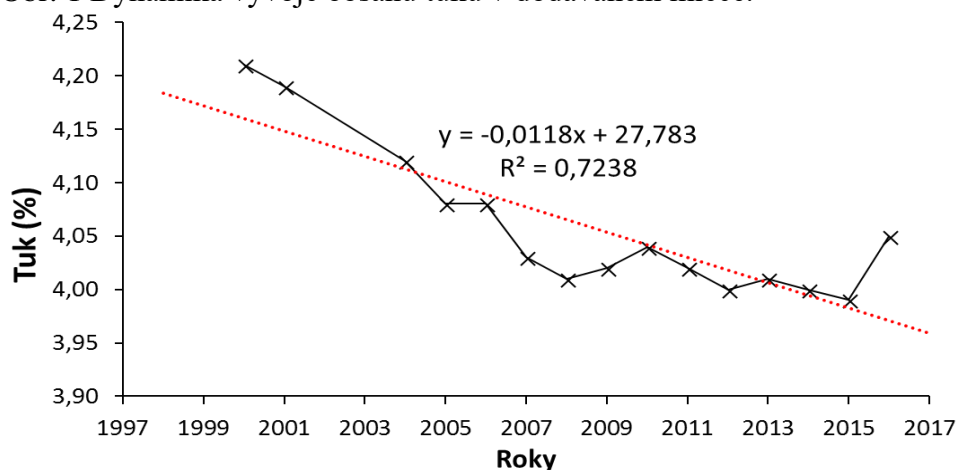
Výzkum hygienických ukazatelů syrového mléka je stále aktuální otázkou (AL-NOMAN et al., 2022; DEJYONG et al., 2022). Výsledky kvality mléka v ČR jsou v trendu zachyceny v Tab. 2 a na Obr. 1 – 14 (HANUŠ et al., 2019), včetně krátkého komentáře.

Tab. 2 Výsledky kvality syrového mléka v ČR v periodě 23 roků (ČMSCH a. s.; BUCEK, 2021; SLÁDEK, 2022)

Ukazatel	Jednotka	1997	2005	2016	2020
T	g/100ml/100g	4,27	4,08	4,05	4,01
B !	%	3,26	3,40	3,44	3,46 (3,50)
STP	%	8,82	8,84	8,96	9,04
M	mmol/l	3,16	3,83	4,29	3,7
BMM	°C	-0,521	-0,525	-0,526	-0,526
PSB	thousand/ml	237	256	223	230 (221)
CPM !	ths. CFU/ml	79	38	36,9	23,6
PTRB !	CFU/ml	1 275	872	140	-
PPM !	CFU/ml	21 220	8 500	8 040	9 140
KFB	CFU/ml	132	141	182	214
TRSB	% +	15,4	5,5	55,0	-
RIL !	% +	0,48	0,16	0,14	0,11 (0,06)

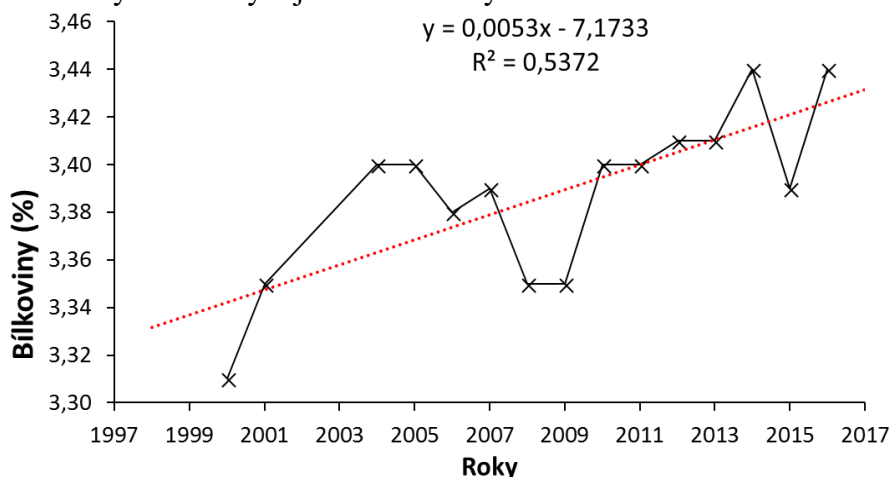
T, obsah tuku; B, obsah hrubých bílkovin; STP, obsah sušiny tukuprosté; M, koncentrace močoviny; BMM, bod mrznutí mléka; PSB, počet somatických buněk; CPM, celkový počet mezofilních mikroorganismů; PTRB, počet termorezistentních bakterií; PPM, počet psychrotrofních mikroorganismů; KFB, koliformní bakterie; TRSB, termorezistentní sportující bakterie; RIL, rezidua inhibičních látek; (v závorce nejlepší dosažené výsledky) ! = dlouhodobý trend výrazného zlepšování kvality syrového kravského mléka v ČR;

Obr. 1 Dynamika vývoje obsahu tuku v dodávaném mléce.



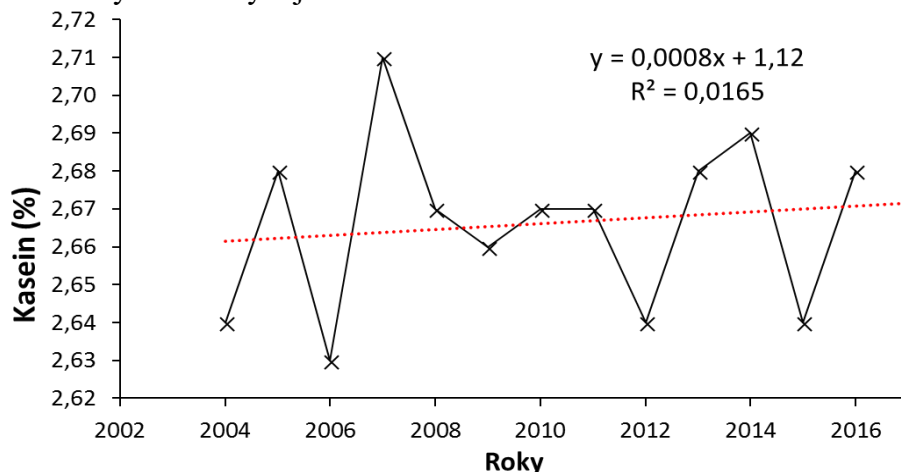
V roce 2000 byl obsah tuku 4,21 % a v roce 2016 4,05 %. S výrazně rostoucí dojivostí v průběhu času v důsledku šlechtění i měnící se výživy (zvyšování zastoupení jádra na úkor objemných krmiv) a také s oteplováním klimatu obsah tuku klesal ve významném trendu.

Obr. 2 Dynamika vývoje obsahu hrubých bílkovin v dodávaném mléce.



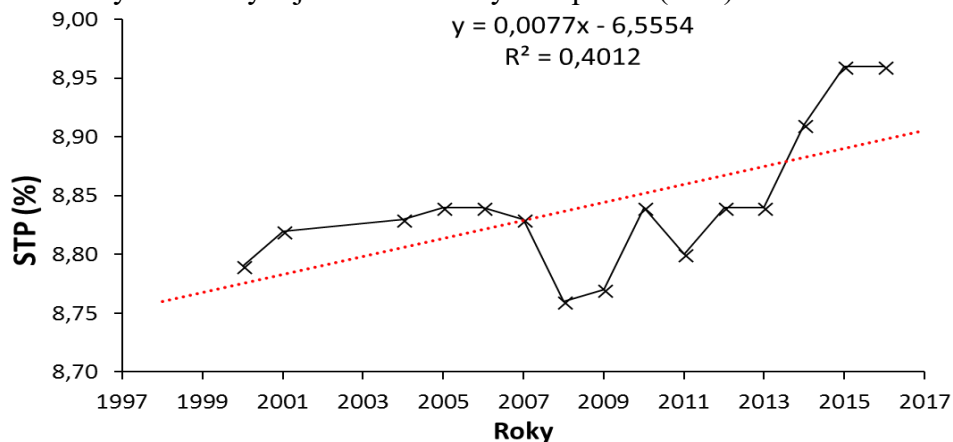
V roce 2000 byl obsah hrubých bílkovin 3,31 % a v roce 2016 3,44 %. Trend vzrůstu bílkovin může být dán šlechtěním a obecně růstem zastoupení energie v krmné dávce dojníc v důsledku zlepšování výživy.

Obr. 3 Dynamika vývoje obsahu kaseinu v dodávaném mléce.



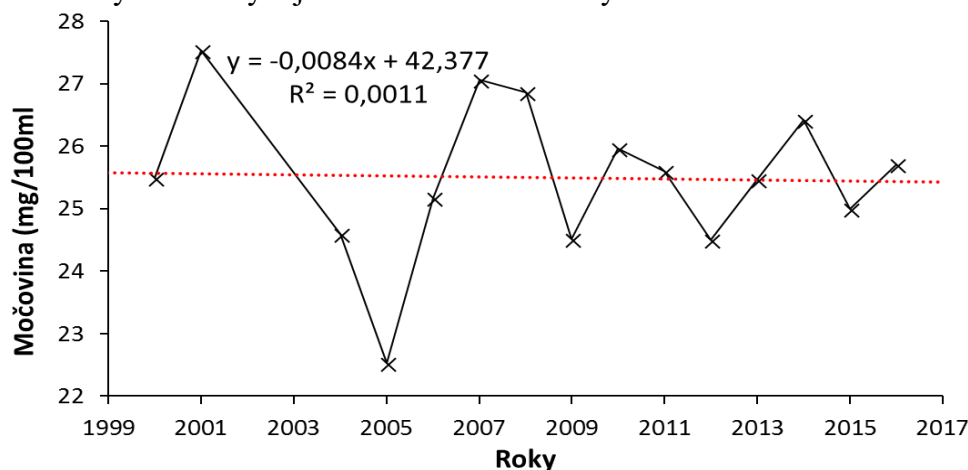
V roce 2004 byl obsah kaseinu 2,64 % a v roce 2016 2,68 %. Trend obsahu kaseinu přibližně kopíruje trend obsahu hrubých bílkovin.

Obr. 4 Dynamika vývoje obsahu sušiny tukuprosté (STP) v dodávaném mléce.



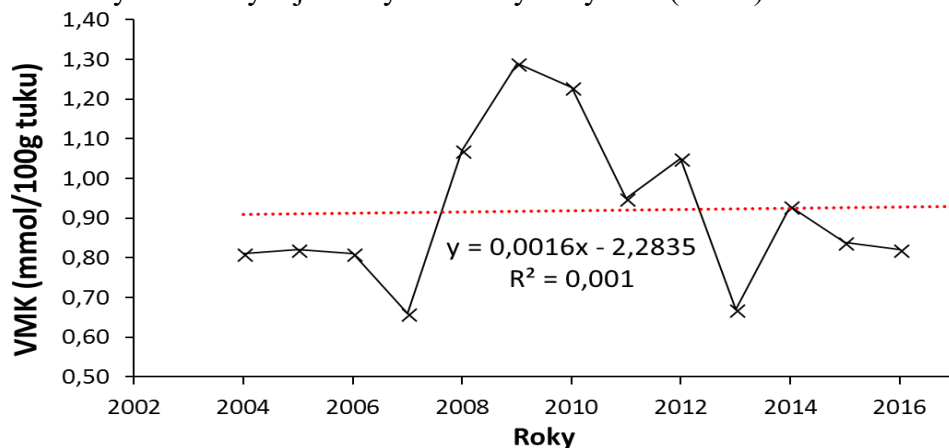
V roce 2000 byl obsah STP 8,79 %, v roce 2016 8,96 %. Obsah STP jde v trendu změn v obsahu hrubých bílkovin a laktózy. Jako důsledek šlechtění a lepší se výživy naznačuje rostoucí technologickou kvalitou mléka.

Obr. 5 Dynamika vývoje koncentrace močoviny v dodávaném mléce.



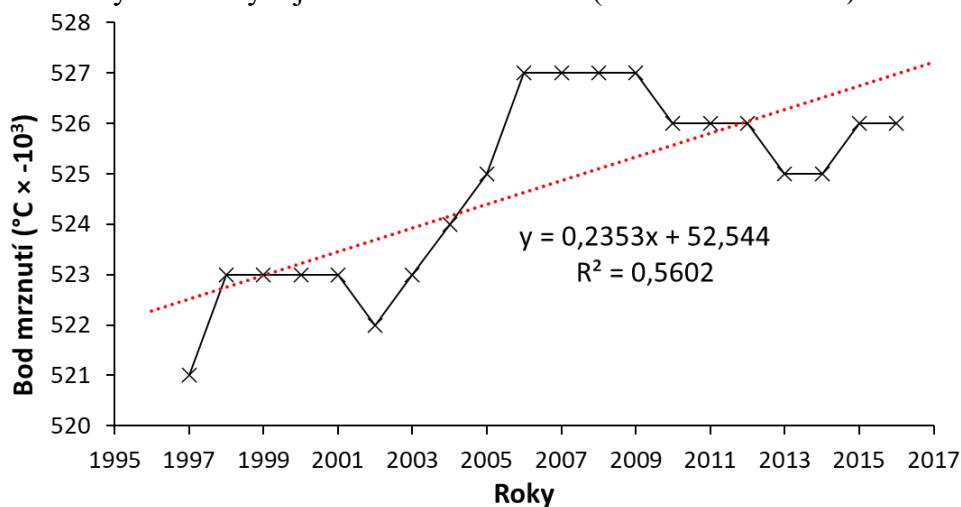
V roce 2000 byla močovina 25,5 a v roce 2016 25,71 mg/100ml.

Obr. 6 Dynamika vývoje volných mastných kyselin (VMK) v dodávaném mléce.



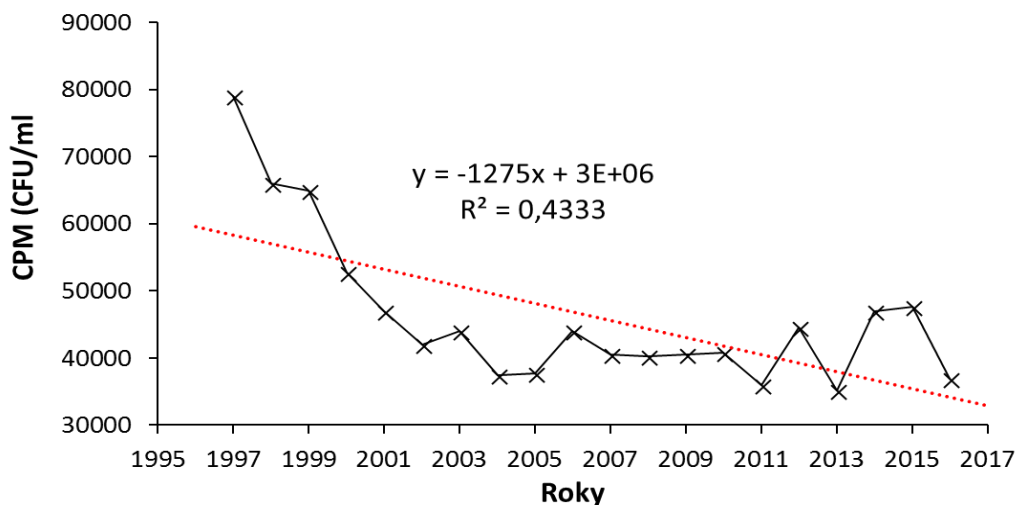
V roce 2004 byl obsah VMK 0,81 v roce 2016 0,82 mmol/100g tuku.

Obr. 7 Dynamika vývoje bodu mrznutí mléka (BMM ve °C × -10³) v dodávaném mléce.



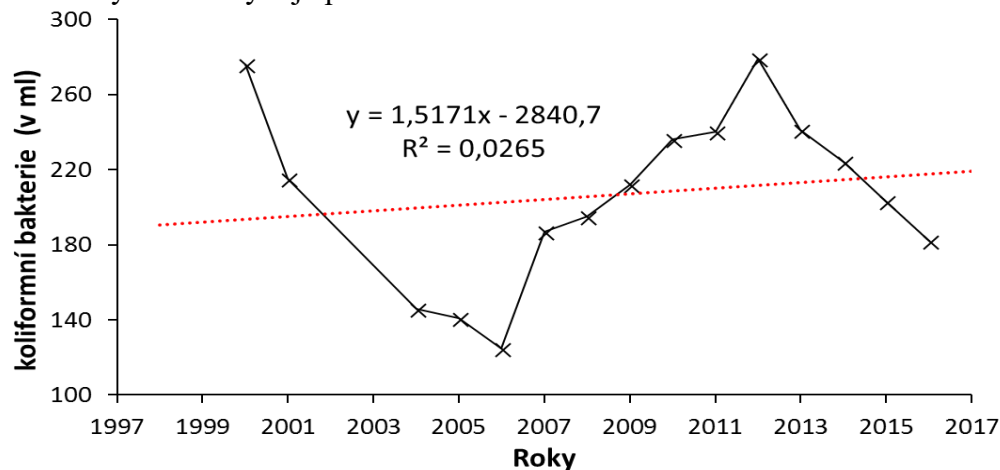
Zlepšení bylo o 0,77 % (resp. 0,004 °C) za posledních 9 roků. V roce 1997 byl BMM 521, v roce 2016 pak 526 (°C × -10³). Vývoj ukazatele je principiálně v souladu s trendem obsahu sušiny tukuprosté.

Obr. 8 Dynamika vývoje celkového počtu mikroorganismů (CPM (CFU/ml)) v dodávaném mléce.



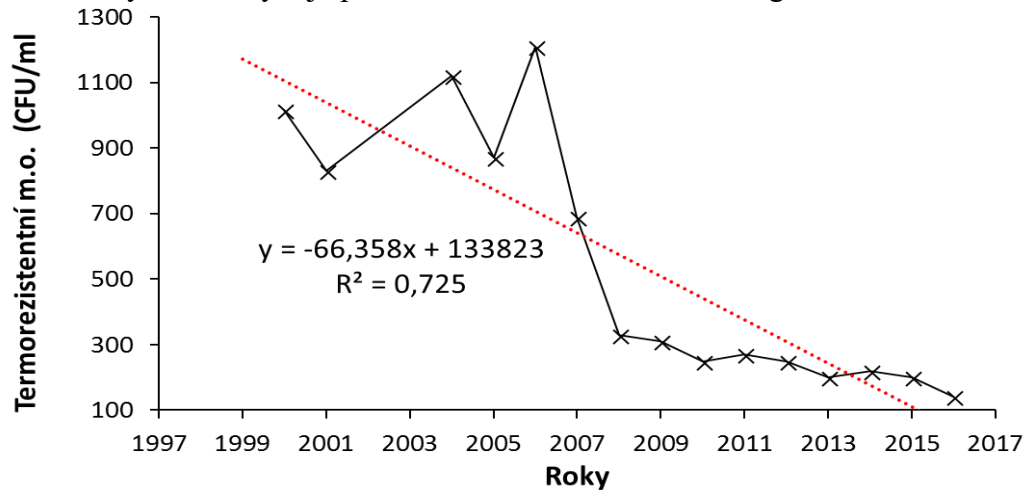
Zlepšení v CPM dosáhlo 53,4 % (z 79,1 na 36,9 tis. CFU/ml). Jasný doklad lepší se hygieny technologických procesů v chovu dojníc, zejména při dojení.

Obr. 9 Dynamika vývoje počtu koliformních bakterií v dodávaném mléce.



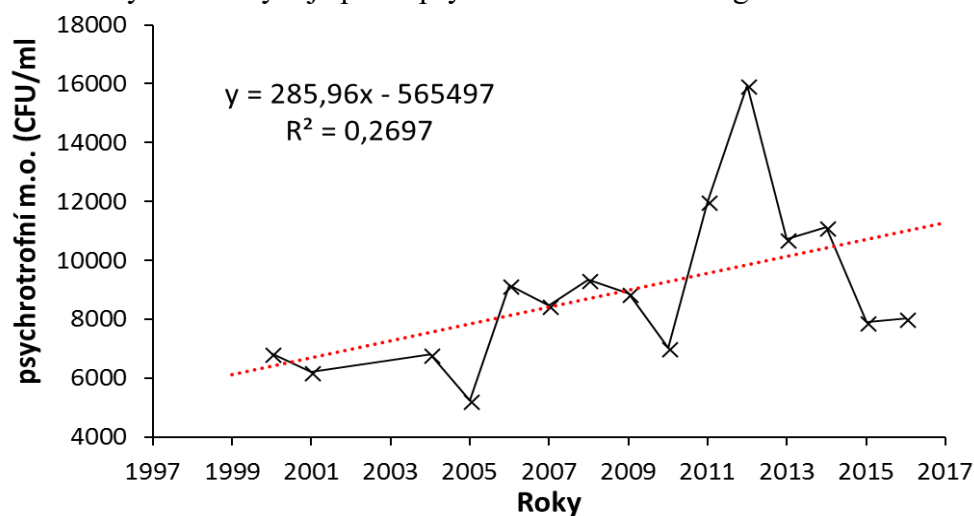
V roce 2000 byl počet koliformů 276, v roce 2016 182 v 1 ml mléka.

Obr. 10 Dynamika vývoje počtu termorezistentních mikroorganismů v dodávaném mléce.



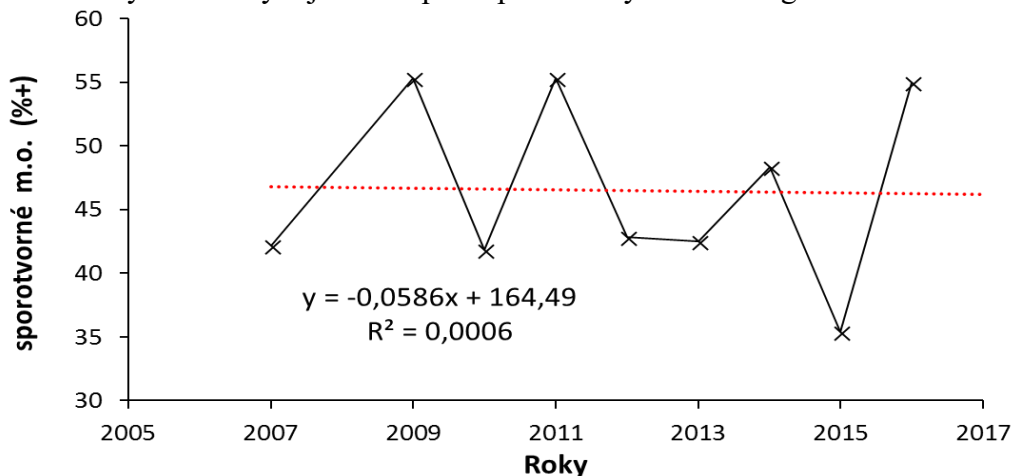
V roce 2000 byl počet termorezistentů 1 016, v roce 2016 140 CFU/ml.

Obr. 11 Dynamika vývoje počtu psychrotrofních mikroorganismů v dodávaném mléce.



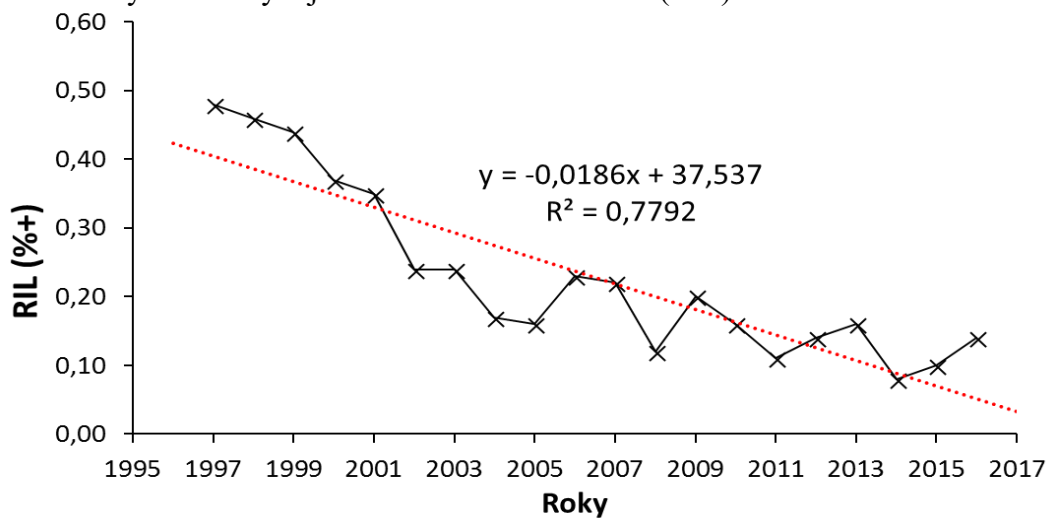
V roce 2000 byl počet psychrotrofů 6 847, v roce 2016 8 040 CFU/ml.

Obr. 12 Dynamika vývoje zastoupení sporotvorných mikroorganismů v dodávaném mléce.



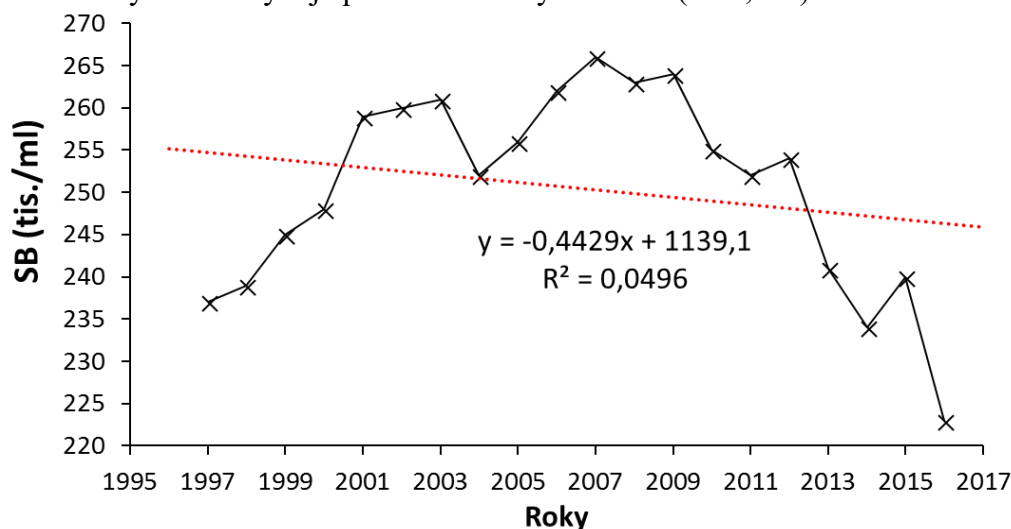
V roce 2007 bylo zastoupení sporulátů 42,18, v roce 2016 55 %+.

Obr. 13 Dynamika vývoje reziduí inhibičních látek (RIL) v dodávaném mléce.



Zlepšení v RIL dosáhlo 70,8 % (z 0,48 na 0,14 %). Doklad zvládnutí technologie kontroly výskytu reziduí léčiv a dalších případně škodlivých látek v mléce.

Obr. 14 Dynamika vývoje počtu somatických buněk (PSB, SB) v dodávaném mléce



Horšil se jen PSB z 237 tis./ml 1997 na 259 tis./ml 2001-2 a 252 tis./ml 2005, o 8,0 %. V roce 2016 byl PSB 223 tis./ml. Od roku 2010 je zřejmý trend zlepšení.

Podstata komplexnosti laboratorní kontroly kvality syrového mléka ve vyspělých zemích

Jak plyne z předchozího hodnocení vývoje ukazatelů kvality syrového mléka, je zřejmé, že syrové mléko je nejdůsledněji kontrolovaným počátkem mléčného potravinového řetězce ze všech ostatních možných potravin, jak v ČR tak EU a zřejmě i celosvětově. Je to možné konstatovat proto, že je zohledněno (-na; -něn): - široké spektrum a relativně vysoký počet vyšetřovaných hygienických (mikrobiologických), složkových (chemických), fyzikálních a technologických mléčných ukazatelů; - pravidelnost a relativně vysoká frekvence zmíněných rutinních vyšetření syrového mléka; - převážně biologický a biochemický charakter těchto vyšetření, kde principem je posoudit bezpečnost kontrolovaného materiálu pro konzumenty (např. sledování reziduí inhibičních látek a eliminace takového mléka z potravního řetězce s předpokladem, že substance schopná poškodit mikrobiální růst může být potenciálně riziková i pro vývojově vyšší živočichy - konzumenty).

Analytické laboratoře obecně, tedy i mléčné, zejména, jsou-li akreditovány, tedy pokud tím usilují o oficiální uznávání svých výsledků, musejí své metodické postupy obhajovat u odborného auditu zpracovaným systémem zabezpečení kvality výsledků analýz, jehož součástí jsou standardní operační postupy a validace metodických postupů s odhadem nejistot výsledků měření. Použité postupy tak musí být přesně popsány a validovány prostřednictvím výsledků účelově provedených testů se statistickým vyhodnocením. Proto dává smysl popsat možné vlivy azidiolové konzervace na výsledky analýz vzorků mléka také z oficiálních důvodů.

Pro rutinní, komerční, mléčné laboratoře znamená obecně nezbytná aplikace chemické konzervace vzorků mléka z důvodu zachování jeho vlastností během transportu až do okamžiku analýzy, v postupných krocích, vždy testové řešení logistického problému s nevhodnější přijatelnou možností kombinace četných faktorů, jako: - účinnost konzervace podle typu a koncentrace konzervující látky, času a teploty uložení a transportu vzorků; - šetrnost konzervace k životnímu prostředí (také zdraví laboratorního personálu); - pracnost konzervace; - snadnost aplikace (forma roztoku, prášku, tablet) a manipulovatelnosti; - náklady na konzervaci; - případně některé další specifické aspekty.

2) Cíl metodiky testu vlivu konzervace bazénových vzorků mléka v kontrole kvality

Cílem metodiky je, na základě výsledků provedených testů, kvantifikovat a případně eliminovat možný azidiolový, interferenční vliv konzervace vzorků mléka na výsledky vybraných referenčních a rutinních mlékařských analytických metod, v běžné laboratorní technologii, podle standardních operačních postupů. Spolehlivá kontrola nad stavem vzorků mléka je významná zejména pro věrohodnost stanovení CPM, RIL, PSB a BMM.

3) Metodika, výsledky a jejich vyhodnocení při ověření vlivu azidiolové konzervace vzorků mléka na výsledky vybraných, referenčních a rutinních mlékařských analýz

Při práci byly zohledněny:

- relevantní standardní dokumenty ČSN 57 0530, ČSN 57 0536, ČSN EN ISO/IEC 17025, ČSN ISO 8196-1, ČSN ISO 8196-2, ČSN ISO 8196-3, ČSN EN ISO 13366-1, ČSN EN ISO 13366-2, ČSN EN ISO 4833-1 (2014), ČSN EN ISO 707 (2009), ČSN EN ISO 7218 (2008), GRAPPIN, 1987;
- ustanovení relevantních akreditovaných standardních operačních postupů;
- návody k obsluze výrobců analytických zařízení a laboratorních testů.

Azidiol, jako konzervace vzorků mléka v LRM byl používán dříve, ale nyní jde o nový požadavek z hlediska komerce s dodávkou rutinních vzorků ze zahraničí, což vyžaduje aktuální metodické ověření a zapracování do systému jakosti při akreditaci po validaci postupu (jako zpracování příloh relevantních standardních operačních postupů (SOP), pro audit akreditace) a ověření případného vlivu na výsledky analýz kvality mléka. Zmíněné testování nemá proto výzkumné ambice charakteru optimalizace postupu pro výběr variant (konzervace, koncentrace, teplota, čas), nýbrž validaci výsledků přesně podle praktických pracovních podmínek postupů a SOP LRM Brno-Tuřany. Výsledky jsou tak určeny k praktické aplikaci pro účely obhajoby auditu akreditace LRM ve věci validovaných SOP. Z hlediska LRM se tedy jedná o metodickou podporu výsledků analýz kontroly kvality mléka (bazénové vzorky mléka).

Aktuálně LRM stanovuje v bazénových vzorcích celkové složení (T, B, STP), PSB a BMM v nekonzervovaném mléce po chladovém transportu, CPM a RIL stanovuje ve vzorcích konzervovaných Heeschenovým činidlem. Proto tyto varianty jsou v testu vzaty jako referenční při srovnávání proti konzervaci Azidiolem. Použití konzervace – komerční roztok Azidiol (pracovní koncentrace 150 µl na 50 ml mléka), případně v porovnání k Heeschenovu činidlu (pracovní koncentrace 6 ml (vysoušeno ve vzorkovnici) na 50 ml mléka).

Testovací soubor a jeho analýza

Testovací soubor pro posouzení vhodnosti konzervace mléka Azidiolem tvořily vzorky bazénového mléka dojníc plemen Holštýn a Czech Fleckvieh z komerční kontroly kvality mléka, které byly po chladovém transportu (≤ 8 °C) analyzovány nekonzervované, konzervované Heeschenovým činidlem a konzervované Azidiolem. Podle podmínek transportu do dané laboratoře byly vzorky měřeny cca 24 ± 6 hodin po odběru a případné konzervaci. Všechna měření byla provedena duplicitně s výjimkou BMM, který byl stanovován u každého vzorku jen jednou.

Metody použité pro stanovení parametrů mléka

- obsah T (%); B (%); KAS (%); L (%); STP (%); TS (%), M ($\text{mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$); VMK ($\text{mmol} \times 100 \text{g}^{-1}$ v tuku); KC (%), EBMM ($^{\circ}\text{C} \times -10^3$) na MIR-FT analyzátoch MilkoScan 7 (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dánsko) a DairySpec FT (Bentley Instruments, USA);
- BMM ($^{\circ}\text{C} \times -10^4$) referenčně na kryoskopu CryoStar I (Funke-Dr.N.Gerber Labortechnik GmbH, Berlin, Německo);
- PSB ($10^3 \times \text{ml}^{-1}$) fluoro-opto-elektronickou metodou na průtokových cytometrech Fossomatic 7 (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dánsko) a Somacount 300 (Bentley Instruments, USA).
- CPM ($v 10^3 \text{ CFU} \times \text{ml}^{-1}$) přímým počítáním bakteriálních buněk průtokovým cytometrem BactoScan FC (Foss Analytical A/S, Hillerød, Dánsko) s následujícím přepočtem relevantní konverzní rovnicí na jednotky $\text{KTJ} \times \text{ml}^{-1}$ podle referenční kultivační metody dle ČSN EN ISO 4833-1 (2014);
- Počet KFB ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$) kultivací při 30°C po dobu 24 hodin se zalitím agarovou živnou půdou VČŽL (agar s krystalovou violetí, neutrální červení, žlučovými solemi; Milcom Tábor) dle ČSN ISO 4832 (2010)
- přítomnost RIL v mléce komerčními mikrobiologickými širokospektrálními testy Eclipse 50 a Eclipse 4 G (Zeulab, Zaragoza, Španělsko), které jsou založeny na inhibici růstu spor bakterie *Geobacillus stearothermophilus*. Testy byly hodnoceny jako pozitivní a negativní na přítomnost RIL.

Výsledky vlivu konzervace mléka Azidiolem na sledované parametry mléka

Na základě provedeného statistického hodnocení (Tab. 3) byl posouzen vliv konzervace Azidiolu na stanovení jednotlivých parametrů mléka danými metodami. Kompletní výsledky tvoří tabulkovou a grafickou přílohu této certifikované metodiky.

Složení

Parametry složení mléka v mléce konzervovaném Azidiolem a nekonzervovaném mléce stanovované MIR-FT metodou spolu významně korelovaly. Systematické odchylky byly většinou významné, avšak stabilní, a z hlediska relativního podílu na měřených hodnotách zcela zanedbatelné (obvykle pod 1 %) pro základní složky (T, B, Kas., L, STP, TS) a přijatelné (obvykle pod 5 %) pro minoritní složky mléka (M, VMK, KC).

Deprese bodu mrznutí mléka, ekvivalent bodu mrznutí mléka

- BMM i EBMM v mléce konzervovaném Azidiolem a nekonzervovaném mléce vykázaly významné korelace a významné, avšak zanedbatelné a relativně stabilní systematické odchylky (pod 1,5 %).

Počet somatických buněk

- PSB v mléce konzervovaném Azidiolem a nekonzervovaném mléce významně korelovaly a poskytly významné relativně stabilní systematické odchylky, které byly ale zcela zanedbatelné (1,4 % Fossomatic) nebo přijatelné (7,2 % Somacount).

Celkový počet mikroorganismů

- CPM v mléce konzervovaném Azidiolem a konzervovaném Heeschenovým činidlem poskytly významnou korelaci a nevýznamnou systematickou odchylku (0,03 %), která byla stabilní.

Počet koliformních bakterií

- Počet KFB v mléce konzervovaném Azidiolem významně koreloval s počtem KFB v mléce konzervovaném Heeschenovým činidlem, jednalo se však o nejméně těsnou závislost ze všech hodnocených parametrů. Značná systematická odchylka (63,3 %) byla navíc nestabilní. Kolonie koliformních bakterií ze vzorků mléka ošetřených Azidiolem se v některých vzorcích lišily od typického vzhledu kolonií koliformních bakterií, byly bledší fialové barvy a menší velikosti.

Rezidua inhibičních látek

- Test Eclipse 50 poskytl 100 % správně negativních výsledků a 100 % správně pozitivních výsledků při konzervaci Azidiolem i Heeschenovým činidlem. Doplnkově provedené stanovení RIL testem Eclipse 4G poskytlo 68 % správně negativních výsledků a 100 % správně pozitivních výsledků.

Doporučení pro konzervaci vzorků mléka Azidiolem

Na základě získaných výsledků lze formulovat následující doporučení pro konzervaci mléka Azidiolem:

- Azidiol lze doporučit ke konzervaci mléka pro stanovení:
 - složení mléka a EBMM metodou MIR-FT s využitím analyzátorů MilkoScan 7 a DairySpec FT,
 - BMM kryoskopickou metodou,
 - PSB průtokovou cytometrií s využitím přístrojů Fossomatic 7 a Somacount 300,
 - CPM metodou průtokové cytometrie s využitím přístroje BactoScan FC,
 - RIL testem Eclipse 50.
- Výše uvedená doporučení jsou platná pouze pro popsání podmínky testování. Překročení časových a teplotních limitů či použití odlišné koncentrace konzervantu by mohlo negativně ovlivnit výsledky stanovovaných mléčných parametrů.
- Pro eliminaci případného interferenčního efektu konzervantu je pro nepřímé měření mléčných ukazatelů vhodné provádět kalibrace mlékařské analytické techniky přímo s takto konzervovanými vzorky.
- Při stanovení RIL v konzervovaných vzorcích je vhodné kontrolní vzorky ošetřovat stejným způsobem jako testované vzorky a použití konzervantu pro konkrétní inhibiční test konzultovat s výrobcem.

Tab. 3 Statistické vyhodnocení vlivu konzervace vzorků mléka Azidiolom na výsledky měřených mléčných ukazatelů.

Metoda	Zařízení	Test	Ref.	Ukazatel	n	$\bar{x} \pm s_x$	v_x	$\bar{x} \pm s_x$	v_x	$d \pm s_d$	d sig.	D	r
						Test (y)	%	Ref. (x)	%	Test. – Ref.		%	
MIR-FT	MilkoScan 7	AZ	NEK	T	60	4,07 ± 0,39	9,5	4,09 ± 0,39	9,6	-0,019 ± 0,012	P < 0,001	0,46	1,0
				B	60	3,51 ± 0,21	6,0	3,51 ± 0,21	6,0	-0,003 ± 0,009	P < 0,05	0,09	0,999
				KAS	60	2,75 ± 0,17	6,1	2,77 ± 0,17	6,2	-0,016 ± 0,01	P < 0,001	0,58	0,999
				L	60	4,85 ± 0,11	2,2	4,87 ± 0,1	2,1	-0,02 ± 0,006	P < 0,001	0,41	0,998
				STP	60	9,07 ± 0,21	2,3	9,1 ± 0,21	2,3	-0,023 ± 0,011	P < 0,001	0,25	0,999
				M	60	25,87 ± 5,86	22,6	24,95 ± 5,73	23,0	0,927 ± 0,943	P < 0,001	3,72	0,987
				VMK	60	1,02 ± 0,25	24,6	0,98 ± 0,25	25,8	0,04 ± 0,056	P < 0,001	4,08	0,975
				KC	60	0,12 ± 0,009	7,5	0,111 ± 0,009	8,1	0,009 ± 0,001	P < 0,001	8,1	0,988
				EBMM	106	527 ± 10	1,9	521 ± 10	1,9	5,83 ± 2,38	P < 0,001	1,12	0,969
MIR-FT	DairySpec FT	AZ	NEK	T	60	4,17 ± 0,9	21,6	4,19 ± 0,91	21,7	-0,021 ± 0,015	P < 0,001	0,5	1,0
				B	60	3,46 ± 0,2	5,7	3,45 ± 0,2	5,8	0,008 ± 0,011	P < 0,001	0,23	0,998
				KAS	60	2,7 ± 0,25	9,2	2,68 ± 0,26	9,6	0,025 ± 0,034	P < 0,001	0,93	0,991
				L	60	4,84 ± 0,16	3,3	4,85 ± 0,16	3,3	-0,006 ± 0,01	P < 0,001	0,12	0,998
				STP	60	9,01 ± 0,21	2,3	9,0 ± 0,21	2,4	0,016 ± 0,024	P < 0,001	0,18	0,994
				TS	60	13,81 ± 0,87	6,3	13,82 ± 0,88	6,4	-0,016 ± 0,022	P < 0,001	0,12	1,0
				M	60	22,12 ± 7,47	33,8	23,15 ± 7,48	32,3	-1,036 ± 0,687	P < 0,001	4,47	0,996
				VMK	60	0,39 ± 0,05	11,6	0,39 ± 0,04	10,8	-0,001 ± 0,01	P > 0,05	0,26	0,977
				KC	60	0,198 ± 0,023	11,6	0,195 ± 0,024	12,3	0,003 ± 0,005	P < 0,001	1,54	0,977
				EBMM	60	520,39 ± 7,67	1,5	516,41 ± 8,02	1,5	3,98 ± 1,73	P < 0,001	0,77	0,977
KRYO	CryoStar I	AZ	NEK	BMM	106	5 340 ± 101	1,9	5 269 ± 110	2,1	72 ± 40	P < 0,001	1,37	0,931
FC	Fossomatic 7	AZ	NEK	PSB	60	217 ± 130	59,9	220 ± 132	60,0	-3 ± 7	P < 0,01	1,4	0,999
FC	Somacount 300	AZ	NEK	PSB	60	246 ± 188	76,4	264 ± 188	71,2	-19 ± 38	P < 0,001	7,2	0,979
FC	BactoScan	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
Kultivačně při 30 °C	-	AZ	HE	Počet KFB	26	214 ± 431	201,6	584 ± 1 498	256,5	-370 ± 1 181	P > 0,05	63,3	0,801

Všechny korelační koeficienty $r = P < 0,001$ (v přílohách ***); Ref. = reference; n = počet případů; \bar{x} = aritmetický průměr; s_x = směrodatná odchylka průměru; v_x = variační koeficient; d = průměrná diference; s_d = směrodatná odchylka průměrné diference; sig. = významnost; D = absolutní hodnota relativní diference (100 % = Ref.); r = koeficient korelace; x a y = osy lineární regrese; MIR-FT = infračervená spektroskopie ve středové oblasti s Michelsonovým interferometrem a Fourierovou transformací; FC = průtočná cytometrie; KRYO = kryoskop; AZ = Azidiol; HE = Heeschonovo činidlo; NEK = nekonzervované; T = obsah tuku v mléce (%); B = obsah hrubých bílkovin (%); KAS = obsah kaseinu (%); L = obsah monohydrátu laktózy (%); STP = obsah sušiny tukuprosté (%); TS = obsah sušiny celkové (%); M = koncentrace močoviny ($\text{mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$); VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku ($\text{mmol} \times 100 \text{ g}^{-1}$ tuku); KC = koncentrace kyseliny citronové (%); EBMM = ekvivalent bodu mrznutí mléka ($^{\circ}\text{C} \times -10^3$); BMM = deprese bodu mrznutí mléka ($^{\circ}\text{C} \times -10^4$); PSB = počet somatických buněk ($10^3 \times \text{ml}^{-1}$); CPM = celkový počet mezofilních mikroorganismů ($10^3 \text{ CFU} \times \text{ml}^{-1}$); Počet KFB = počet koliformních bakterií ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$).

4) Závěr certifikované metodiky ověření vlivu azidiolové konzervace vzorků mléka na výsledky vybraných, referenčních a rutinních mlékařských analýz

Vhodně zvolená chemická konzervace umožňuje zachovat původní vlastnosti vzorku bez významného interferenčního vlivu na prováděné analýzy a použití takové konzervace je v rutinních mléčných laboratořích většinou nutné.

Byla provedena analýza vzorků mléka konzervovaných Azidiolem a referenčních vzorků podle praktických pracovních podmínek postupů a SOP LRM Brno-Tuřany pro analýzy kontroly kvality. Na základě provedených laboratorních stanovení a jejich statistického vyhodnocení byla posuzována vhodnost použití Azidiolu ke konzervaci vzorků mléka. Výsledky statistického hodnocení ukázaly vhodnost Azidiolu pro konzervaci mléka ke stanovení všech parametrů významných z hlediska zpeněžování (T, B, K, L, STP, TS, PSB, CPM, RIL testem Eclipse 50, BMM, EBMM (vše uvedenými metodami)) i většiny ostatních parametrů (M, VMK, KC (vše uvedenými metodami)) majících spíše informativní význam. Jako nevhodný se Azidiol ukázal pouze ke konzervaci mléka pro stanovení počtu KFB (kultivačně) a přítomnosti RIL testem Eclipse 4. Uvedené ukázalo, že použití konzervantů může být problematické především pro konzervaci vzorků určených k mikrobiologickým analýzám, a potvrdilo tak důležitost validace tohoto technologického aspektu analýz kvality mléka.

III) Srovnání „novosti postupů“ a předání certifikované metodiky: Eliminace azidiolového vlivu konzervace vzorků mléka na výsledky referenčních a rutinních mlékařských analytických metod

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání systému kontroly laboratorní práce v mléčné laboratoři (LRM) KKM ČMSCH a. s. v elektronické i písemné formě 28. 4. 2023;
- jedná se o inovovaný a validovaný postup kontroly výsledků po aplikaci nového typu konzervace vzorků mléka v systému kontroly kvality analýz v systému rutinní laboratoře KKM pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků, efektivity cenotvorby mléka a prevence hygienických problémů v produkci mléčných potravin. Výsledky jsou jednak rozšířením dosavadních poznatků (kvalita konzervace bazénových vzorků mléka v KKM) a dále uvedením známých poznatků v nových souvislostech rozšíření portfolia činnosti laboratoře;
- vývoj postupu a metody kontroly podmínek konzervace bazénových vzorků mléka v KKM je zajištěn vlastními konkrétními výsledky laboratorního testování. Vyhodnocením těchto výsledků a sestavením návrhů vznikl postup, který je metodickým podkladem pro laboratoře KKM pro zajištění kvality analytických výsledků a auditu relevantních akreditačních orgánů v oblasti analýz mléka;
- uvedené postupy ověření a podpory spolehlivosti dat analýz mléka jsou již používány v souvislosti s vývojem situace kolem KKM a až doposud byly v podstatě dílčím způsobem řešeny, ale za jiných podmínek, než zde uvedených.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky - Závěr - Kontrola uplatnění certifikované metodiky:

- kontrola existence certifikované metodiky jako pracovního postupu v KKM pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků, efektivity tvorby ceny syrového mléka a prevence hygienických problémů mléčných potravin;
- kontrola aplikace certifikované metodiky je proveditelná prostřednictvím revize dokladů o provádění analýz v procesu KKM v LRM Brno-Tuřany v ČR a revize dokladů workshopů k zlepšování kvalifikace odborného laboratorního personálu (programy, PP-prezentace a jejich písemné poznámkové verze, prezenční listiny, personální certifikáty o absolvování) prostřednictvím organizace ČMSCH a.s. Hradištko;
- certifikovaná metodika postupu kontroly pro podporu věrohodnosti získávaných analytických výsledků v KKM, cenotvorby mléka a prevence hygienických problémů v potravinářství a pro účely auditu akreditace byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště LRM Brno-Tuřany ČMSCH a. s. a do knihovny a na pracoviště Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. Praha a informace o ní na MZe a do RIV.

V) Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad je součástí kontroly kvality mléka (KKM) a využití výsledků v tvorbě ceny mléka a prevenci hygienických problémů mléčných potravin. Tuto činnost lze efektivně realizovat pouze na základě spolehlivých výsledků analýz. Vyvinutý a testovaný postup podporuje tuto spolehlivost analytických výsledků KKM. Na bázi preventivní podpory kvality a hygieny mléčných potravin může tvořit podíl do 3 % v celém segmentu. Uvedené je dáno redukcí běžných nedostatků způsobených případnou chybnou informací v KKM. Objem případných ztrát z chyb v KKM je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji. Na úrovni státu, při daném rozsahu a vlivu KKM, může ročně přínos z redukce ztráty efektivity chybami činit částky v řádu statisíců.

Náklady na konkrétní zavedení a využití postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele ČMSCH a. s. činit podle kvalifikovaného odhadu v KU celkem 38 tis. Kč jednorázově (náklady na vyhodnocení vlivů konzervace na věrohodnost analytických výsledků). Přínos pro uživatele (ČMSCH a. s.) je v podpoře spolehlivosti postupu kontroly režimu KKM a kvalifikace laboratorního personálu. Tento lze na nepřímých efektech kvalifikovaně odhadnout na 85 tis. Kč ročně při redukcí chybovosti výsledků analýz a prevenci případných sporných jednání. Tento efekt je opakovatelný po rocích. Dalším konkrétním přínosem je úspora spotřeby elektrické energie (sterilizační sušárny s velkým příkonem a jejich mnohahodinový provoz) a relevantní laboratorní práce v LRM související s použitím předešlého konzervans v mikrobiologii (Heeschenovo činidlo), které vyžaduje dávkování a vysoušení většího objemu (6 – 8 ml na vzorkovnici) činidla v preparovaných vzorkovnicích pro analýzy KKM. Tato činnost u alternativní konzervace Azidiolem odpadá. Za podmínek LRM lze tento přínos odhadnout na 4 200 Kč měsíčně, tedy 50 400 Kč ročně, přičemž tento přínos je po rocích opakovatelný. Uvedené může přispět k redukcí nákladů na provoz KKM.

VI) Seznam použité související literatury

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

- AL-NOMAN, K.- PARVEJ, M.- RAHMAN, A.- SALAUDDIN, M.- MIA, M.- UDDIN, A. M.- ZEREEN, F.: Public Health and Hygienic Aspects of Milk and Dairy Products: A Review. *Advances*, 3, 3, 2022, 95-103. <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/advances> doi: 10.11648/j.advances.20220303.18
- ANONYM: Use of sodium azide for the preservation of milk samples for fat and protein determination with Milko-Scan. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 29, 1977, 910-911.
- ARDÖ, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, 34, 1979, 1, 14-16.
- ARDÖ, Y.: Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using Fossomatic. *Milchwissenschaft*, 37, 1982, 139-142.
- BANCALARI, E.- BERNINI, V.- BOTTARI, B.- NEVIANI, E.- GATTI, M.: Application of impedance microbiology for evaluating potential acidifying performances of starter lactic acid bacteria to employ in milk transformation. *Frontiers in Microbiology*, Food microbiology, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01628>
- BAUMGARTNER, CH. und Expertengruppe für Qualitätssicherung und Qualitätsmanagement: Qualitäts 2000. Leitfaden für den Betrieb von Routine – Untersuchungsgeräten in Rohmilch – Prüfungslaboratorien, 1. Ausgabe, Oktober 2000: 32.
- BAUMGARTNER, C.- LANDGRAF, A.: Deep frozen raw milk standards – The way from reference methods to reference system. 34th ICAR Session, May 28 – June 3, 2004, Sousse, Tunisia, EAAP Publication 113, 2005, 253-257.
- BENDA, P.: Vliv některých konzervačních činidel na přirozenou mikroflóru vzorků mléka. The effect of some preservatives on natural microflora in milk samples. *Veterinary Medicine-Czech*, 40, 1995, 11, 359-364.
- BIGGS, D. A.- SZIJARTO, L. F.- VOORT VAN DE, F. R.: Fresh milk sampling for centralized milk testing. *Journal of Dairy Science*, 67, 1984, 3085-3092.
- BUCEK, P.: VÝSLEDKY KVALITY NAKUPOVANÉHO MLÉKA V ROCE 2020 podle analýz bazénových vzorků. ČMSCH a.s., LRM Brno-Tuřany, Hradištko, 2021.
- BUCHBERGER, J.- KIERMEIER, F.: Über die Eignung von Natriumazid zur Konservierung von Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung* (Kempten Allgäu), F 8, 1975, 192-194.
- ČSN 57 0530: Methods for testing of milk and milk products. (In Czech) 1972: ČNI Praha.
- ČSN 57 0536: Determination of milk composition by mid-infrared analyzer. (In Czech) 1999: ČNI Praha.
- ČSN 57 0538 (1998). Stanovení bodu mrznutí mléka pomocí mléčných kryoskopů. Česká technická norma, ČNI Praha, 1998.
- ČSN EN ISO/IEC 17025 (2005). Posuzování shody - Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. Český normalizační institut, Praha.
- ČSN ISO 8196-1 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod.
- ČSN ISO 8196-2 (570536). 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 (570536). 2016. Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních metod pro analýzu mléka.
- ČSN EN ISO 13366-1 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 1: Mikroskopická metoda. Český normalizační institut. Červenec 1998.

- ČSN EN ISO 13366-2 (57 0531): Mléko - Stanovení počtu somatických buněk – Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje. Český normalizační institut. Červenec 2007.
- 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 707 (2009): Mléko a mléčné výrobky – Návod na odběr vzorků.
- ČSN EN ISO 7218 (2008): Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologická zkoušení.
- DEJYONG, T.- CHANACHAI, K.- IMMAK, N.- PRARAKAMAWONGSA, T.- RUKKWAMSUK, T.- PACHECO, D. T.- PHIMPRAPHAI, W.: An economic analysis of high milk somatic cell counts in dairy cattle in Chiang Mai, Thailand. *Frontiers in Veterinary Science*, 9:958163. doi: 10.3389/fvets.2022.958163
- GRAPPIN, R. 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, 1987, 3-12.
- CHRISTOFORIDOU, S.- KARAGEORGOU, E.- IOANNIDOU, M.- PSOMAS, E.- MAGGIRA, M.- SAMOURIS, G.: Detection of antibacterial residues in milk by HPLC-DAD and microbial inhibitor tests. *Czech Journal of Food Sciences*, 38, 1, 2020, 63-71.
- JUŠČÁKOVÁ, D.- KOŽÁROVÁ, I.: Determination of antibiotic residues in milk by microbial inhibitory tests. *Folia Veterinaria*, 61, 3, 2017, 57-64.
- KROGER, M.: Milk sample preservation. *Journal of Dairy Science*, 68, 1985, 783-787.
- KUPKA, K.: Statistické řízení jakosti. TriloByte. ISBN 80-238-1818-X, 1997, 119.
- KVAPILÍK, J.- SUCHÁNEK, B.: Vliv konzervace vzorků mléka na výsledky rozborů. *Živočišná Výroba*, 19, 1974, 1, 31-38.
- LACHOWSKY, W. M.: Enumeration of bacteria in raw milk: Evaluation of various techniques. University of Guelph, Canada, 1984, <https://hdl.handle.net/10214/23536>.
- LEE, M. H.- LEE, H. J.- RYU, P. D.: Public health risks: chemical and antibiotic residues – review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14, 3, 2001, 402-413.
- NAVRÁTILOVÁ, P.: Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. *Veterinářství*, 52, 2002, 478-481.
- NAVRÁTILOVÁ, P.- VYHNÁLKOVÁ, J.- JEŘÁBKOVÁ, J.: Rychlé specifické testy pro kontrolu přítomnosti reziduí inhibičních látek v mléce. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 27, 155, 2, ISSN 1212-950X, 2016, 14-17.
- NAVRÁTILOVÁ, P.- VYHNÁLKOVÁ, J.- JEŘÁBKOVÁ, J.: Širokospektrální testy schválené v ČR pro stanovení RIL v syrovém kravském mléce. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 24, 140, ISSN 1212-950X, 2013, I-III.
- NG-KWAI-HANG, K. F.- HAYES, J. F.: 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, 1982, 1895-1899.
- ON 57 0534 (1987). Stanovení kysací schopnosti mléka. Úřad pro normalizaci a měření, 1987, Praha.
- PAŽOUT, V.- NOVÁK, P.- MALÁ, G.: Stanovení reziduí inhibičních látek ve vybraných surovinách živočišného původu. Certifikovaná metodika, VFU Brno a VÚŽV Praha Uhřetěves, ISBN: 978-80-7403-87-8, 2017, 11.
- PETTIPHER, G. L.- UBALDINA M. RODRIGUES: A bacteriostatic mixture for milk samples and its effect on bacteriological, cytological and chemical compositional analysis. *Journal of Applied Bacteriology*, 52, 1982, 259-265.
- RAPP, M.- MÜNCH, S.: Neuentwicklung von flüssigen Konservierungsmitteln für

- Milchproben. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 105, 1984, 1264-1272.
- SLÁDEK, M.: VÝSLEDKY KVALITY NAKUPOVANÉHO MLÉKA V ROCE 2021 podle analýz bazénových vzorků. ČMSCH a.s., LRM Brno-Tuřany, Hradištko, 2022.
- STAHLHUT KLIPP, H.: Experience with practical use of the Petrifoss-Biomatic system for total bacterial count determination in farm milk supplies. *Deutsche Milchwirtschaft*, 28, 15, 1977, 475-476, 478-480.
- SUHREN, G.- REICHMUTH, J.: Interpretation of quantitative microbiological results. *Milchwissenschaft*, 55, 2000, 18-22.
- SUHREN, G.- REICHMUTH, J.- HEESCHEN, H.: Zur Messung der bakteriologischen Beschaffenheit der Rohmilch mit dem Bactoscan-Gerät. *Deutsche Molkerei-Zeitung*, 109, 44, 1988, 3-11.
- SUHREN, G.- REICHMUTH, J.- WALTE, H. G.: Bacteriological quality of raw milk: Conversion of Bactoscan-FC counts onto the scale of the official method. *Milchwissenschaft*, 56, 2001, 380-384.
- SUHREN, G.- WALTE, H. G.: First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 50, 1998, 249-275.
- SUHREN, G.- WALTE, H. G.: Determination of precision data of the Bactoscan FC-method by an interlaboratory study. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 53, 2001 269-282.
- SUHREN, G.- WALTE, H. G.- REICHMUTH, J.: Zum Einsatz der automatisierten Durchflusszytometrie als Routinemethode für die Erfassung der bakteriologischen Qualität von Anlieferngsmilch. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 52, 2000, 97-143.
- SUCHÁNEK, M.- PLZÁK, Z.- ŠUBRT, P.- KORUNA, I.: Kvalimetrie, 7. Validace analytických metod. Eurachem, 1999, 140.
- SZIJARTO, L. F.- HARDING, F.- HILL, A. R.- MELICHERCIK, J.: Cooling systems for transport of unpreserved milk samples. *Journal of Dairy Science*, 73, 1990, 2299-2308.
- TOMÁŠKA, M.- SUHREN, G.: Experiences with introduction of the Bactoscan FC in Slovakia, *Bulletin of International Dairy Federation*, 383, 2003, 58-60.
- TOMÁŠKA, M.- SUHREN, G.: Verification Study on Bactoscan FC counts conversion onto the scale of the reference method. *Milchwissenschaft*, 59, 2004, 261-262.
- ZAJÁC, P.- ČAPLA, J.- VIETORIS, V.- ZUBRICKÁ, S.- ČURLEJ, J.: Effect of storage on the major constituents of raw milk. *Potravinárstvo*, 9, 1, 2015, 375-381.
- ZAJÁC, P.- ZUBRICKÁ, S.- ČAPLA, J.- ZELENÁKOVÁ, L.- ŽIDEK, R.- ČURLEJ, J.: Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, 61, 2016, 239-244. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.06.008>
- ZAPOTOCKY, M.- WINTERER, H.- BINDER, W.: Zur Automatisierung des Osen-Plattenverfahrens mit Petrifoss und Colony-Counter. *Osterreichische Milchwirtschaft*, 35, 2, 1980, Wiss. Beil. 1, 1-6, ref.12.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky

Publikace ve vědeckých a odborných profesních časopisech:

- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.: Nový konzervační prostředek vzorků mléka Broad spectrum microtabs v našich laboratořích. *Veterinářství*, 1993 a, 43, 12, 463-465.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Vliv ošetření vzorků mléka před měřením na odečet počtu somatických buněk přístrojem Fossomatic. Effect of milk sample treatment before measurement for reading of somatic cell number by the Fossomatic apparatus. *Živočišná Výroba*, 1993 b, 38, 6, 555-565.
- GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- MATOUŠ, E.- GABRIEL, B.- KOPECKÝ, J.: Nahradí i v ČR bronopol dichroman draselný při konzervaci vzorků mléka? *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, ISSN 0139-7265, 1994, 4, 7-14.
- HANUŠ, O.- BENDA, P.- GENČUROVÁ, V.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. I. ověření bakteriostatických a baktericidních vlastností a interferenčního vlivu. Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part I. Checks of bacteriostatic and bactericidal abilities and interferential effect. *Veterinární Medicína*, 1992 a, 37, 1, ISSN 0375-8427, 21-31.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŽVÁČKOVÁ, I.: Testování nového konzervačního přípravku vzorků mléka Milkofix pro účely infračervené analýzy základního složení mléka. II. ověření konzervačního účinku ve vztahu k infračervené analýze. Tests of Milkofix a new preservative substance for milk samples used for the purposes of an infrared analysis of basic milk composition. Part II. Checks of preservative effects in relation to the infrared analysis. *Veterinární Medicína*, 1992 b, 37, 1, ISSN 0375-8427, 33-43.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- GABRIEL, B.- ŽVÁČKOVÁ, I.: Srovnání účinnosti konzervačního přípravku Milkofix s tradičními konzervačními prostředky pro účely stanovení počtu somatických buněk ve vzorcích mléka fluoro-opto-elektronickou metodou. A comparison of the efficiency of Milkofix preservative substance with traditional preservatives used to determine somatic cell counts in milk samples by a fluoro-opto-electronic method. *Veterinární Medicína*, 1992 c, 37, 2, ISSN 0375-8427, 91-99.
- HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- JEDELSKÁ, R.: Rámcové představení hlavních prvků systému QA u chemických a fyzikálních metod v referenčních a rutinních laboratořích pro analýzy kvality syrového mléka v ČR. A framework performance of main elements of QA system of chemical and physical methods in reference and routine laboratories for raw milk quality analyses in the CR. Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-37-7, Komorní Lhotka, 2007, 33-50.
- HANUŠ, O.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- GENČUROVÁ, V.- BJELKA, M.- JEDELSKÁ, R.: Podmínky transportu a ošetření rutinních vzorků mléka jako důležitý faktor kvality výsledků analýz. The transport and treatment conditions of the routine milk samples as an important factor of the analytical result quality. *Bulletin VÚCHS Rapotín, Výzkum v chovu skotu*, 2004, 1, 20-28.
- HANUŠ, O.- HERING, P.- GENČUROVÁ, V.- MOTYČKA, Z.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Validation of deep freezing of pilot samples for checking of time stability of indirect analyses of basic milk composition and for their long shelf-life. Validace hlubokého zamrazování pilotních vzorků pro kontrolu stability výsledků nepřímých analýz základního složení mléka a pro jejich dlouhodobou údržnost. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, ISSN 1211-8516, LVI, 5, 2008 a, 57-68.

- HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- KOPUNECZ, P.- KLÍMOVÁ, Z.- TUČKOVÁ, R.- ZLATNÍČEK, J.- KLIMEŠ, M.- KLIMEŠOVÁ, M.- ROUBAL, P.: Rekalkulace přepočtové rovnice bakteriálních elektronických impulsů na celkový počet mikroorganismů v kontrole kvality mléka v České republice. Recalculation of transformation equation for bacterial electronic impulses to total count of microorganisms in milk quality control in the Czech Republic. (In Czech) *Mlékařské listy - zpravodaj*, 27, 156, 3, ISSN 1212-950X, 2016 a, 1-7.
- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- KLIMEŠOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- HEGEDŮŠOVÁ, Z.: Retrospektivní analýza trendů vývoje dojivosti a kvality syrového kravského mléka v České republice. Retrospective analysis of trends in yield and quality of raw cow milk in the Czech Republic. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 30, 172, 1, ISSN 1212-950X, 2019, 4-11.
- HASOŇOVÁ, L.- SAMKOVÁ, E.- HÁLOVÁ, K.- STRAKOVÁ, K.- HOSNEDLOVÁ, B.- NEJESCHLEBOVÁ, H.- HANUŠ, O.: Vybrané parametry kvality syrového mléka lčených dojnic v ochranné lhůtě a po jejím ukončení. Selected parameters of raw milk quality of treated dairy cows within and after the withdrawal period. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 33, 190, 1, ISSN 1212-950X, 2022, 9-11.
- KLIMEŠOVÁ, M.- NEJESCHLEBOVÁ, H.- VORLOVÁ, L.- HANUŠ, O.- HARUŠTIAKOVÁ, D.- NEJESCHLEBOVÁ, L.- VONDRUŠKOVÁ, E.- KOPECKÝ, J.: Srovnání celkového počtu vybraných skupin mikroorganismů v syrovém mléce při odběru na farmě a po transportu do laboratoře. Comparison of the total number of selected groups of microorganisms in raw milk during collection on the farm and after transport to the laboratory. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 32, 188, 5, ISSN 1212-950X, 2021, 6-10.
- KVAPILÍK, J.- HANUŠ, O.- BARTOŇ, L.- VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ, M.- ROUBAL, P.: Mastitis of dairy cows and financial losses: an economic meta-analysis and model calculation. Mastitidy dojených krav a finanční ztráty: ekonomická metaanalýza a modelová kalkulace. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21, 5, 2015, ISSN 1310-0351, 1092-1105.
- KVAPILÍK, J.- HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- ŘÍHA, J.- URBAN, P.- JEDELSKÁ, R.- SEYDLOVÁ, R.- KLIMEŠOVÁ, M.- KOPUNECZ, P.: Somatic cells in bulk samples and purchase prices of cow milk. Somatické buňky v bazénových vzorcích a nákupní ceny kravského mléka. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65, 3, ISSN 1211-8516, 2017 a, 879-892.
- KVAPILÍK, J.- HANUŠ, O.- SYRŮČEK, J.- VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ, M.- ROUBAL, P.: The economic importance of the losses of cow milk due to mastitis: a meta-analysis. Ekonomický význam ztrát na mléce u krav v důsledku mastitid: metaanalýza. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20, 6, 2014, ISSN 1310-0351, 1501-1515.
- KVAPILÍK, J.- JEDELSKÁ, R.- HANUŠ, O.- URBAN, P.- ŘÍHA, J.- KOPUNECZ, P.- SEYDLOVÁ, R.- ROUBAL, P.- ZLATNÍČEK, J.- KLIMEŠ, M.: Somatické buňky v mléce individuálních krav a vybrané ukazatele. Somatic cell count in milk from individual dairy cows and selected indicators. (In Czech) *Mlékařské listy - zpravodaj*, 27, 158, 5, ISSN 1212-950X, 2016, 5-12.
- KVAPILÍK, J.- KUČERA, J.- HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- SEYDLOVÁ, R.- URBAN, P.- KOPUNECZ, P.- JEDELSKÁ, R.: Zdravotní stav mléčné žlázy, jakost a nákupní ceny mléka. Udder health state, milk quality and purchase prices. (In Czech) *Náš chov*, LXXVII, 5, ISSN 0027-8068, 2017 b, 25-28.
- NEJESCHLEBOVÁ, H.- HANUŠ, O.- SAMKOVÁ, E.- VORLOVÁ, L.- BORKOVÁ, M.- KUČERA, J.- LIPOVSKÝ, D.- TIŠNOVSKÁ, M.- HASOŇOVÁ, L.- HÁLOVÁ, K.- JEDELSKÁ, R.: Výskyt reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce v České republice – možná srovnání. Occurrence of residues of inhibitory substances in raw cow's milk in the Czech Republic – possible comparisons. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 33, 190, 1, ISSN 1212-950X, 2022, 1-8.
- SAMKOVÁ, E. et al. (CEMPÍRKOVÁ, R., HANUŠ, O., HASOŇOVÁ, L., HLAVÁČEK, J., JELEN, P., JEŘÁBKOVÁ, J., KOPÁČEK, J., LUŽOVÁ, T., NAVRÁTILOVÁ, P., SEYDLOVÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., ŠPIČKA, J., VORLOVÁ, L., VYLETĚLOVÁ, M.): Mléko: produkce a kvalita. Milk: production

and quality. Vědecká monografie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Tři kapitoly: SAMKOVÁ, E.- ŠPIČKA, J.- HANUŠ, O.: 5. Jakostní ukazatele mléka. 5.1. Mléčný tuk. 5. Milk quality indicators. 5.1. Milk fat. 61-76; HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.: 5. Jakostní ukazatele mléka. 5.11. Technologické vlastnosti mléka. 5. Milk quality indicators. 5.11. Milk technological properties. 168-177; HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEŘÁBKOVÁ, J.: 6. Kontrola jakosti mléka. 6. Milk quality control. 178-203; ISBN: 978-80-7394-383-7, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012, 240.

TOMÁŠKA, M.- SUHREN, G.- HANUŠ, O.- WALTE, H. G.- SLOTTOVÁ, A.- HOFERICOVÁ, M.: The application of flow cytometry in determining the bacteriological quality in raw sheep's milk in Slovakia. *Lait*, 86, ISSN 0023-7302, 2006, 127-140.

Předchozí tématicky relevantní certifikované metodiky k problematice provedení konzervace vzorků mléka v kontrole kvality mléka a mléčné užitkovosti:

- UPLATNĚNÁ METODIKA QF 3019 UM 1 - Adjustační principy a postupy – centrální adjustace rutinních měření chemických složek v mléčných laboratořích. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Výzkumným ústavem pro chov skotu, s.r.o., Rapotín a ČMSCH a.s., Praha, z 12. 12. 2006. HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.

- CERTIFIKOVANÁ METODIKA RO1416 CM 29 – název: Transformace bakteriálních elektronických impulsů průtočné cytometrie na klasické hodnoty celkového počtu mesofilních mikroorganismů v laboratořích rozborů mléka. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Svazem výrobců mléka a.s. Šumperk, z 5. 10. 2016. Datum certifikace 8. 12. 2016, b. HANUŠ, O.- KLIMEŠOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- CHLÁDEK, G.- FALTA, D.- KOPECKÝ, J.- NEJESCHLEBOVÁ, L.- VONDRUŠKOVÁ, E.

- CERTIFIKOVANÁ METODIKA RO1421 CM 41 – název: Alternativy ošetření a transportu vzorků v kontrole mléčné užitkovosti pro věrohodné výsledky analýz. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a ČMSCH a. s. z 1. 2. 2022. Datum certifikace 16. 2. 2022 (č. 942/2022-ČPI). ISBN 978-80-88390-04-6 (MILCOM) HANUŠ, O.- NEJESCHLEBOVÁ, H.- KLIMEŠOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- HEGEDŮŠOVÁ, Z.- HOLÁSEK, R.- KOPECKÝ, J.

- UPLATNĚNÁ METODIKA MSM 2678846201 UM 4 - Postup hlubokého zamrazování pilotních vzorků pro kontrolu stability výsledků analýz složení mléka a jejich dlouhou expiraci. Doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci uplatněné metodiky mezi Agrovýzkumem Rapotín s.r.o. a ČMSCH a.s., Praha, z 11. 4. 2008 b. HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- HERING, P.- MOTYČKA, Z.

- CERTIFIKOVANÁ METODIKA RO1419 CM 38 – Postup přípravy standardních vzorků pro hluboké zmrazení a aplikaci ve výkonnostním testování analytické způsobilosti při určení složení mléka nepřímými metodami. Tato je doložená statutárně podepsanou smlouvou o aplikaci certifikované metodiky mezi Výzkumným ústavem mlékárenským s.r.o. Praha a Bentley Czech s.r.o. z 5. 11. 2019. Datum certifikace 1. 11. 2019 (č. 8499/2019 - ČPI). ISBN: 978-80-904348-8-2 HANUŠ, O.- KLIMEŠOVÁ, M.- CHLÁDEK, G.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J. http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm38_2019.pdf

Ne všechny práce ze seznamu literatury (5, 6), jejichž studium a poznatky byly využity ve vývoji metodiky, jsou citovány explicitně v textu vlastní metodiky pro praxi. Jsou však pro úplnost uvedeny v seznamu výše.

Většina vlastních prací, použítá při tvorbě této certifikované metodiky, byla předtím již samostatně odborně oponována, jak plyne ze seznamu výše.

Přílohy, dokumenty a doklady:

technická řešení a postupy této certifikované metodiky byly zejména podpořeny výsledky vlastního výzkumu, vývoje a empirických poznatků, které byly publikovány.

Datum: 03.04.2023

Za zhotovitele:

Mgr. Hana Nejeschlebová



7) Přílokové materiály s podklady pro ověření vlivu azidiolové konzervace vzorků mléka na výsledky vybraných, referenčních a rutinních mlékařských analýz

7.1 Výsledky LRM Brno

7.1.1 Parametry mléka stanovené metodou MIR-FT (MilkoScan 7) a bod mrznutí kryoskopicky

Tab. 1a Nekonzervované

	PSB	T	B	L	KAS	STP	M	VMK	KC	EBMM	BMM
<i>n</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	60	106	106
<i>x</i>	220	4,09	3,51	4,87	2,77	9,10	24,95	0,98	0,111	521	5 269
<i>g</i>											
<i>sx_v</i>	132	0,391	0,211	0,104	0,172	0,209	5,728	0,253	0,009	10	110
<i>vx_v</i>	60,0	9,6	6,0	2,1	6,2	2,3	23,0	25,8	8,1	1,9	2,1
<i>sx</i>	131	0,388	0,210	0,103	0,171	0,207	5,680	0,251	0,009	10	109
<i>vx</i>	59,5	9,5	6,0	2,1	6,2	2,3	22,8	25,6	8,1	1,9	2,1
<i>min</i>	21	3,46	3,08	4,54	2,40	8,54	10,00	0,50	0,086	462	4 653
<i>max</i>	971	6,02	4,29	5,02	3,43	9,58	39,10	1,78	0,139	544	5 658
<i>Rmax-min</i>	950	2,56	1,21	0,48	1,03	1,04	29,10	1,28	0,053	82	1 005
<i>medián</i>	197	4,07	3,51	4,89	2,77	9,13	24,80	0,94	0,111	524	5 280
<i>horní q</i>	147	3,87	3,38	4,82	2,65	8,97	21,94	0,81	0,106	520	5 238
<i>dolní q</i>	272	4,19	3,61	4,93	2,83	9,22	27,65	1,09	0,115	525	5 310

Tab. 1b Konzervované (Azidiol)

	PSB	T	B	L	KAS	STP	M	VMK	KC	EBMM	BMM
<i>n</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	60	106	106
<i>x</i>	217	4,07	3,51	4,85	2,75	9,07	25,87	1,02	0,120	527	5 340
<i>g</i>											
<i>sx_v</i>	130	0,385	0,210	0,105	0,169	0,209	5,857	0,251	0,009	10	101
<i>vx_v</i>	59,9	9,5	6,0	2,2	6,1	2,3	22,6	24,6	7,5	1,9	1,9
<i>sx</i>	129	0,382	0,209	0,105	0,168	0,207	5,808	0,249	0,009	9	101
<i>vx</i>	59,4	9,4	6,0	2,2	6,1	2,3	22,5	24,4	7,5	1,7	1,9
<i>min</i>	16	3,46	3,07	4,50	2,38	8,52	11,10	0,53	0,095	469	4 760
<i>max</i>	965	5,96	4,28	5,00	3,40	9,55	40,50	1,82	0,146	562	5 666
<i>Rmax-min</i>	949	2,50	1,21	0,50	1,02	1,03	29,40	1,29	0,051	93	906
<i>medián</i>	202	4,05	3,50	4,88	2,75	9,11	25,50	1,00	0,119	529	5 347
<i>horní q</i>	146	3,86	3,38	4,80	2,64	8,95	22,70	0,86	0,116	526	5 302
<i>dolní q</i>	267	4,17	3,60	4,91	2,81	9,21	29,28	1,10	0,124	530	5 377

Tab. 1c Konz-Nekonz

	PSB	T	B	L	KAS	STP	M	VMK	KC	EBMM	BMM
<i>n</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	60	106	106
<i>d</i>	-3	-0,019	-0,003	-0,020	-0,016	-0,023	0,927	0,040	0,009	5,83	72
<i>sd_v</i>	7	0,012	0,009	0,006	0,010	0,011	0,943	0,056	0,001	2,38	40
<i>sd</i>	7	0,012	0,009	0,006	0,010	0,011	0,935	0,056	0,001	2,36	40
<i>min</i>	-39	-0,06	-0,03	-0,04	-0,03	-0,05	-1,15	-0,09	0,01	3,00	-64
<i>max</i>	12	0,00	0,02	-0,01	0,01	0,00	2,95	0,16	0,01	18,00	260
<i>Rmax-min</i>	51	0,06	0,05	0,03	0,04	0,05	4,10	0,25	0,01	15,00	324
<i>medián</i>	-3	-0,02	0,00	-0,02	-0,02	-0,02	0,92	0,04	0,01	5,25	66
<i>horní q</i>	-6	-0,02	-0,01	-0,02	-0,02	-0,03	0,24	0,01	0,01	4,00	52
<i>dolní q</i>	1	-0,01	0,00	-0,02	-0,01	-0,02	1,43	0,07	0,01	6,50	91

Tab. 1d Párový t-test

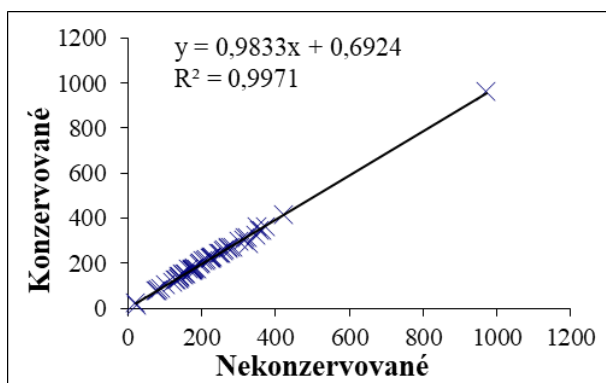
	PSB	T	B	L	KAS	STP	M	VMK	KC	EBMM	BMM
sv	59	59	59	59	59	59	59	59	59	105	105
t	3,29	12,16	2,56	25,60	12,29	16,06	7,55	5,49	69,13	25,10	18,44
významnost	**	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***

Vysvětlivky pro tab. 1a až 1d:

n = počet případů; x = aritmetický průměr; g = geometrický průměr; sx_v = výběrová směrodatná odchylka; vx_v = variační koeficient výběrové směrodatné odchylky; sx = směrodatná odchylka průměru; vx = variační koeficient; min = minimum; max = maximum; Rmax-min = rozdíl maxima a minima; horní q = horní kvartil; dolní q = dolní kvartil; d = průměrná diference; sd = směrodatná odchylka průměrné diference; sv = stupně volnosti; t = testovací kritérium; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; PSB = počet somatických buněk ($10^3 \times ml^{-1}$); T = obsah tuku v mléce (%); B = obsah hrubých bílkovin (%); L = obsah monohydrátu laktózy (%); KAS = obsah kaseinu (%); STP = obsah sušiny tukuprosté (%); M = koncentrace močoviny ($mg \times 100 ml^{-1}$); VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku ($mmol \times 100 g^{-1}$ tuku); KC = koncentrace kyseliny citronové (%); EBMM = ekvivalent bodu mrznutí mléka ($^{\circ}C \times -10^3$); BMM = deprese bodu mrznutí mléka ($^{\circ}C \times -10^4$)

7.1.1.1 Lineární regrese parametrů nekonzervovaného mléka a mléka konzervovaného Azidiolem

Obr. 1 Počet somatických buněk ($10^3 \times ml^{-1}$)



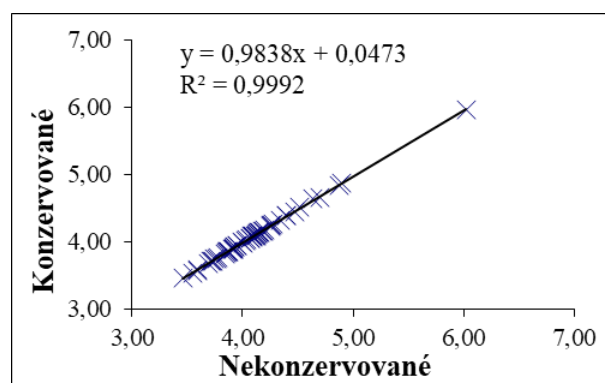
$$y = 0,9833x + 0,6924$$

$$R^2 = 0,9971$$

$$n = 60$$

$$r = 0,999 \text{ ***}$$

Obr. 2 Obsah tuku (%)



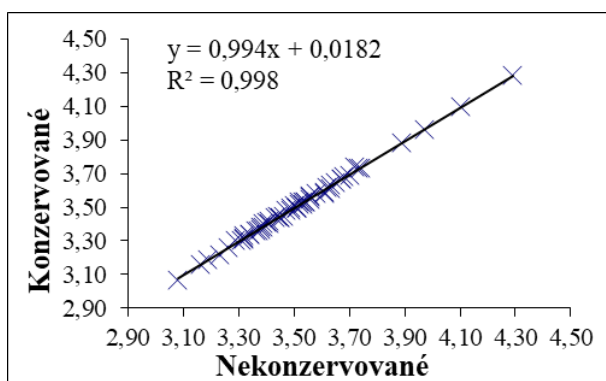
$$y = 0,9838x + 0,0473$$

$$R^2 = 0,9992$$

$$n = 60$$

$$r = 1,000 \text{ ***}$$

Obr. 3 Obsah hrubých bílkovin (%)



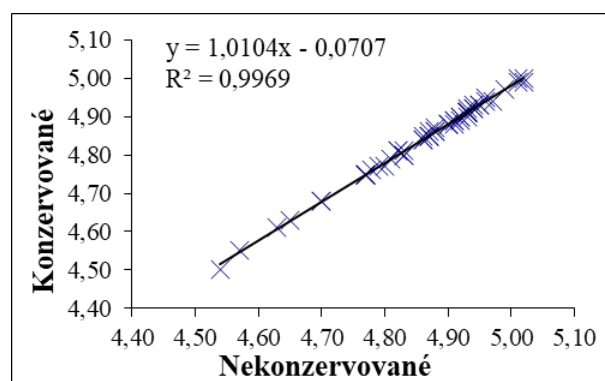
$$y = 0,994x + 0,0182$$

$$R^2 = 0,9980$$

$$n = 60$$

$$r = 0,999 \text{ ***}$$

Obr. 4 Obsah monohydrátu laktózy (%)



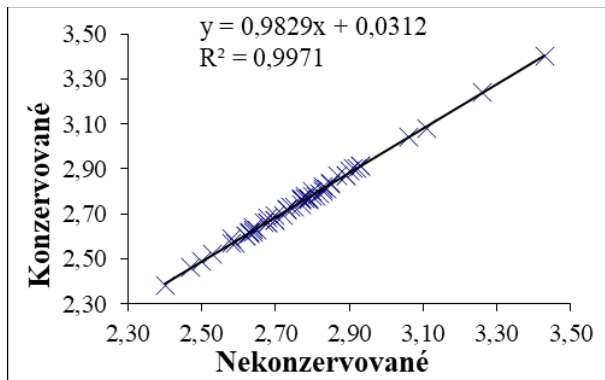
$$y = 1,0104x - 0,0707$$

$$R^2 = 0,9969$$

$$n = 60$$

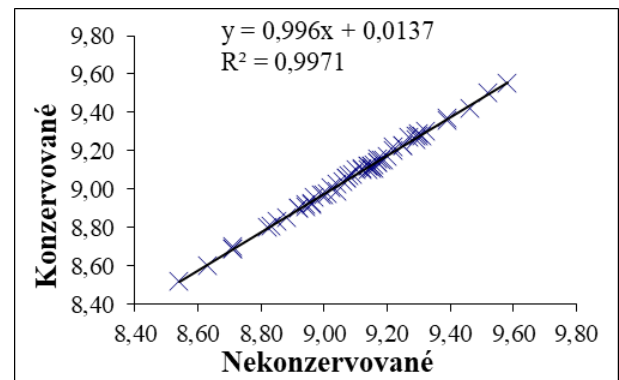
$$r = 0,998 \text{ ***}$$

Obr. 5 Obsah kaseinu (%)



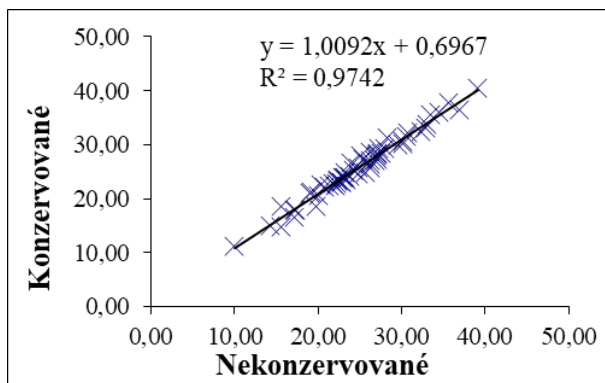
$y = 0,9829x + 0,0312$ $n = 60$
 $R^2 = 0,9971$ $r = 0,999 ***$

Obr. 6 Obsah tukoprosté sušiny (%)



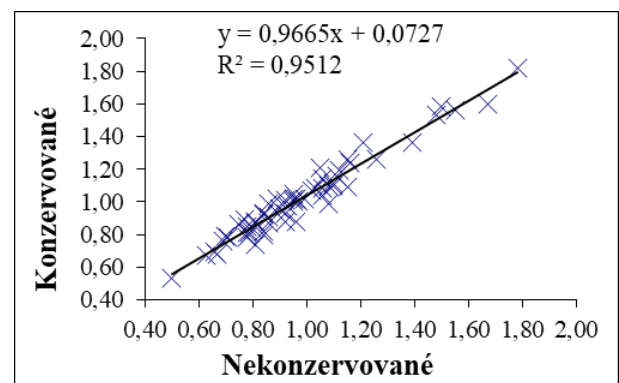
$y = 0,996x + 0,0137$ $n = 60$
 $R^2 = 0,9971$ $r = 0,999 ***$

Obr. 7 Obsah močoviny ($\text{mg} \times 100 \text{ ml}^{-1}$)



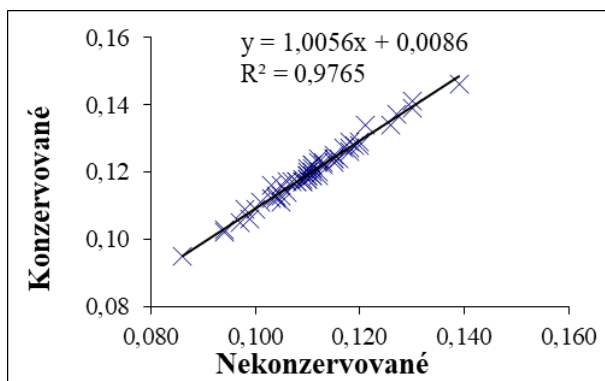
$y = 1,0092x + 0,6967$ $n = 60$
 $R^2 = 0,9742$ $r = 0,987 ***$

Obr. 8 Obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku ($\text{mmol} \times 100 \text{ g}^{-1}$ tuku)



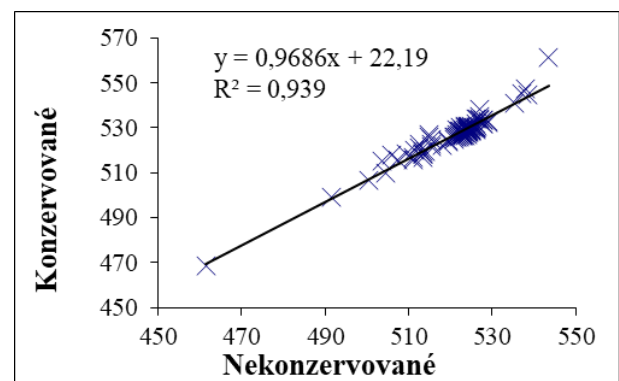
$y = 0,9665x + 0,0727$ $n = 60$
 $R^2 = 0,9512$ $r = 0,975 ***$

Obr. 8 Obsah kyseliny citronové (%)



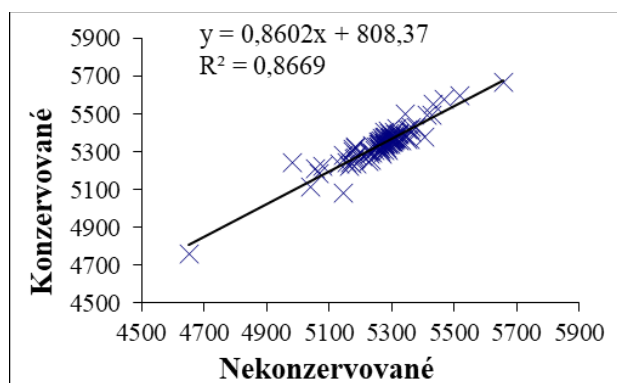
$y = 1,0056x + 0,0086$ $n = 60$
 $R^2 = 0,9765$ $r = 0,988 ***$

Obr. 9 Ekvivalent bodu mrznutí mléka ($^{\circ}\text{C} \times -10^3$)



$y = 0,9686x + 22,19$ $n = 106$
 $R^2 = 0,9390$ $r = 0,969 ***$

Obr. 10 Deprese bodu mrznutí mléka ($^{\circ}\text{C} \times -10^4$)



$$y = 0,8602x + 808,3739 \quad n = 106$$

$$R^2 = 0,8669 \quad r = 0,931 ***$$

7.1.2 CPM

Tab. 2a CPM v mléce konzervovaném Azidiollem a Heeschovým číidlem

	Azidiol ($10^3 \times \text{ml}^{-1}$)	Heeschovo číidlo ($10^3 \times \text{ml}^{-1}$)
<i>n</i>	93	93
<i>x</i>	33,79	33,78
<i>sx_v</i>	44,542	43,924
<i>vx_v</i>	131,8	130,0
<i>sx</i>	44	44
<i>vx</i>	131,1	129,3
<i>min</i>	5	5
<i>max</i>	197	224
<i>Rmax-min</i>	192	219
<i>medián</i>	12	12
<i>horní q</i>	8	7
<i>dolní q</i>	34	52

Tab. 2b Diference CPM v mléce konzervovaném Azidiollem a Heeschovým číidlem

	Azidiol – Heesch
<i>n</i>	93
<i>d</i>	0,01
<i>sd_v</i>	16,342
<i>sd</i>	16,254
<i>min</i>	-69,00
<i>max</i>	54,00
<i>Rmax-min</i>	123,00
<i>medián</i>	0,50
<i>horní q</i>	-1,00
<i>dolní q</i>	2,50

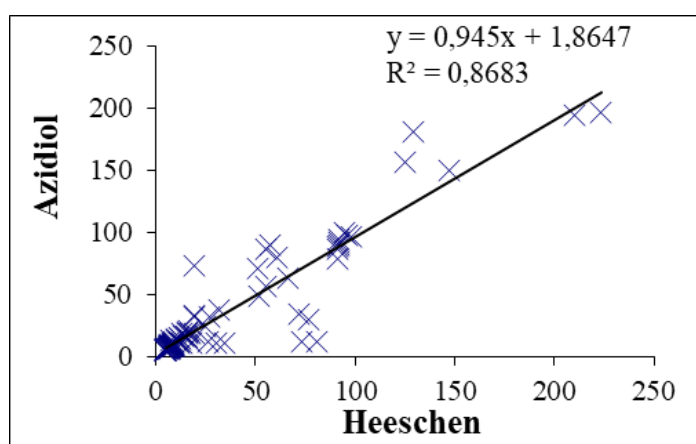
Tab. 2c Párový t-test

sv	92
t	0,01
významnost	ns

Vysvětlivky pro Tab. 2a až 2c:

n = počet případů; x = aritmetický průměr; g = geometrický průměr; sx_v = výběrová směrodatná odchylka; vx_v = variační koeficient výběrové směrodatné odchylky; sx = směrodatná odchylka průměru; vx = variační koeficient; min = minimum; max = maximum; Rmax-min = rozdíl maxima a minima; horní q = horní kvartil; dolní q = dolní kvartil; d = průměrná diference; sd = směrodatná odchylka průměrné diference; sv = stupně volnosti; t = testovací kritérium; ns = P > 0,05.

Obr. 11 Lineární regrese CPM v mléce konzervovaném Azidiolom a Heeschovým činidlem ($10^3 \text{ CFU} \times \text{ml}^{-1}$)



$$y = 0,945x + 1,8647 \quad n = 93$$

$$R^2 = 0,8683 \quad r = 0,932 \text{ ***}$$

7.2 Výsledky Šumperk

7.2.1 Parametry mléka stanovené metodou MIR-FT (DairySpec FT)

Tab. 3a Nekonzervované

	PSB	T	B	KAS	L	Sušina	STP	M	VMK	KC	EBMM	LF
<i>n</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<i>x</i>	264	4,189	3,449	2,679	4,845	13,821	8,998	231,530	0,388	0,195	516,41	228,176
<i>sx_y</i>	188	0,911	0,199	0,257	0,162	0,878	0,214	74,810	0,042	0,024	8,023	35,931
<i>vx_y</i>	71,2	21,7	5,8	9,6	3,3	6,4	2,4	32,3	10,8	12,3	1,6	15,7
<i>sx</i>	186	0,904	0,197	0,255	0,160	0,871	0,212	74,184	0,042	0,023	7,956	35,630
<i>vx</i>	70,5	21,6	5,7	9,5	3,3	6,3	2,4	32,0	10,8	11,8	1,5	15,6
<i>min</i>	70	3,320	2,935	1,820	4,200	12,820	8,320	85,950	0,325	0,140	496,50	163,685
<i>max</i>	1 389	10,570	4,090	3,430	5,095	19,635	9,280	585,200	0,535	0,265	547,00	415,265
<i>Rmax-min</i>	1 319	7,250	1,155	1,610	0,895	6,815	0,960	499,250	0,210	0,125	50,50	251,580
<i>medián</i>	224	4,123	3,453	2,720	4,900	13,715	9,060	224,400	0,388	0,190	516,50	225,678
<i>horní q</i>	162	3,899	3,338	2,531	4,800	13,409	8,899	196,163	0,355	0,180	511,00	215,479
<i>dolní q</i>	322	4,250	3,558	2,823	4,946	14,018	9,138	252,625	0,415	0,203	521,00	236,126

Tab. 3b Konzervované (Azidiol)

	PSB	T	B	KAS	L	Sušina	STP	M	VMK	KC	EBMM	LF
<i>n</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<i>x</i>	246	4,168	3,458	2,704	4,839	13,805	9,014	221,170	0,387	0,198	520,39	225,326
<i>sx_y</i>	188	0,900	0,196	0,250	0,161	0,872	0,207	74,718	0,045	0,023	7,670	35,686
<i>vx_y</i>	76,4	21,6	5,7	9,2	3,3	6,3	2,3	33,8	11,6	11,6	1,5	15,8
<i>sx</i>	187	0,893	0,194	0,248	0,159	0,865	0,205	74,093	0,045	0,023	7,606	35,387
<i>vx</i>	76,0	21,4	5,6	9,2	3,3	6,3	2,3	33,5	11,6	11,6	1,5	15,7
<i>min</i>	66	3,320	2,955	1,915	4,190	12,875	8,360	69,150	0,315	0,150	505,00	158,045
<i>max</i>	1 382	10,470	4,090	3,445	5,080	19,565	9,315	574,000	0,540	0,270	550,50	410,670
<i>Rmax-min</i>	1 316	7,150	1,135	1,530	0,890	6,690	0,955	504,850	0,225	0,120	45,50	252,625
<i>medián</i>	219	4,103	3,455	2,730	4,900	13,705	9,063	213,525	0,385	0,200	519,50	222,625
<i>horní q</i>	145	3,885	3,353	2,554	4,785	13,390	8,923	182,475	0,359	0,180	515,50	213,939
<i>dolní q</i>	270	4,236	3,565	2,838	4,941	13,994	9,133	243,788	0,413	0,210	524,50	233,743

Tab. 3c Konz – Nekonz

	PSB	T	B	KAS	L	Sušina	STP	M	VMK	KC	EBMM	LF
<i>n</i>	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
<i>d</i>	-19	-0,021	0,008	0,025	-0,006	-0,016	0,016	-10,360	-0,001	0,003	3,98	-2,850
<i>sd_y</i>	38	0,015	0,011	0,034	0,010	0,022	0,024	6,869	0,010	0,005	1,734	2,107
<i>sd</i>	38	0,015	0,011	0,034	0,010	0,022	0,023	6,812	0,010	0,005	1,720	2,089
<i>min</i>	-126	-0,100	-0,020	-0,020	-0,025	-0,070	-0,025	-27,850	-0,020	-0,010	1,50	-6,830
<i>max</i>	157	0,000	0,035	0,105	0,025	0,055	0,085	2,750	0,040	0,010	10,50	1,235
<i>Rmax-min</i>	283	0,100	0,055	0,125	0,050	0,125	0,110	30,600	0,060	0,020	9,00	8,065
<i>medián</i>	-17	-0,020	0,008	0,015	-0,010	-0,020	0,018	-10,025	0,000	0,000	3,50	-2,660
<i>horní q</i>	-33	-0,026	0,000	0,000	-0,015	-0,030	0,000	-14,413	-0,005	0,000	2,50	-4,591
<i>dolní q</i>	-4	-0,014	0,015	0,045	0,000	-0,005	0,030	-5,338	0,005	0,010	4,50	-1,451

Tab. 3d Párový t-test

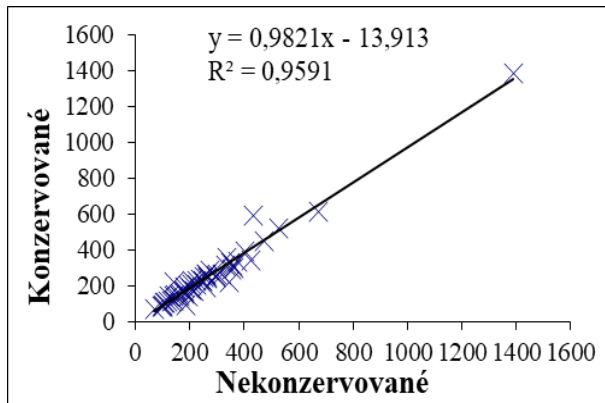
	PSB	T	B	KAS	L	Sušina	STP	M	VMK	KC	EBMM	LF
sv	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59	59
t	3,84	10,75	5,59	5,65	4,61	5,59	5,12	11,58	0,77	4,61	17,63	10,39
význ.	***	***	***	***	***	***	***	***	ns	***	***	***

Vysvětlivky pro Tab. 3a až 3d:

n = počet případů; x = aritmetický průměr; g = geometrický průměr; sx_v = výběrová směrodatná odchylka; vx_v = variační koeficient výběrové směrodatné odchylky; sx = směrodatná odchylka průměru; vx = variační koeficient; min = minimum; max = maximum; Rmax-min = rozdíl maxima a minima; horní q = horní kvartil; dolní q = dolní kvartil; d = průměrná diference; sd = směrodatná odchylka průměrné diference; sv = stupně volnosti; t = testovací kritérium; ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; PSB = počet somatických buněk ($10^3 \times ml^{-1}$); T = obsah tuku v mléce (%); B = obsah hrubých bílkovin (%); L = obsah monohydrátu laktózy (%); KAS = obsah kaseinu (%); STP = obsah sušiny tukuprosté (%); M = koncentrace močoviny ($mg \times 100 ml^{-1}$); VMK = obsah volných mastných kyselin v mléčném tuku ($mmol \times 100 g^{-1}$ tuku); KC = koncentrace kyseliny citronové (%); EBMM = ekvivalent bodu mrznutí mléka ($^{\circ}C \times -10^3$).

7.2.1.1 Lineární regrese parametrů nekonzervovaného mléka a mléka konzervovaného Azidiolem

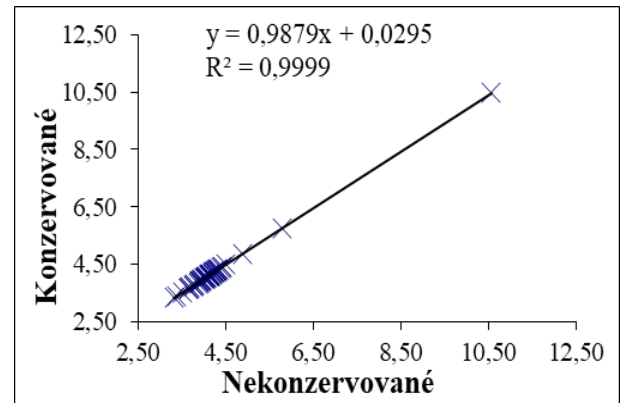
Obr. 12 Počet somatických buněk ($10^3 \times ml^{-1}$)



$$y = 0,9821x - 13,9131 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9591 \quad r = 0,979 \text{ ***}$$

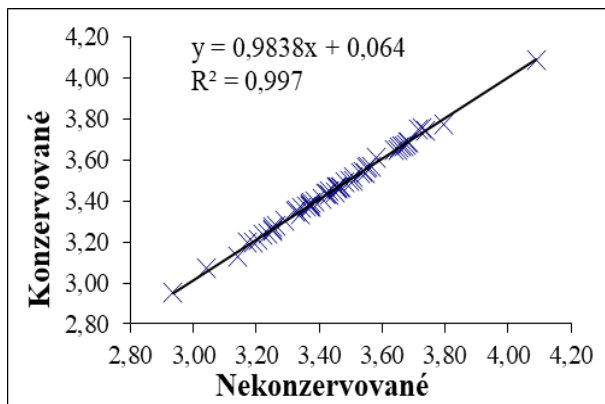
Obr. 13 Obsah tuku (%)



$$y = 0,9879x + 0,0295 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9999 \quad r = 1,000 \text{ ***}$$

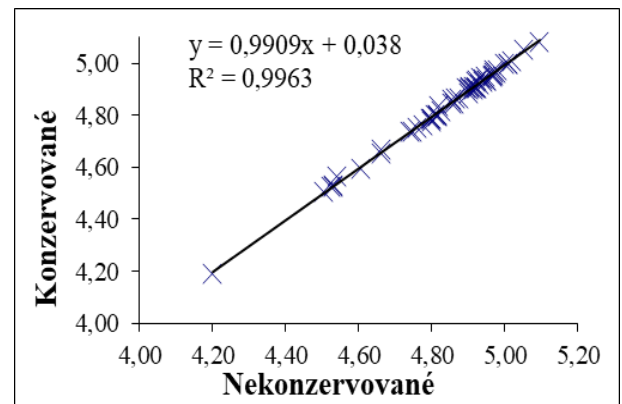
Obr. 14 Obsah hrubých bílkovin (%)



$$y = 0,9838x + 0,064 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9970 \quad r = 0,998 \text{ ***}$$

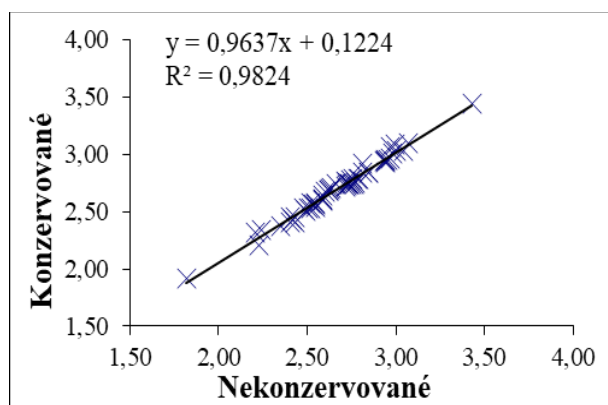
Obr. 15 Obsah monohydrátu laktózy (%)



$$y = 0,9909x + 0,038 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9963 \quad r = 0,998 \text{ ***}$$

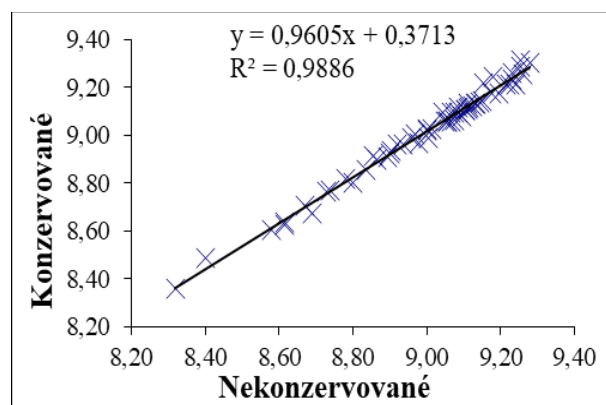
Obr. 16 Obsah kaseinu (%)



$$y = 0,9637x + 0,1224 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9824 \quad r = 0,991 ***$$

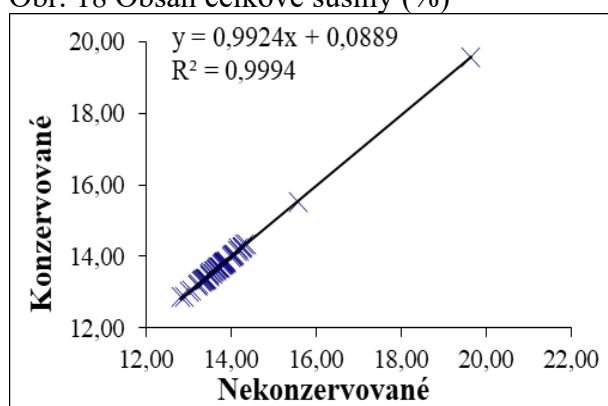
Obr. 17 Obsah tukuprosté sušiny (%)



$$y = 0,9605x + 0,3713 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9886 \quad r = 0,994 ***$$

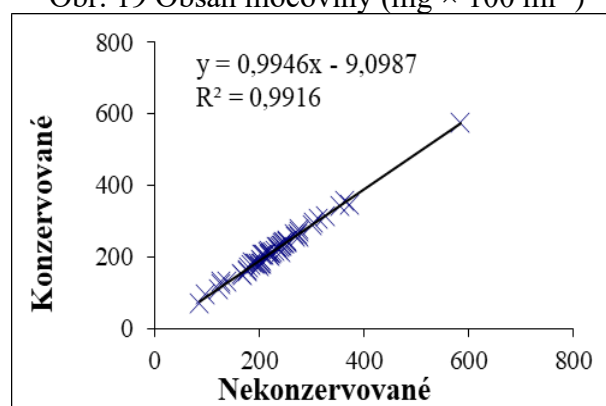
Obr. 18 Obsah celkové sušiny (%)



$$y = 0,9924x + 0,0889 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9994 \quad r = 1,000 ***$$

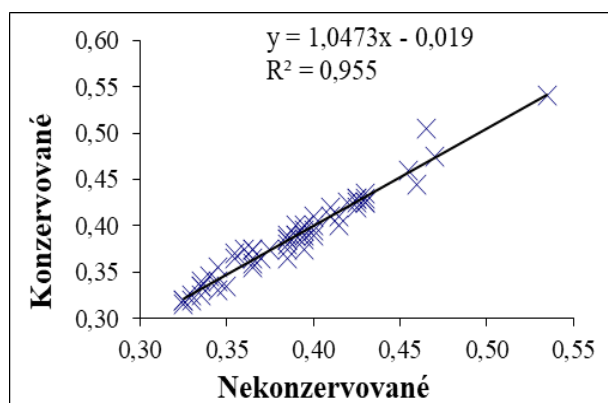
Obr. 19 Obsah močoviny (mg × 100 ml⁻¹)



$$y = 0,9946x - 9,0987 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9916 \quad r = 0,996 ***$$

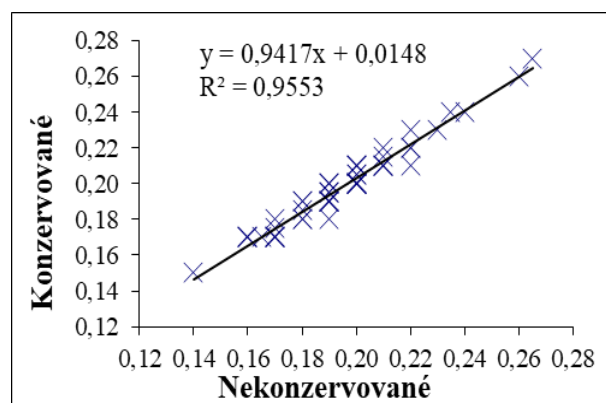
Obr. 20 Obsah volných mastných kyselin
v mléčném tuku (mmol × 100 g⁻¹ tuku)



$$y = 1,0473x - 0,019 \quad n = 60$$

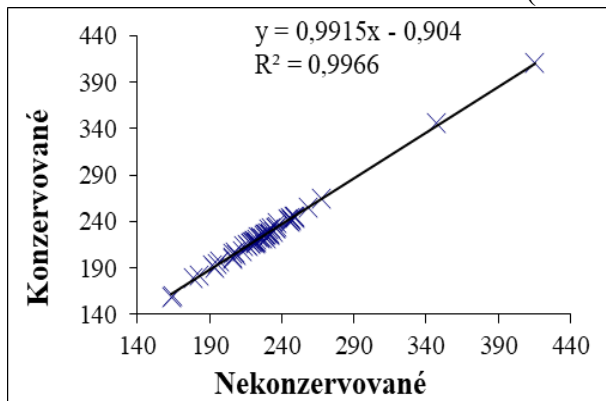
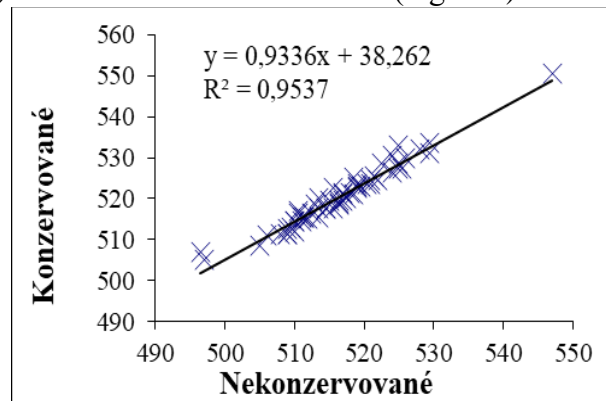
$$R^2 = 0,9550 \quad r = 0,977 ***$$

Obr. 21 Obsah kyseliny citrónové (%)



$$y = 0,9417x + 0,0148 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9553 \quad r = 0,977 ***$$

Obr. 22 Ekvivalent bodu mrznutí mléka ($^{\circ}\text{C} \times -10^3$)Obr. 23 Obsah laktoferinu ($\text{mg} \times \text{l}^{-1}$)

$$y = 0,9336x + 38,2622 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9537 \quad r = 0,977 \text{ ***}$$

$$y = 0,9915x - 0,904 \quad n = 60$$

$$R^2 = 0,9966 \quad r = 0,998 \text{ ***}$$

7.2.2 Počet koliformních bakterií

Tab. 4a Počet KFB v mléce konzervovaném Azidiollem a Heeschenovým činidlem

	Azidiol ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$)	Heeschenovo činidlo ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$)
<i>n</i>	26	26
<i>x</i>	584,1	214,0
<i>sx_v</i>	1497,9	431,2
<i>vx_v</i>	256,5	201,5
<i>sx</i>	1468,8	422,8
<i>vx</i>	251,5	197,6
min	6,0	4,0
max	7550,0	1450,0
<i>Rmax-min</i>	7544,0	1446,0
medián	121,5	28,8
horní q	45,5	83,0
dolní q	373,0	7,0

Tab. 4b Diference počtu KFB v mléce konzervovaném Azidiollem a Heeschenovým činidlem

	Azidiol – Heeschen
<i>n</i>	26
<i>d</i>	-370,1
<i>sd</i>	1180,8
min	-6100,0
max	44,0
<i>Rmax-min</i>	6144,0
medián	-79,2
horní q	-210,5
dolní q	-35,3

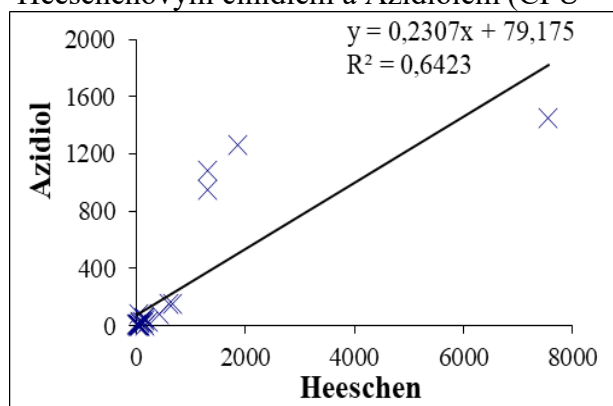
Tab. 4c Párový t-test

sv	25
t	1,57
významnost	ns

Vysvětlivky pro Tab. 4a až 4c:

n = počet případů; x = aritmetický průměr; g = geometrický průměr; sx_v = výběrová směrodatná odchylka; vx_v = variační koeficient výběrové směrodatné odchylky; sx = směrodatná odchylka průměru; vx = variační koeficient; min = minimum; max = maximum; Rmax-min = rozdíl maxima a minima; horní q = horní kvartil; dolní q = dolní kvartil; d = průměrná diference; sd = směrodatná odchylka průměrné diference; sv = stupně volnosti; t = testovací kritérium; ns = $P > 0,05$.

Obr. 24 Lineární regrese počtu KFB v mléce konzervovaném Heeschovým činidlem a Azidiolem ($\text{CFU} \times \text{ml}^{-1}$)



$$y = 0,2307x + 79,175$$

$$n = 26$$

$$R^2 = 0,6423$$

$$r = 0,801 ***$$