

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
2125316

**POROVNANIE KONZERVAČNÉHO ÚČINKU AZIDIOLU,
BRONOPOLU A KYSELINY BORITEJ VO VZORKÁCH
SUROVÉHO KRAVSKÉHO MLIEKA**

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

**POROVNANIE KONZERVAČNÉHO ÚČINKU
AZIDIOLU, BRONOPOLU A KYSELINY BORITEJ VO
VZORKÁCH SUROVÉHO KRAVSKÉHO MLIEKA**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Študijný program:	Technológia potravín 4170800 Spracovanie poľnohospodárskych
Študijný odbor:	produktov
Školiace pracovisko	Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Školiteľ:	Ing. Peter Zajác, PhD.
Konzultant:	Ing. Jozef Čapla

Čestné vyhlásenie

Podpísaný Erik Pindeš vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému:
„ Porovnanie konzervačného účinku azidiolu, bronopolu a kyseliny boritej vo vzorkách
surového mlieka.“ vypracoval samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomí zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú
pravdivé.

V Nitre 15. 4. 2011

.....
podpis

Pod'akovanie

Touto cestou si dovoľujem poďakovať vedúcemu diplomovej práce Ing. Petrovi Zajácovi, PhD. a konzultantovi diplomovej práce Ing. Jozefovi Čaplovi, za cenné rady, odbornú spoluprácu, vedenie a profesionálny prístup pri spracovaní mojej diplomovej práce.

Abstrakt

Diplomová práca je zameraná na pozorovanie konzervačného účinku kyseliny boritej, azidiolu, a bronopolu vo vzorkách surového kravského mlieka.

V tejto práci boli analyzované vzorky mlieka, ktoré boli konzervované tromi druhmi konzervačných činidiel a to kyselinou boritou, bronopolom a azidiolom. V práci sme sa zamerali na porovnanie účinku konzervačných činidiel.

Z meraní sme zistili, že najlepším konzervačným činidlom bol azidiol a následne bronopol a kyselina boritá. Priemerný pokles somatických buniek konzervovaných azidiolom počas 14 dní bol $16\,000\text{ SB.ml}^{-1}$, bronopolom $24\,000\text{ SB.ml}^{-1}$, kyselinou boritou $28\,000\text{ SB.ml}^{-1}$.

Z výskumu vyplynulo, že hodnoty somatických buniek podľa Normy STN 59 0529 v posledných dňoch výskumu pohybovali pod normu a to, pri azidole $258\,000\text{ SB.ml}^{-1}$, pri bronopole $158\,000\text{ SB.ml}^{-1}$, pri kyseline boritej $81\,000\text{ SB.ml}^{-1}$. Azidiol bol aj tak najlepším konzervačným činidlom.

Pri konzervovaní zložiek mlieka, konzervačnými činidlami sa obsah tuku, bielkovín, laktózy a bts pohyboval podľa Normy STN 59 0529, a aj v tejto časti výskumu mal azidiol najlepšie konzervačné účinky.

Kľúčové slová: kyselina boritá, azidiol, bronopol, tuk, bielkoviny, laktóza, bts, somatické bunky.

Abstract

The thesis is focused on observation of the preservative effect of boric acid, azidiol and bronopol in samples of raw cow's milk.

In this work were analyzed milk samples were preserved three kinds of preservatives and boric acid, and bronopol azidiol.

In this work we aimed to compare the effect of preservatives.

From the measurements, we found that the best preservative was azidiol and then bronopol and boric acid. The average decrease in somatic cell azidiol preserved for 14 days was 16 000 SB.ml⁻¹, bronopol 24 000 SB.ml⁻¹, boric acid 28 000 SB.ml⁻¹.

The research found that the levels of somatic cells, according to STN 59 0529 in the last days of research ranged from below normal and in azidiol 258 000 SB.ml⁻¹ in bronopol 158 000 SB.ml⁻¹, boric acid at 81 000 SB.ml⁻¹.

Azidiol was still the best preservative.

In the preservation of milk ingredients, preservatives, the contents of fat, protein, lactose and bts varied according to STN 59 0529, and in this part of the research should azidiol best preservative effects.

Keywords: boric acid, azidiol, bronopol, fat, protein, lactose, bts, somatic cells.

Obsah

Obsah

Obsah.....	6
Zoznam ilustrácií.....	8
Zoznam tabuliek.....	9
Zoznam skratiek.....	10
ÚVOD.....	11
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....	13
1.1 Proteolýza mlieka.....	13
1.2 Lipolýza mlieka.....	13
1.2.1 Rozdelenie lipolýzy.....	15
1.3 Somatické bunky.....	17
1.3.1 Somatické bunky – indikátor zdravotného stavu mliečnej žľazy.....	19
1.3.2 Somatické bunky a ich charakteristika.....	20
1.3.3 Zloženie somatických buniek.....	23
1.3.3.1 Bunky pochádzajúce z krvi.....	23
1.3.3.2 Bunky pochádzajúce z mliečnej žľazy.....	23
1.3.3.3 Bunky bieleho krvného obrazu.....	24
1.3.3.4 Bunky červeného krvného obrazu.....	24
1.3.4 Nebunkové útvary z mlieka.....	25
1.3.5 Právne normy a počet somatických buniek.....	25
1.4 Konzervačné látky.....	27
1.4.1 Azidiol.....	27
1.4.1.1 Azidiol ako konzervačný prostriedok pre mlieko.....	27
1.4.2 Bronopol.....	28
1.4.2.1 Enviromentálne dôkazy.....	30
1.4.2.2 Informácia o životnom prostredí.....	30
1.4.3 Kyselina boritá.....	31
1.4.3.1 Identifikácia nebezpečenstva.....	32

1.4.3.2 Výskyt kyseliny boritej.....	33
1.4.3.3 Manipulácia a skladovanie.....	33
2 Cieľ práce.....	34
3 Metodika práce.....	35
3.1 Odber vzoriek.....	35
3.2 Príprava vzorkovnic.....	36
3.2.1 Chemikálie.....	36
3.2.2 Pracovné pomôcky.....	36
3.2.3 Postup prípravy vzorkovnic.....	36
3.3 Prístroje.....	37
3.4 Postup merania.....	37
3.4.1 Prístroj Fossomatic 5000.....	37
3.4.2 Prístroj MilkoScan FT 120.....	37
3.5 Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov v surovom kravskom mlieku.....	38
3.5.1 Pracovné pomôcky.....	38
3.5.2 Zloženie riediaceho roztoku.....	38
3.5.3 Príprava živného média GTK agar.....	39
3.5.4 Príprava vzoriek.....	39
3.5.5 Rozbor vzoriek.....	39
3.6 Vyjadrenie a spracovanie výsledkov.....	40
4 Výsledky práce a diskusia.....	41
5. Návrh na využitie poznatkov.....	50
Záver.....	51
Zoznam použitej literatúry.....	53

Zoznam ilustrácií

Obr. 1 Vzorec bronopolu.....	28
Obr. 2 Využitie bronopolu.....	30
Obr. 3 Vzorec kyseliny boritej.....	31
Obr. 4 Priebeh zmeny počtu somatických buniek počas konzervácie kyselinou boritou....	41
Obr. 5 Priebeh zmeny počtu somatických buniek počas konzervácie azidiolom.....	42
Obr. 6 Priebeh zmeny počtu somatických buniek počas konzervácie bronopolom.....	43
Obr. 7 Celková bilancia konzervovaných vzoriek s jednotlivými činidlami.....	44
Obr. 8 Zmeny tuku po konzervácií jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.....	45
Obr. 9 Zmeny bielkovín po konzervácií jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.....	49
Obr. 10 Zmeny laktózy po konzervácií jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.....	47
Obr. 11 Zmeny beztukovej sušiny po konzervácií jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.....	48

Zoznam tabuliek

Tab. 1 Priemerný počet somatických buniek po dňoch laktácie a zdravotný stav dojníc....	17
Tab. 2 Zloženie somatických buniek v rôznych v rôznych mliečnych sekrétoch.....	21
Tab. 3 Triedy kvality mlieka na základe počtu SB podľa STN 57 0529	26
Tab. 4 Kategórie toxicity.....	32
Tab. 5 Somatické bunky konzervované kyselinou boritou počas jednotlivých dní skladovania.....	39
Tab. 6 Somatické bunky konzervované azidiolom počas jednotlivých dní skladovania.....	40
Tab. 7 Somatické bunky konzervované bronopolom počas jednotlivých dní skladovania..	41
Tab. 8 Priemerný pokles počtu somatických buniek počas 14 dní v tis./ml ⁻¹	44

Zoznam skratiek

VMK – vyššie mastné kyseliny

CO₂ – oxid uhličitý

MFGM – membrány tukových guľôčok mliečneho tuku

% - percento

°C – stupeň Celzia

PSB – počet somatických buniek

SB – somatické bunky

ml – mililiter

IMI – intramamárna infekcia

PMN – polymorfonukleárne leukocyty

ROS – reaktívne formy kyslíka

CMT – California mastitis test

µm - mikrometer

mm - milimeter

nm - nanometer

DNA – deoxyribonukleová kyselina

°F – stupeň Farhenheit

LD₅₀ – smrteľná dávka

LC₅₀ – letálna dávka

H₃BO₃ – kyselina boritá

C₃H₆BrNO₄ - bronopol

K₂Cr₂O₇ – dvojchróman draselný

mg - miligram

kg - kilogram

bts – beztuková sušina

Úvod

Mlieko je bežnou a najdôležitejšou potravinou, a taktiež je jediným zdrojom potravy v najrannejšom období života. Mlieko je zmes rôznych látok, z ktorých sú najdôležitejšie bielkoviny, tuky, laktóza, minerálne látky a iné významné zložky, ako napr. beztuková sušina, vitamíny, enzýmy, aminokyseliny a iné živiny. V mlieku prebiehajú po nadojení a počas jeho skladovania, rôzne rozkladné procesy.

Rozklad mliečnych bielkovín má samostatný význam v mliekarenskom priemysle. Molekuly bielkovín nedovoľujú preniknutiu do bunky, a preto sa musia rozložiť. Rozklad sa uskutočňuje pôsobením rôznych enzýmov a to proteínázami, peptidázami a následne sa bielkoviny rozložia na aminokyseliny, a potom sa rozkladajú na amoniak, sírovodík a CO_2 pôsobením amidáz a dezamidáz.

Lipolýza mlieka, teda rozklad mliečneho tuku, má za následok zvýšený obsah voľných mastných kyselín, čo spôsobuje vážne nedostatky pri spracovaní mlieka a mliečnych výrobkov v rôznych krajinách sveta. Lipolýza mliečneho tuku je podnecovaná mechanickými impulzmi pôsobiacimi na tukové guľôčky pri transporte mlieka v dojacom stroji a rovnako aj pri zvoze a mliekarenskom ošetrovaní mlieka. Lipolýza má za následok zvýšený obsah voľných mastných kyselín, čo sa prejaví ako žltnutie mlieka.

Celkový počet somatických buniek je jedným z hlavných ukazovateľov kvality mlieka. Somatické bunky sú leukocyty (biele krvinky). Počet somatických buniek sa zvyšuje pri reakcii s patogénnymi mikroorganizmami, ako je *Staphylococcus aureus*, ktorý je jednou z hlavných príčin vzniku mastitídy. Celkový počet somatických buniek je kvantifikovaný ako jedna bunka v jednom mililitri mlieka. Norma udáva celkový počet somatických buniek v dvoch triedach kvality, kde Q udáva maximálne 300 000 SB.ml⁻¹ a trieda I udáva maximálne 400 000 SB.ml⁻¹. Právne normy a prehľad celkového počtu somatických buniek uvádzame v kapitole právne normy a počet somatických buniek.

Na zachovanie celkového počtu somatických buniek sa používajú rôzne konzervačné činidlá, ako sú kyselina boritá, azidiol a bronopol. Kyselina boritá je biela pevná látka, používaná na konzervovanie vzoriek mlieka. Azidiol je číry roztok, ktorý má veľmi dobré konzervačné účinky a používa sa na zachovanie mliečnych vzoriek pre rutinné analýzy v laboratóriách mlieka. Bronopol obsahuje širokospektrálne konzervačné prostriedky, ktoré sú veľmi účinné proti gram-pozitívnym a gram-

negatívnym baktériám. Účelom konzervačných činidiel je predĺžiť trvanlivosť vzoriek mlieka a zachovať tak počet somatických buniek čo najbližšie k ich pôvodnému počtu. Dôležité je zachovať aj zložky mlieka ako sú tuk, bielkoviny, laktóza a beztuková sušina v pôvodnom zložení, ktoré udáva norma. Z toho vyplýva zistenie, aké konzervačné činidlo so svojim chemickým zložením má najlepšie konzervačné účinky na celkový počet somatických buniek a na zložky mlieka.

V práci analyzujeme účinok konzervačných činidiel na celkový počet somatických buniek a zložky mlieka. Metodiku skúšania vzoriek surového kravského mlieka konzervovaného konzervačnými činidlami sme uviedli v kapitole Metodika práce.

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Proteolýza mlieka

V mliekarstve má osobitný význam rozklad mliečnych bielkovín. Veľkosť molekuly bielkovín nedovoľuje prechod do bunky, preto sa musí rozložiť. Tento rozklad proteínázami a potom peptidázami až na aminokyseliny a ďalej amidázami a dezamidázami až na amoniak, prchavé kyseliny, sírovodík a CO₂ sa využíva najmä pri výrobe zrejúcich syrov.

Rozklad však nemusí prebiehať len po osi albumózy, peptóny, polypeptidy, aminokyseliny, dipeptidy, amoniak, CO₂, ale aminokyseliny môžu byť degradované na škodlivé amíny, na produkty hnitia: merkaptány, indol, sírovodík a i., čo vyvoláva rôzne chyby výrobkov.

Medzi typické proteolyty patria bacily, klostrídia, pseudomonády, druh *Enterococcus faecalis* var. *Liquefaciens*, rod. *Proteus*, *Micrococcus caseolyticus*. (Semjan, 1994).

1.2 Lipolýza mlieka

Lipolýza surového mlieka je spôsobená pôsobením mliečnej lipázy na mliečny tuk. Rýchle chladenie mlieka po dojení bráni vzniku lipolýzy. Účinok mechanickej aktivácie závisí nielen na teplote mlieka, ale aj na teplote počas mechanickeho spracovania, ale aj od druhu mechanickej úpravy a rôznych iných vlastností mlieka. Štúdiá o vplyve mechanických systémov dojenia na lipolýzu odhaľuje isté nejasnosti. Dojacie zariadenia vo všeobecnosti prispievajú len veľmi málo k lipolýze (Fleming, 1979).

Kravské mlieko obsahuje lipázy. Celková aktivita lipázy v surovom mlieku je dostatočná na to, aby spôsobila hydrolýzu veľkého podielu tuku. Fyzické poškodenie membrány v surovom mlieku iniciuje lipolýzu. Okrem toho, chladenie jednotlivých zložiek mlieka skoro po sekrécii môže spustiť tzv. spontánnu lipolýzu. Biochemický základ spontánnej lipolýzy je ešte nejasný, ale pravdepodobne súvisí s rovnováhou medzi aktiváciou a inhibíciou faktorov mlieka. Lipolýza v mlieku a

mliečnych výrobkov spôsobuje zatuchnutú chuť mlieka a iné problémy, a je trvalým problémom v mliekarenskom priemysle. (**Hilton, 2006**).

Lipolýza alebo hydrolyza lipidov, môže mať za následok vážne nedostatky v mlieku a mliečnych výrobkoch vo väčšine krajín mliekarenského priemyslu. Je to spôsobené činnosťou enzýmu lipáza, ktorý hydrolyzuje triacylglyceroly (triglyceridy), hlavné zložky mliečného tuku. Produkty tejto hydrolyzy sú voľné mastné kyseliny a monoglyceroly a diacylglyceroly. Voľné mastné kyseliny vzniknuté z mliečného tuku, najmä kyseliny s krátkym reťazcom ako sú, maslová, kapronová a kaprylová, môžu spôsobiť nepríjemnú chuť a vôňu mlieka. Mlieko je potom stuchnuté a má horkastú chuť.

Existujú 2 hlavné typy lipáz, ktoré spôsobujú problémy s mliekom a mliečnymi výrobkami:

1. mliečna lipáza, ktorá sa prirodzene vyskytuje vo všetkých zložkách surového mlieka
2. bakteriálne lipázy, ktoré sú produkované znečisťujúcimi baktériami.

Ďalšia skupina lipolytických enzýmov, ktoré môžu mať vplyv na mlieko a mliečne výrobky sú fosfolipázy. Tieto hydrolyzujú fosfolipidy, ktoré tvoria hlavnú zložku membrán tukových guľôčok mliečného tuku (MFGM), a môžu spôsobiť destabilizáciu týchto tukových guľôčok. Škoda na membráne spôsobuje čiastočné zlúčenie tukových kvapôčok a vytvára nevzhľadné škvrny tuku na povrchu horúcich nápojov (**Hilton, 2004**).

Rozklad mliečného tuku sa v mliekarstve uplatňuje pri výrobe plesňových syrov a v poslednej dobe sa stal aktuálnym v súvislosti s kyslosťou mliečného tuku.

Mliečny tuk je rozkladaný lipázou na glycerol a mastné kyseliny, ktoré sa ďalej rozkladajú rôznym spôsobom. Glycerol sa môže odbúravať Embden – Meyerhoffovou dráhou glykolýza a mastné kyseliny beta – oxidáciou (**Semjan, 1994**).

Najvýznamnejšie sú baktérie rodu *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Escherichia* a *Bacillus*. O enzýmoch psychrotrofných baktérií platí to isté čo bolo uvedené pri proteolýze.

Kyslosť mliečneho tuku je vo vzťahu k natívnej lipáze mlieka a bakteriálnym lipázam. Tieto hydrolyzujú tuk a uvoľňujú mastné kyseliny, ktoré ako tzv. voľné mastné kyseliny (VMK) sú mierou lipolytických zmien tuku (**Semjan, 1994**).

1. 2. 1 Rozdelenie lipolýzy

1. spontánna,
2. indukovaná,
3. mikrobiálna,

Spontána a indukovaná lipolýza sú vyvolané natívnou mliečnou lipázou, prítomnou v surovom mlieku, ktorá sa ničí pasterizáciou a mikrobiálnu lipolýzu spôsobujú značne rezistentné mikroorganizmy.

1. Spontána lipolýza – charakterizuje zvýšenie obsahu VMK v priebehu veľmi krátkeho času, bez ohľadu či sú poškodené membrány tukových guľôčok, či je mlieko chladené alebo nechladené. Vysvetľuje sa to tým, že mlieko obsahuje určité lipoproteíny, ktoré stimulujú pôsobenie lipáz a má nedostatok jej inhibítorov (**Semjan, 1994**).

V mlieku niektorých dojníc môže dôjsť k spontánnej lipolýze. Spontánna lipolýza sa začína počas chladenia mlieka, kedy sa mlieko schladí na teplotu menšiu ako 10 °C, t.j. hneď po jeho sekrécii z mliečnej žľazy a následne pokračuje v priebehu skladovania v chlade. Prevažná väčšina lipolýzy prebieha počas prvých dvanástich hodín skladovania. Mlieko od dojníc v neskoršej laktácii a zo zle živých dojníc je obzvlášť náchylné k tomuto typu lipolýzy (**Hilton, 2004**).

2. Indukovaná lipolýza – charakterizuje sa ako zvýšenie tukových guľôčok.

Dochádza k tomu po agregácii tukových guľôčok a vytvorení voľného tuku, ktorý sa tak sprístupnil lipázam a hydrolýze (**Semjan, 1994**).

3. Mikrobiálna lipolýza – je spôsobená mnohými druhmi mikroorganizmov, predovšetkým psychrotrofných pri hlbokom chladení mlieka a pri skladovaní pri nízkej teplote (**Semjan, 1994**).

V bežnej praxi sa obsah VMK zvyšuje pri každej operácii od nadojenia. Ak je v mlieku vo vemene 3 % VMK po strojovom vydojení je ich už 30 %, po prečerpaní do chladiacej nádrže až 60 % a po zvoze v skladovom tanku v mliekarni dokonca až 150 %. Po odstredení v smotane ich môže byť až 240 %.

Pre minimalizáciu lipolýzy je dôležité, že čím je vyšší počiatkový obsah voľných mastných kyselín v surovom mlieku, tým je vyšší ich obsah po namáhaní daného mlieka pri jeho spracovaní.

Počas roka sa pozoruje sezónnosť v obsahu VMK v mlieku, pričom najvyšší obsah sa všeobecne zisťuje v poslednom štvrtroku: to znamená, že v tomto období je mlieko rizikové.

Proti lipolýze treba robiť opatrenia v prvovýrobe aj pri spracovaní mlieka. Na farme sú to predovšetkým tieto:

- vyhnúť sa veľkému podielu starodojných kráv v stáde (až 4 – násobne vyššia náchylnosť na spontánnu lipolýzu je na konci laktácie) znížením sezónnosti telenia a pravidelným zasúšaním (**Semjan, 1994**).
- kŕmiť dojnice kvalitným krmivom s dostatkom energie,
- redukovať napadnuté stáda mastitídou,
- nevoliť krátke intervaly medzi dojeniami ale dodržiavať 12 hodinové,
- zabrániť intenzívnemu nasávaniu vzduchu do mlieka pri dojení,
- zabezpečiť správnu sanitáciu a minimálnu kontamináciu mlieka hlavne psychrotrofnými baktériami,
- dôkladne ochladiť mlieko na 2 – 4 °C po nadojení, bez tepelných výkyvov,
- nemiešať teplé mlieko po nadojení s vychladeným mliekom,
- nemiešať intenzívne mlieko osobitne pri vyššej teplote.

Pri spracovaní mlieka mnohé platí už z uvedeného. Okrem toho netreba mlieko dlho skladovať v tankoch, homogenizovať mlieko tesne pred pasterizáciou, neodstreďovať a nečistiť mlieko pri teplotách pod 45 °C, využiť prípadne termizáciu na potlačenie rastu psychrotrofných baktérií, smotanu neudržiavať medzi 25 až 45 °C, nezmrazovať (**Semjan, 1994**).

1. 3 Somatické bunky

Sú nám známe rôzne faktory, ktoré majú vplyv na PSB. Existuje množstvo faktorov, ktoré ovplyvňujú počet somatických buniek u jednotlivých stád a na rozdiel od intramammárnej infekcií. Počet somatických buniek sa zvyšuje s postupujúcou laktáciou (neskoré laktácie) bez ohľadu na to, či je krava nakazená alebo nie (**Doho - Meek, 1982**).

Zvýšenie počtu somatických buniek bolo spojené s vrodenu imunitou zvieratá v príprave na telenie ako obranný mechanizmus v kritickej dobe telenia (**Reichmuth, 1975**).

Počas skorej a neskej laktácie podiel neutrofilov inklinuje k zvýšeniu, zatiaľ čo percento lymfocytov klesá (**McDonald, Anderson, 1981**).

Počas pôrodu je počet somatických buniek vyšší ako jeden milión na mililiter, a znižuje sa na 7 až 10 deň po pôrode na hodnotu 100 000 SB.ml⁻¹. Prítomnosť vysokého počtu somatických buniek bola tiež hlásená v mledzive a to kvôli nadmernej deskvamácií epiteliálnych buniek v malom objeme mlieka (**Jensen, Eberhart, 1981**).

Tabuľka 1 Priemerný počet somatických buniek po dňoch laktácie a zdravotný stav dojníc (Harmon, 1994)

Somatické bunky				
Zdravotný stav				
Laktácia (dni)	Všetky kravy	Žiadne	Minoritné patogénny	Majoritné patogény
0 - 49	380	164	247	839
50 - 99	429	138	286	861
100 - 149	498	125	240	1068
150 - 199	399	126	295	735
200 - 249	452	208	240	902
250 - 299	445	139	267	758
> 300	634	165	374	1031

Felkl et al. (1995) sa zaoberali vplyvom kŕmenia na PSB. Za najdôležitejšie nedostatky považujú, chyby ktorými sú: kosenie mladých porastov pri uskladnení krmiva, prehnojenie dusíkom a uskladnenie krmiva. Skrmovanie kŕmnych dávok v letných mesiacoch vysvetľuje zvýšenie PSB. Rýchle zmeny kŕmnych dávok majú vplyv na metabolizmus, zvýšia sa hnačkové stavy, čo sa náhle prejavuje vo zvýšení počtu somatických buniek.

Rôzni výskumníci hlásili, že počet somatických buniek sa vekom zvyšuje (**Beckley, Johnson, 1966; Blackburn, 1966**).

Toto zvýšenie je spôsobené predovšetkým zvýšeným výskytom infekcie u starších kráv a nie kvôli nejakému veľkému nárastu s ohľadom na vek sám o sebe (**Reichmuth, 1975**).

Počet somatických buniek je všeobecne najnižší v zime a najvyšší v letnom období (**Khate, Yadav, 2010**).

Počas leta počet baktérií narastá hlavne vďaka priaznivým teplotám a vlhkosti prostredia. (**Harmon, 1994**).

Hanuš a Foltýs (1991) uvádzajú, že v bazénových vzorkách mlieka v šľachtiteľských chovoch u prvôstok je 211 000 SB.ml⁻¹ a u starších kráv 309 000 SB.ml⁻¹.

Počet somatických buniek v 1 ml mlieka je u zdravých dojníc spravidla niekoľko desiatok tisíc až 300 000 SB.ml⁻¹. V mlieku dojníc so zapálenou a podráždenou mliečnou žľazou rapídne stúpa počet leukocytov, pričom PSB dosahuje miliónové hodnoty. Okrem zdravotného stavu PSB v mlieku ovplyvňuje aj laktačné štádium, vek, sezóna, stresory a i. (**Frančáková, 2005**).

Škarda et al. (1989) uvádzajú, že okrem faktorov, ktoré ovplyvňujú PSB sú hygiena ustajnenia a dojenia, funkcia dojacích strojov a technika dojenia, stresory.

Z pohľadu spracovateľa je PSB ukazovateľom technologickej vhodnosti mlieka hlavne na výrobu syrov a fermentovaných výrobkov. Podľa stupňa a rozsahu ochorenia sa zvyšuje množstvo chlóru a sodíka, znižuje sa množstvo, vápnika, draslíka, horčíka, fosforu, ale aj tuku a laktózy. Zvyšuje sa obsah enzýmov, najmä lipázy a katalázy a zisťuje sa ich vyššia účinnosť. Zvýšený obsah srvátkových bielkovín a znížené množstvo kazeínu znižuje termostabilitu mlieka a tak sťažuje výrobu zahusteného, kondenzovaného a sušeného mlieka. So stúpajúcim sa PSB v dôsledku zmien v zložení

mlieka zhoršuje syriteľnosť, znižuje sa pevnosť a kvalita syreniny, zhoršuje sa lisovanie a mení sa aj sensorika finálneho výrobku (**Teubner et al., 2003**).

Keresteš (2005) uvádza, že klesá titračná kyslosť mlieka so stúpajúcim PSB a objavujú sa poruchy prekysávania mlieka pri výrobe fermentovaných výrobkov, pretože je inhibovaný rozvoj čistých mliekarenských kultúr.

Varchola (2004) popisuje, že somatické bunky, klinické mastitídy a ďalšie poruchy zdravia sú predmetom selekcie a súčasťou indexov v krajinách Škandinávie skoro 20 rokov. Tlak je možný vidieť hlavne na počte SB, kedy priemerný obsah somatických buniek v tanku v Škandinávií je menší než 200 000 SB.ml⁻¹ mlieka, zatiaľ čo priemer v tanku v USA je 320 000 SB.ml⁻¹ mlieka. Tieto krajiny nedosiahli až taký vysoký pokrok v produkcii ako v USA, ale dosiahli významný pokrok v šľachtení na celkové zdravie stáda.

1. 3. 1 Somatické bunky – indikátor zdravotného stavu mliečnej žľazy

Hlavným indikátorom pri zisťovaní mastitídnych ochorení sú somatické bunky. U zdravej dojnice 50 % PSB tvoria biele krvinky. Somatické bunky sa skladajú z viacerých typov buniek vrátane makrofágov, lymfocytov, neutrofilov, eozinofilov a rôznych epiteliálnych buniek mliečnej žľazy. Somatické bunky v mlieku zdravej dojnice patria prevažne k makrofágom. Ak je mliečna žľaza napadnutá mikrobiálnou infekciou, u prevládajúcich typov somatických buniek dochádza k zmene v množstve aj rozmeroch (**Bengin - Bérešová et al., 2006**).

Somatické bunky sú ukazovateľom oboch rezistencií a náchylnosti kráv na mastitídy a môžu byť použité na monitorovanie výskytu subklinickej mastitídy v stádach alebo u jednotlivých kráv. Počet somatických buniek je užitočným prediktorom intramamárnej infekcií (IMI), a preto je dôležitou súčasťou mlieka pri hodnotení aspektov kvality, hygieny a mastitídy. Napriek tomu mnohí výrobcovia nedokážu plne pochopiť dôsledky počtu somatických buniek na zdravotný stav vemena alebo ako vysoké počty somatických buniek môžu ovplyvniť produkciu mlieka a kvalitu.

Somatické bunky majú ochrannú úlohu pri infekčných chorobách mliečnej žľazy. Fyziologicky normálne množstvo somatických buniek v mlieku nadojenom zo zdravého vemena je približne od 20 000 do 200 000 SB.ml⁻¹. Podľa Medzinárodnej mliekárskej federácie má mlieko zdravej štvrtky mliečnej žľazy obsahovať menej ako 250 000 SB.ml⁻¹. Práve zvýšený počet somatických buniek odráža vážnosť ochorenia

dojnice a poškodenia mliečného tkaniva. Množstvo neutrofilov je v zdravej štvrti s intramammárnou infekciou Neutrofily tvoria väčšinu somatických buniek v mliečnej žľaze infikovanej patogénnymi mikroorganizmami. Prechod neutrofilov do infikovanej mliečnej žľazy je normálnou súčasťou obranného mechanizmu, ktorý je veľmi efektívny pri ničení väčšiny vzniknutých infekcií.

PSB je ovplyvnený aj laktačnou fázou tak, že hneď po pôrode je PSB vysoký, ale rýchlo klesá na normálnu hodnotu v priebehu 4-5 dní po otelení. Ku koncu laktačnej periódy PSB rastie pomaly.

PSB mlieka je tiež ovplyvnený aj frekvenciou dojenia. Prechod z dvakrát za deň na trikrát denne ukázalo pokles PSB bazénovej vzorky, dlhé dojacie intervaly zvyšujú PSB bazénového mlieka (**Bengin - Bérešová et al., 2006**).

1. 3. 2 Somatické bunky a ich charakteristika

Somatické bunky sú hlavne epitelové bunky mlieka, ktoré pochádzajú zo žľazy alebo bielych krviniek (leukocytov), ktorých počet stúpol dôsledku reakcií na poranenie alebo infekciu (**Dairyman, 2009**).

Somatické bunky sú zložené z viacerých typov buniek, ktoré zahŕňajú polymorfonukleárne makrofágy, lymfocyty, leukocyty, a epitelové bunky. Náhle zvyšovanie počtu somatických buniek v mlieku prudko narastá v počiatočných fázach zápalu vemena a znižuje sa až jeho liečením. Somatické bunky, predovšetkým neutrofilné leukocyty majú veľmi dôležitú ochrannú úlohu voči infekcii vemena. Ich hlavnou úlohou je fagocytovať a zničiť infekčné agens (**Grieger, Holec et al., 1990**).

Somatické bunky obsahujú 75 % leukocytov, t.j. neutrofilov, makrofágy, lymfocyty, erytrocyty, a 25 % epitelových buniek. Koncentráciu erytrocytov, možno nájsť v rozmedzí od 10^6 buniek.ml⁻¹ (**Paap et al., 1985**).

Typy buniek v mlieku ukázali, že epitelové bunky alebo bunky, ktoré produkujú mlieko, sú zriedka nájdené v sekrétoch vemena v rozmedzí 0 až 7 % z bunkovej populácie (**Lee et al., 1980**).

Biele krvinky slúžia ako obranný mechanizmus, v boji proti infekcii a pomáhajú pri oprave poškodeného tkaniva. Pri zápale dochádza k zvýšeniu počtu somatických

buniek kvôli prílivu neutrofilov do materského mlieka, ktoré bojujú proti infekcii a ich počet bol odhadnutý na viac než 90 %. (Miller, Paap, 1985; Harmon, 1994).

Zloženie somatických buniek sa líši podľa typu sekrécie (tab.2). Počet somatických buniek v mlieku zo zdravých mliečnych žliaz, je nižší ako 10^5 buniek.ml⁻¹, zatiaľ čo bakteriálna infekcia môže spôsobiť zvýšenie počtu 10^6 buniek.ml⁻¹ (Bytyqi et al., 2010).

Tabuľka 2 Zloženie somatických buniek v rôznych mliečnych sekrétoch (Opdebeeck, 1982)

Somatické bunky				
Typy výlučkov mliečnej žľazy	PMN	Makrofágy	Lymfocyty	Epitelové bunky
Mlieko	3	80	16	2
Mledzivo	62	35	4	0
Suché žľazy	3	89	7	1

Neutrofilny polymorfonukleárny (PMN) leukocytov sú druhou obrannou líniou proti infekciám mliečnej žľazy. PMN sú fagocytujúce bunky, ktoré obklopia a ničia baktérie (Opdebeeck, 1982).

Zápal sa zvyčajne začína vtedy, keď baktérie preniknú do mliečnej žľazy, struku, kanála a začnú sa množiť v mlieku. Hoci bakteriálne toxíny, enzýmy a bunkové steny - komponenty majú priamy vplyv na funkciu epitelu mliečnej žľazy, ale tiež stimulujú produkciu mnohých mediátorov zápalu, najmä neutrofilov (Gallin et al., 1992), v dôsledku edému, vazodilatácií a zvýšenej priepustnosti ciev (Nonncke et al., 1986).

Krvné monocytne makrofágy sa nachádzajú v tkanivách a sú hlavným typom buniek v mlieku v priebehu involúcie mliečnej žľazy. Pri bakteriálnej patogenéze, môžu makrofágy slúžiť na uľahčenie buď vrodenej alebo získanej imunity. Počas laktácie, je podiel makrofágov najvyšší (68 %) v skorom období po pôrode a najnižší (21 %) na konci laktácie (Park et al., 1992).

Lymfocyty sú jediné bunky imunitného systému, ktoré majú rôzne antigénne štruktúry a definujú ich špecifickosť, rozmanitosť a znaky (Boys et al., 2007).

T-lymfocyty a B-lymfocyty sú dve podmnožiny lymfocytov, ktoré sa líšia vo funkcii a majú špecifické imunitné funkcie (**Harmon, 2001**).

Frančáková (2005) uvádza, že počet somatických buniek (PSB) v mlieku je ukazovateľom technologickej, ale aj hygienicko – zdravotnej kvality. Mlieko obsahuje viaceré druhy a rozličné počty buniek, ktoré sú veľmi dôležitým kritériom zdravotného stavu vemena a hygienickej kvality mlieka. V mlieku sa nachádzajú bunky samotného vemena (epitelové bunky cisterien, bunky sekrečného epitelu, mliekovodných ciest a bunky z kože vemena) a tiež bunky pochádzajúce z krvného obehu dojnice (leukocyty – monocyty, granulocyty, erytrocyty a lymfocyty).

Mlieko obsahuje viaceré druhy a rozličné počty somatických buniek, ktoré sú významným kritériom funkčného i zdravotného stavu vemena a hygienickej kvality mlieka.

V mlieku sa nachádzajú bunky z vemena a bunky z krvi. Medzi prvé patria epitelsekrečné bunky, kolostrálne bunky, epitelové bunky cisterien, z ceckového kanálika a z kože cecka. Medzi bunky z krvi patria erytrocyty (zriedkavé), granulocyty (polymorfonukleárne leukocyty), ktoré sa rozdeľujú podľa farbivosti granúl, lymfocyty, monocyty, (v normálnom mlieku príležitostné) a ostatné bunkové elementy (degenerované bunky – pseudopolymorfné, albuminofory, Nissenove telieska a i.).

Relácia jednotlivých leukocytov je rozdielna v mledzive, normálnom mlieku a mlieku dojníc so zápalom vemena.

V mlieku zo zdravého vemena SB predstavujú hlavne epiteliálne bunky mliekovodov a v malom množstve ochranné bunky z krvi – leukocyty a i. napr. lymfocyty. V 1 ml mlieka je ich spravidla niekoľko desiatok tisíc až 300 000 SB.ml⁻¹, v pomere 6 : 3 : 1. (**Semjan, 1994**).

V mlieku dojníc s podráždeným a zapáleným vemenom sa značne zvyšuje počet leukocytov, ktorých počet môže prevýšiť aj 10 miliónov v 1 ml⁻¹. Pri mastitíde sa zvyšuje počet polymorfonukleárných leukocytov, čo vyjadruje tzv. leukocytové číslo t.j. pomer medzi počtom mononukleárných leukocytov. V mlieku v zdravej mliečnej žľaze je polymorfonukleárných leukocytov asi 30 – 40 %, kým zo zapálenej až 90 %.

Podľa medzinárodnej mliekárskej federácie bol normálny počet somatických buniek do 500 000 v 1 ml mlieka.

Podľa počtu somatických buniek v mlieku (geometrický priemer 6 pozorovaní za sebou pri odbere 1 vzorky mesačne) klasifikuje zdravotný stav vemien v stáde **Tolle (1984)** takto:

Veľmi dobrý	< 125 000 PSB.ml ⁻¹
Dobrý	125 000 až 250 000 PSB.ml ⁻¹
Priemerný	250 000 až 375 000 PSB.ml ⁻¹
Nedostatočný	375 000 až 500 000 PSB.ml ⁻¹
Problematický	> 500 000 PSB.ml ⁻¹

Zvýšený počet somatických buniek v mlieku jednotlivých štvrtiek vemena je v zápornom vzťahu s produkovaným množstvom mlieka. Udávajú sa tieto straty mlieka: počet somatických buniek do 150 tisíc žiadne, od 100 a 200 tisíc 1,88 %, od 200 do 500 tisíc 3,76 %, od 500 tisíc do 1 mil. 8,92 %, od 1 mil. do 2 mil. 10,73 % a nad 10 mil. 42,72 %.

V mlieku dojnic s poruchami mliečnej žľazy sa vyskytujú aj vločky fibrínu, ktoré spolu s nukleovými kyselinami s leukocytov a lúhom alebo povrchovoaktívnymi látkami spôsobujú gelovatenie mlieka, čoho sa využíva pri rýchlych testoch na posudzovanie zdravotného stavu mliečnej žľazy (CMT – California mastitis test, Whitesideov test, NK – test a i.) (**Semjan, 1994**).

1. 3. 3 Zloženie somatických buniek

1. 3. 3. 1 Bunky pochádzajúce z krvi

Sekrečný parenchým mliečnej žľazy je priepustný pre bunky krvi. Táto priepustnosť sa zvyšuje pri nevhodnej sekrécie mlieka (**Grieger, Holec et al., 1990**).

1. 3. 3. 2 Bunky pochádzajúce z mliečnej žľazy

Na koži povrchu vemena, struku a strukových vývodov sa nachádza dlaždicový vrstevnatý epitel. Bunky vrstevnatého dlaždicového epitelu majú tvar oválnych alebo polygonálne zvrásnených útvarov s príležitostne sa vyskytujúcimi fragmentmi jadier.

Z mliečnych cisterien a väčších mliekovodov pochádza cylindrický epitel. Je dvojvrstvový, jeho bunky sú oválne až obdĺžnikovité, s excentricky uloženým jadrom. Epitelové bunky pochádzajú zo sekrečných alveol a drobných mliekovodov. Majú guľovitý, až mierne oválny tvar a excentricky uložené jadro (**Grieger, Holec et al., 1990**).

1. 3. 3. 3 Bunky bieleho krvného obrazu

Kováčik et al. (1996) popisuje bunky bieleho krvného obrazu. Podľa tvaru, veľkosti jadra a schopnosti farbenia sa možno u leukocytov rozlíšiť lymfocyty (lymfocyty B, lymfocyty T, nešpecializované lymfocyty), monocyty (makrofágy), a granulocyty (neutrofilny, eozinofily, bazofily). Monocyty sú 15 – 20 µm veľké bunky, s laločnatým alebo obličkovitým jadrom, excentricky uloženým. Lymfocyty sú veľké 6 – 18 µm, vyznačujú sa veľkým, guľatým a modro zafarbeným jadrom. Lymfocyty vyplňajúci takmer celý obsah bielej krvinky. Granulocyty sú bunky, ktoré majú v začiatočnom štádiu tyčinkové jadro. Jadro sa starnutím rozpadá na 2 – 5 segmentovaných častí. Veľkosť granulocytov je 10 – 20 µm.

Neutrofilné leukocyty sa v mlieku vyskytujú najčastejšie zo všetkých typov leukocytov. Môžeme sa s nimi stretnúť v štádiu segmentovaných jadier, najčastejšie sú segmentované na 2 až 3 diely. Tieto bunky majú vyvinutú fagocytárnu schopnosť. (**Grieger, Holec et al., 1990**).

1. 3. 3. 4 Bunky červeného krvného obrazu

Sú zložené z erytrocytov. Erytrocyty sa za použitia bežných farbív nedajú zistiť. Zisťujeme ich pri ťažkých formách zápalu vemena, pri poranení vemena, najmä pri poranení strukových vývodov (**Grieger, Holec et al., 1990**).

1. 3. 4 Nebunkové útvary z mlieka

Pri mikroskopickej analýze mlieka sa mliečna žľaza javí ako jemne sieťovaný alebo homogénny povlak. Jeho prítomnosť môžeme zistiť, v mlieku dojnic, ktoré majú vemenó postihnuté zápalom, ale aj u starodojníc kráv v mledzive pri jeho vyšetrení.

Mikroskopovanie je veľmi dobré na pozorovanie kazeínu, ktorý sa javí v podobe jemne vyzrážaných vločiek a veľmi dobre sa dá pozorovať pri vyšetrení nakysnutého mlieka.

Mliečne konkrementy sú okrúhle útvary rôznych veľkostí (1-200 μm) s intenzívne zafarbeným centrom. Niekedy je možné vidieť aj koncentrické vrstvenie. Tvoria sa v centre mliečnej žľazy v okolí vločky zrazeného kazeínu alebo rozpadnutej bunky. Konkrementy sa vyskytujú často v starodojnom a v kolostrálnom mlieku (**Grieger, Holec et al., 1990**).

1. 3. 5 Právne normy a počet somatických buniek

Podľa nariadenia (ES) č.853/2004 v znení nariadenia komisie (ES) č. 1662/2006, nariadenia komisie (ES) č.1020/2008 a nariadenia komisie (ES) č. 1243/2007, ktoré stanovujú špecifické hygienické pravidlá pre potraviny živočíšneho pôvodu musia: prevádzkovatelia potravinárskych podnikov musia začať postupy, aby sa zabezpečilo, že surové mlieko spĺňa nasledujúce: ak ide o kravské mlieko tak počet somatických buniek (na ml) by malo byť $\leq 400\,000$ (**).

(**) Kľzavý geometrický priemer za obdobie troch mesiacov pri najmenej jednej vzorke za mesiac, pokiaľ príslušný orgán neurčí inú metodiku kvôli zohľadneniu sezónnych odchýlok v množstvách produkcie.

Ak surové mlieko nespĺňa podmienky musí to prevádzkovateľ potravinárskeho podniku oznámiť príslušnému orgánu a prijať opatrenia na nápravu tohto stavu.

Počer somatických buniek v surovom kravskom mlieku v Slovenskej republike taktiež upravuje norma **STN 57 0529 (1999)**. Surové kravské mlieko na mliekarenské ošerrenie a spracovanie. Kritérium pre počer somatických buniek v surovom kravskom mlieku v bazénovej vzorke je maximálne 400 000 somatických buniek . ml⁻¹.

Počer somatických buniek (PSB) v surovom mlieku je kvalitatívny znak, aj na základe tohto ukazovateľa sa mlieko zatrieduje do výslednej triedy kvality:

**Tabuľka 3: Triedy kvality mlieka na základe počtu somatických buniek podľa
STN 57 0529 (1999)**

Trieda kvality mlieka	
Q	I
maximálne 300 000 SB.ml ⁻¹	maximálne 400 000 SB.ml ⁻¹

Zajác (2005) uvádza, že v jednotlivých krajinách sveta sú rozdielne limity pre počet somatických buniek v surovom kravskom mlieku.

Krajiny podieľajúce sa výrazným spôsobom na exporte mlieka ako Nový Zéland, Austrália a Švajčiarsko prijali ako maximálny limit pre tento ukazovateľ hranicu 400 000 SB.ml⁻¹.

Na Novom Zélande sa dokonca uvažuje o hranici 300 000 SB.ml⁻¹. V Kanade je limitom hranica 500 000 SB.ml⁻¹ a uvažuje sa o znížení tejto hranice tiež na úroveň

400 000 SB.ml⁻¹. V USA je limitom dokonca až hranica 750 000 SB.ml⁻¹. Z pohľadu medzinárodného obchodu krajiny, ktoré sprísnilo kritériá v oblasti somatických buniek vyvážajú väčšie množstvo mlieka.

1. 4 Konzervačné látky

1. 4. 1 Azidiol

Azidiol sa často používa na uchovanie mlieka z odobratých vzoriek pre rutinné analýzy. Je zložený z azidu sodného (**Rapp, Münch, 1984**).

1. 4. 1. 1 Azidiol ako konzervačný prostriedok pre mlieko

Aby bolo možné zhodnotiť možnosť použitia rovnakej vzorky mlieka pre rôzne analýzy v laboratóriách, sa zisťovalo použitie azidiolu. Azidiol je konzervačná kvapalina pre chemické, bakteriologické a cytologické hodnotenie. Azidiol bol pridaný po nadojení do polovice vzoriek, ostatné boli použité ako porovnávacie vzorky. Analýzy mlieka boli vykonané za použitia infračerveného žiarenia (MilkoScan), BactoScan a prístroja Fossomatic (**Rapp, Munch, 1984**).

Najlepšie je keď máme rovnaké konzervované vzorky, používané pre účely chemického, bakteriologického a cytologického hodnotenia mlieka (**Rapp, Munch, 1984**), (**Jennette, Grapin, 1979**).

Niekoľko látok (**Ardo, 1982; Dunham et al, 1978; Ngkwai, Hayes, 1982; Sandhi et al, 1984; Schmidt, Madsen, 1979; Zakir et al, 1984.**), ktoré spĺňajú základné požiadavky a boli použité na zachovanie vzoriek mlieka pre rutinné analýzy laboratórií mlieka. Skúšanie a hľadanie ideálnych konzervačných činidiel pre mlieko stále pokračuje.

Vzorky mlieka sa analyzovali na tuk, bielkoviny a laktózu pomocou infračerveného žiarenia na prístroji MilkoScan. Bunky boli počítané prístrojom Fossomatic podľa manuálu výrobcu a štandardných metód pre počítanie somatických buniek v mlieku. Bakteriologické hodnotenie bolo vykonané prístrojom BactoScan. Skladované vzorky boli testované každý deň (**Anon, 1978**).

Azidiol môže byť pre svoju kvalitu použitý pre chemické, bakteriologické, cytologické hodnotenia mlieka. Vzorky mlieka zotrvali na svojom pôvodnom zložení od dojenia až po analýzu (**Kennedy et al, 1982; Kwon, Kim, 1982; Raimond, Kroger, 1974**).

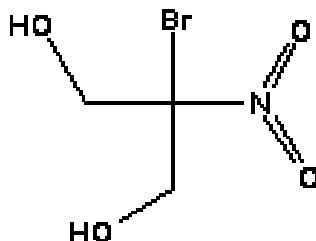
1. 4. 2 Bronopol

Molekulárny vzorec bronopolu je $C_3H_6BrNO_4$

Molekulová hmotnosť je 199.988

INCI: 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol

Štruktúrny vzorec:



Obr. 1 Vzorec bronopolu (www.webbook.nist.gov, 2011)

Iné názvy -

- 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol,
- 2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol,
- ROCIMA™ 614,
- BNPD,
- BIOBAN™ Bronopol PC Preservative,
- BIOBAN BP-Plus Preservative,
- BIOBAN BP-M Antimicrobial.

Bronopol (2-bromo-2-nitro-1, 3-propándiolu) je konzervačný prostriedok používaný v kozmetickom priemysle, a taktiež sa používa na konzervovanie vzoriek mlieka (Ardö, 1979).

Účinnosť 0,02 % bronopolu je dobrá (Cronshaw, Groves, 1964).

Roztok 0,05% bronopolu nie je dráždivý (Maibach, 1977).

Bronopol je spoločný názov pre 2 - bromo - 2 - nitropropan - 1 ,3 – diol. Je biela až takmer biela kryštalická látka v podstate bez zápachu.

Bronopol je spoločný názov pre účinnú látku v sérii širokospektrálnych antimikrobiálnych agentov na trhu Dow Chemical Company pod obchodnými názvami BIOBAN™ a ROCIMA™ (Bioban™, 2007); Bioban (2007).

Bronopol sa používa ako biocíd a konzervačná kvapalina v papierňach, na výrobu paliva a nádrží na skladovanie ropy **Bioban, (2007); Reregistration Eligibility Decision, (1995)**.

Bronopol je schválený ako konzervačný prostriedok pre mlieko a taktiež pre kozmetické výrobky s maximálnou povolenou úrovňou 0,1% a je nutné, aby sa zabránilo tvorbe nitrozamínov **(Bioban, 2007), (Reregistration Eligibility Decision, 1995)**.

Medzi produkty patria: • BIOBAN bronopol PC Preservative - kryštalická látka

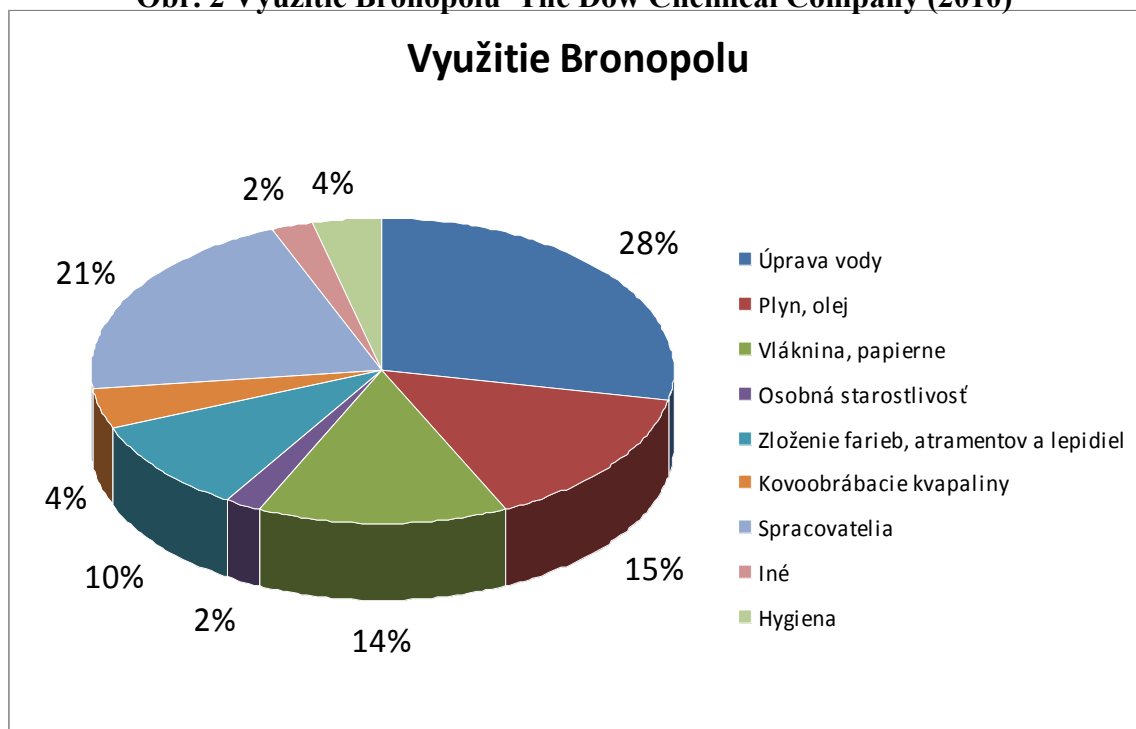
• BIOBAN BP-Plus Preservative – pevná kryštalická látka

Tieto výrobky sú obzvlášť účinné proti gram-pozitívnym a gram-negatívnym baktériám a baktériám z kmeň ako *Pseudomonas aeruginosa* **The Dow Chemical Company, (2010)**.

Tieto výrobky sú tiež vyrábané v koncentráciách (10%, 14%, 30% a 40%), ktoré sa riedia s propylénglykolom alebo vodou do formy roztoku alebo vo vode rozpustných bezfarebných až žltých kvapalín **The Dow Chemical Company, (2010)**.

Bronopol je rozpustný vo vode a obsahuje široko spektrálne konzervačné prostriedky, ktoré sú vysoko účinné proti obom Gram-pozitívnym a gram-negatívnym baktériám. Udrží svoju činnosť v aniónovom, kationovom a neiónovom systéme. Používa sa v koncentráciách menších ako 0,1 %, čo poskytuje nákladovo efektívne uchovanie, a to aj proti *Pseudomonas aeruginosa*. Je veľmi stabilný v kyslom prostredí **(www.inolex.com, 2011)**.

Obr. 2 Využitie Bronopolu The Dow Chemical Company (2010)



1. 4. 2. 1 Enviromentálne dôkazy

Malé množstvo bronopolu môže byť prepustené do životného prostredia pri používaní prípravkov, ktoré ho obsahujú. Vzhľadom k tomu, že je zmes náchylná na biologický rozklad ako je hydrolýza, bude sa rozkladať v prostredí aj napriek odstráneniu pomocou čistiarne odpadových vôd. Látka je veľmi vysoko toxická pre vodné organizmy, ryby, riasy. V prípade úniku, je kladený vysoký dôraz na uniknutú látku, aby sa zabránilo kontaminácií pôdy a povrchových vôd. Po spotrebovaní, by sa mali zhromažďovať zvyšky vo vhodných a riadne označených kontajneroch na likvidáciu (**BIOBAN™, 2007**); (**Reregistration Eligibility Decision, 1995**).

1. 4. 2. 2 Informácie o životnom prostredí

Bronopol má nízku prchavosť, a odparovanie z produktov, ktoré ho obsahujú to bude minimálne. Látka je veľmi rozpustná vo vode, a má veľkú tendenciu viazať sa na molekuly vody. Má minimálnu tendenciu viazať sa na pôdu alebo sedimenty.

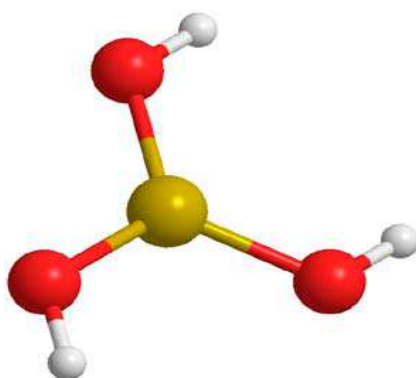
Je nepravdepodobné, že pretrvá v životnom prostredí. Látka je citlivá na biologický rozklad a hydrolýzu. Chemikálie budú odstránené z vody, pôdy a životného

prostredia, vrátane biologických čistiacich odpadových vôd. Nie je pravdepodobné, že sa hromadí v potravinovom reťazci (bioakumulačný potenciál je nízky) a je veľmi vysoko toxický pre vodné organizmy, predovšetkým riasy, na báze akútneho stavu (Bioban, 2007); (Reregistration Eligibility Decision, 1995).

1. 4. 3 Kyselina boritá

Molekulárny vzorec je pre kyselinu boritú H_3BO_3

Kyselina boritá má molekulárnu hmotnosť 61,83



Obr. 3 Vzorec kyseliny boritej

Kyselina boritá a jej soli boritanu sodného sú účinné zložky pesticídov používané proti hmyzu, pavúkom, roztočom, riasam, plesniam, hubám, a burinám. Oni boli najprv registrovaná ako pesticídy v Spojených štátoch v roku 1948 a znovu zapísané v roku 1993. Soli boritanu obsahujú sodík dekahydrátu tetraboritanu sodného, tetraboritanu pentahydrátu, sodík tetraboritanu (bezvodý bórax), dihydrát octaborate tetrahydrát, dihydrát octaborate (bezvodý), a sodík metaboritanu **Reregistration Eligibility Decision Document, (1993).**

Kyselina boritá je odvodená z bóru, je prirodzene sa vyskytujúci prvok, v horninách, pôde a vode. Bór je univerzálny v životnom prostredí a zvyčajne sa vyskytuje vo forme boritanov alebo v kombinácii s inými chemickými látkami **World Health Organization, (1998); Woods, (1994); Eisler, (1990).**

Kyselina boritá je obvykle biela pevná látka, ale môže byť aj jasná až nepriehľadná. Je bez zápachu a vo všeobecnosti stabilná za okolitých podmienok **Reregistration Eligibility Decision Document, (1993).**

1. 4. 3. 1 Identifikácia nebezpečenstva

Kyselina boritá je zdraviu škodlivá pri požití alebo vdýchnutí. Spôsobuje podráždenie pokožky, očí a dýchacích ciest. Neovplyvňuje centrálny nervový systém, pečeň a obličky **Reregistration Eligibility Decision Document, (1993)**.

Rastliny vyžadujú malé množstvo bóru, ale vysoké koncentrácie sú pre nich toxické **Woods, (1994)**.

Kyselina boritá je herbicíd, ktorý narušuje fotosyntézu a spôsobuje vysychanie rastlín **Reregistration Eligibility Decision Document, (1993)**.

Mechanizmus toxicity u zvierat nie je známy **Clarkson, (1991)**.

Kyselina boritá je nízko toxická pre podráždenie očí a kože. Výnimkou je sodík tetraboritanu (bezvodý bórax), ktorý je vysoko toxický pre oko **Reregistration Eligibility Decision Document, (1993)**.

Tabuľka 4: U.S. Environmental Protection Agency, (2000)

Kategórie toxicity				
	Vysoko toxický (hrozba)	Mierne toxický (upozornenie)	Nízko toxický (pozor)	Veľmi nízko toxický (pozor)
Ústne LD ₅₀	menej ako 50 mg.kg ⁻¹	50 – 500 mg.kg ⁻¹	500 – 5000 mg.kg ⁻¹	Väčší ako 5000 mg.kg ⁻¹
Kožne LD ₅₀	menej ako 200 mg.kg ⁻¹	200 – 2000 mg.kg ⁻¹	2000 – 5000 mg.kg ⁻¹	Väčší ako 5000 mg.kg ⁻¹
Inhalácia	menej ako 0,05 mg.kg ⁻¹	0,05 – 0,5 mg.kg ⁻¹	0,5 – 2 mg.kg ⁻¹	Väčší ako 2 mg.kg ⁻¹
Účinky na oči	korozívne	Podráždenie pretrváva po dobu 7 dní	Reverzibilné podráždenie do 7 dní	Minimálne účinky do 24 hodín
Účinky na kožu	korozívne	Závažné podráždenie po 72 hodinách	Mierne podráždenie po 72 hodinách	Mierne podráždenie

1. 4. 3. 2 Výskyt kyseliny boritej

Kyselina boritá sa prirodzene vyskytuje v ovzduší, vo vode (povrchové a podzemné vody), v pôde a rastlinách, vrátane poľnohospodárskych plodín. Vstupuje do životného prostredia zvetrávaním hornín, ztekaním z morskej vody, a sopečnej činnosti **World Health Organization, (1998)**.

Medzi produkty, kyseliny boritej v oblasti životného prostredia patria poľnohospodárske chemikálie, zavlažovanie odpadovou vodou, spracovanie a spaľovanie uhlia **Eisler, (1990) ; World Health Organization, (1998)**.

1. 4. 3. 3 Manipulácia a skladovanie

Uchovávať v dobre uzavretej nádobe, uloženej v chlade do teplého počasia, 2 až 40°C. Chrániť pred fyzickým poškodením. Skladovať v oceľových alebo hliníkových kontajneroch. Nerezová oceľ je nutná pre vlhké podmienky. Používať správne postupy hospodárenia, aby sa zabránilo hromadeniu prachu a udržiavať častice vo vzduchu na nízkej úrovni. Dôkladné umytie rúk po manipulácii s týmto materiálom. Vyhnite sa kontaktu najmä, keď je koža porezaná **(www.jtbaker.com, 2009)**.

Kyselina boritá je anorganická kyselina používaná ako konzervačná a dezinfekčná látka pre vedecké analýzy mlieka a následne aj v kozmetike, poľnohospodárstve, zdravotníctve a veterinárnej oblasti (pre zachovanie biologickej vzorky, ako je moč na bakteriologické analýzy) **García-Graells et al.(2003)**.

Zmes kyseliny boritej (kyselina boritá, glycerol, sorban draselný) bola úspešne používaná na konzerváciu vzoriek mlieka podrobenej bakteriologickej analýze. **Heeschen et al. (1969) a Pettipher, Rodrigues (1982)**.

2 Cieľ práce

Cieľom teoretickej časti práce je vytvoriť literárny prehľad o porovnaní konzervačného účinku azidiolu, bronopolu a kyseliny boritej vo vzorkách surového kravského mlieka.

Cieľom praktickej časti práce je porovnať konzervačný účinok jednotlivých druhov konzervačných činidiel na udržanie celkového počtu somatických buniek a zložiek mlieka v surovom kravskom mlieku na požadovanej hladine.

V diplomovej práci sme sa snažili nájsť prostredníctvom praktického výskumu, činidlo s najvhodnejším konzervačným účinkom.

3 Metodika práce

Pri štúdiu poznatkov o súčasnom stave riešenej problematiky sa využívali rôzne literárne zdroje obsahujúce informácie publikované zahraničnými a slovenskými autormi. Podľa poznatkov z dostupných literárnych zdrojov sa po ich dôkladnom naštudovaní vypracoval literárny prehľad diplomovej práce. Pri vypracovaní literárneho prehľadu sa použili predovšetkým informácie z kníh, vedeckých a odborných časopisov, legislatívy, diplomových a bakalárskych prác, noriem a technických dokumentov, ktoré sú k dispozícii v dostupných elektronických databázach na internete, v Slovenskej poľnohospodárskej knižnici a prípadne iných knižniciach.

V praktickej časti sme porovnali konzervačný účinok kyseliny boritej, bronopolu a azidiolu v surovom kravskom mlieku. Pripravili sme si vzorky mlieka a následne konzervačné činidlá. Následne každý deň výskumu, ktorý trval 14 dní sme stanovili počet somatických buniek a zloženie mlieka, ktoré boli konzervované kyselinou boritou, azidiolom a bronopolom. Počet somatických buniek sme stanovovali prístrojom Fossomatic 5000 a zložky mlieka prístrojom MilkoScan FT 120 počas celých 14 dní výskumu.

3.1 Odber vzoriek

Praktická časť bola vykonaná nasledovne: Odobrali sme vzorky mlieka z mliečneho automatu pred internátu Antona Bernoláka, ktorý sa nachádza v blízkosti Vysokej školy Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre. Mlieko v automate sa skladuje pri teplote do 10 °C. Vzorku mlieka sme odobrali do sterilnej vzorkovnice o objeme 500 ml mesiaca apríl 2010. Vzorky mlieka boli odobraté podľa normy **ISO 707:2010**. Po odobratí sme celý objem 500 ml vzorky uložili do termoboxu a prepravili na Štátny Veterinárny ústav v Nitre. Počas prepravy sme vzorku mlieka prepravovali pri 10 °C.

Po prepravení na pracovisko sme mlieko ihneď dôkladne premiešali a rozliali do 30 ml sterilných vzorkovnic bez konzervačných činidiel, ktoré sme uchovávali pri chladničkových teplotách 4 ± 2 °C počas celého experimentu. Vzorkovnice boli sterilné, aby nedošlo ku skresleným výsledkom pri výskume.

3.2 Príprava vzorkovníc

3.2.1 Chemikálie

- kyselina boritá – Lachema, a.s. Neratovice, Česká republika,
- azidiol – Merck Chemicals Slovakia, KGaA,
- bronopol – Centralchem Bratislava.

3.2.2 Pracovné pomôcky

- vzorkovnice mlieka o objeme 30 ml,
- kovový kôš,
- sušiareň 80 ± 2 °C,
- poloautomatická pipeta,
- nástavce na pipety,
- odmerné sklo,
- ochranné pracovné pomôcky.

3.2.3 Postup prípravy vzorkovníc

Vzorkovnice, pre potreby nášho výskumu boli o objeme 30 ml. Počas nášho výskumu sme použili 30 kusov vzorkovníc. Vzorkovnice sme dôkladne vysušili v sušiareni pri teplote 80 ± 2 °C, počas 6 hodín, je to tzv. technické sušenie. Znečistené vzorkovnice by mohli spôsobiť skreslené výsledky počas výskumu. Plastové vzorkovnice sme si uložili do kovových košov. K dispozícii sme mali 3 kusy kovových košov. V každom z nich sme mali po 10 plastových vzorkovníc.

Potom sme si tekutú vzorku mlieka o objeme 500 ml prelievali do vzorkovníc o objeme 30 ml a toto sme opakovali 30-krát. Po tomto postupe sme si pripravili kyselinu boritú, a to tak že do 1000 ml destilovanej vody sme pridali 51 g kyseliny boritej a následne sme si celý objem dôkladne premiešali. Následne sme do prvých 10 – tich vzorkovníc napipetovali kyselinu boritú o objeme 50 μ l pomocou poloautomatickej pipety. Do ďalších 10 – tich vzorkovníc sme pridali azidiol o objeme 100 μ l za použitia poloautomatickej pipety, ktorý sme neriedili. Zvyšných 10 vzoriek mlieka sme nakonzervovali prídavkom 0,036 g bronopolu do každej z nich. Nakonzervované

vzorky mlieka sme uskladnili v chladničke pri teplote 4 ± 2 °C do druhého dňa, nášho výskumu. Následne sme počas 14 dní sledovali účinok konzervačných činidiel voči rozkladným procesom. Celý experiment trval 14 dní.

3.3 Prístroje:

- Fossomatic 5000 – Stanovenie počtu somatických buniek prietokovou cytometriou
- MilkoScan FT 120 – Stanovenie tuku, bielkovín, laktózy a beztukovej sušiny.

3.4 Postup merania

Merania sme uskutočnili v 14 dňovom časovom intervale, počas jednotlivých dní a to: 10.3.2010; 11.3.2010; 12.3.2010; 15.3.2010; 16.3.2010; 19.3.2010; 22.3.2010.

Počas experimentu sme skúšali počet somatických buniek a zložky mlieka v surovom kravskom mlieku, konzervovaných kyselinou boritou, azidiolom a bronopolom.

3.4.1 Prístroj Fossomatic 5000

Princíp stanovenia prístrojom Fossomatic 5000 je založený na zafarbení SB, ktoré sú potom elektronicky počítané. Prietoková cytometria je založená na princípe prechodu malého množstva vzorky pod počítačovou jednotkou prístroja. Malé množstvo vzorky prechádza cez počítačiacu jednotku, ktorá vytvorí veľmi tenký kúsok vzorky. Vzorka je potom hnaná pod vysokým tlakom cez prietokovú kyvetu. Ako náhle sa vzorka zafarbí fluorescenčnou látkou je v kyvete vystavená modrému svetlu o vlnovej dĺžke 450 Nm. Pri meraní sme postupovali podľa interného pracovného postupu NRLM.

3.4.2 Prístroj MilkoScan FT 120

Princíp stanovenia funguje na princípe infračerveného spektrofotometra.

Vo vzorkách mlieka sa stanovuje obsah tuku, bielkovín, laktózy a beztukovej sušiny. Pred začatím stanovenia sa prístroj musí nechať temperovať asi 1 hodinu. Vytemperovaná vzorka na teplotu 40 ± 1 °C sa dôkladne premieša a vloží sa pod

nasávaciu pipetu meracej jednotky prístroja a zaháji sa jej analýza. Výsledky analýz sa automaticky zaznamenávajú na obrazovke počítača.

Po ukončení merania sa prístroj vyčistí celým cyklom čistenia, vynuluje sa a nasávacia pipeta sa nechá ponorená v roztoku pre nastavenie nuly.

Pri meraní sme postupovali podľa interného pracovného postupu NRLM.

3.5 Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov v surovom kravskom mlieku

3.5.1 Pracovné pomôcky

- Erlenmayerove banky,
- pipety,
- skúmavky,
- miešadlá,
- autokláv,
- zátky,
- odmerné valce,
- pH meter,
- Petriho misky s priemerom 90 mm.

Použitú sklo sme pred vlastnou analýzou sterilizovali horúcim suchým vzduchom pri teplote 160 °C počas 3 – 3,5 hodiny. Sklo sme následne balili do hliníkovej fólie.

Aby sme zabezpečili konštantnú teplotu počas kultivácie, tak sme použili termostat s teplotou 30 °C ±1 °C.

3.5.2 Zloženie riediaceho roztoku

Podľa normy **STN ISO 6887 (1997)** sme použili fyziologický roztok s peptónom.

- 100 ml destilovanej vody,
- 0,85 g NaCl,

-
- 0,1 g peptónu pre bakteriológiu.

V destilovanej vode sme rozpustili všetky navážené zložky. Roztok sme rozliali do sterilných baniek a zazátkovali. Roztok sme v autokláve sterilizovali pri teplote 121 °C počas 20 minút.

3.5.3 Príprava živného média GTK agar

Pri sledovaní celkového počtu mikroorganizmov sme použili živné médium GTK agar. Pripravili sme 100 ml média. Použili sme 100 ml destilovanej vody a 2,35 g GTK agaru na dané množstvo média. Médium GTK agar sme zmiešali so stanoveným množstvom destilovanej vody. Pripravené médium sme sterilizovali v autokláve pri teplote 121 °C počas 20 minút.

3.5.4 Príprava vzoriek

Nakonzervované vzorky mlieka kyselinou boritou, azidiolom a bronopolom sme dôkladne premiešali prevracaním. Do skúmavky sme napipetovali 9 ml fyziologického roztoku s peptónom. Zo vzorky sme napipetovali automatickou pipetou 1 ml konzervovaného mlieka kyselinou boritou, azidiolom a bronopolom k riediacemu roztoku v sterilnej skúmavke. Získali sme základné riedenie. Postup sme opakovali až do dosiahnutia potrebného riedenia. Robili sme riedenie 10^{-3} a 10^{-4} . Na každé riedenie bol použitý nový hrot automatickej pipety a pri prenášaní vzorky sa hrot nesmel dotknúť riediaceho roztoku. Vzorky v procese riedenia sa premiešajú hrotom pipety, ktorá sa použije na nasledujúce riedenie a to pomocou vortexu tak aby sa vytvoril požadovaný výr. (STN EN ISO 4833: 2004).

3.5.5 Rozbor vzoriek

Stanovenie celkového počtu mikroorganizmov – STN ISO 4833: 2004

Konečné riedenie sme inokulovali po 1 ml súběžne do dvoch Petriho misiek. Inokulum sme zaliali po 45 min 15 ml sterilnej živnej pôdy GTK agar s teplotou 44 °C - 47 °C. Kruhovým pohybom sme Petriho misky dôkladne premiešali na pracovnom stole a následne nechali stuhnúť na chladnej vodorovnej ploche. Petriho misky sme po stuhnutí média inkubovali v termostate obrátené hore dnom pri

teplote 30 °C 72 hod. ±3 hod. Vykonali sme skúšku na sterilitu pôdy, fyziologického roztoku s peptónom a ovzdušia. Kontrolu sterility pôdy sa robila naliatím 15 ml do Petriho misky. Kontrolu fyziologického roztoku s peptónom sme robili zaliatím 1 ml fyziologického roztoku s peptónom 15 ml média. Kontrolu ovzdušia sme robili, tým že sme naliali 15 ml média do Petriho misky, ktorú sme nechali otvorenú 15 minút. Petriho misky s kontrolami sa vložili do termostatu spolu s Petriho miskami so vzorkami a inkubovali sa rovnako (**STN EN ISO 4833: 2004**).

3.6 Vyjadrovanie a spracovanie výsledkov

Výsledky nášho výskumu sme spracovali v PC v programe Microsoft Excel 2007.

Hodnoty somatických buniek a jednotlivé zložky mlieka (tuk, bielkoviny, laktóza a beztuková sušina), sme spracovali vo forme grafov. Somatické bunky sme porovnali podľa Normy **STN 57 0529 (1999)**, ktorá udáva 2 triedy kvality a to Q maximálne 300 000 SB.ml⁻¹ a I maximálne 400 000 SB.ml⁻¹, zložky mlieka sme porovnali taktiež podľa Normy **STN 57 0529 (1999)**, ktorá udáva obsah tuku v surovom kravskom mlieku 3,2 g.100g⁻¹, obsah bielkovín v surovom kravskom mlieku min. 2,8g.100g⁻¹, laktóza v surovom kravskom mlieku min. 4,6g.100g⁻¹, a beztuková sušina min. 8,5g.100g⁻¹.

Celkový počet mikroorganizmov sme vyjadrili:

Pre výpočet CPM sa používajú misky, ktoré majú najviac 300 kolónií v 2 po sebe nasledujúcich riedeniach. Jedna z misiek by mala obsahovať min. 10 kolónií. Celkový počet mikroorganizmov sme vypočítali podľa vzorca:

$$N = \frac{\Sigma C}{0,0022}$$

Σc - súčet všetkých kolónií spočítaných na vybraných Petriho miskách

Výsledky sme vyjadrili pre počet mikroorganizmov v 1g alebo v 1ml⁻¹.

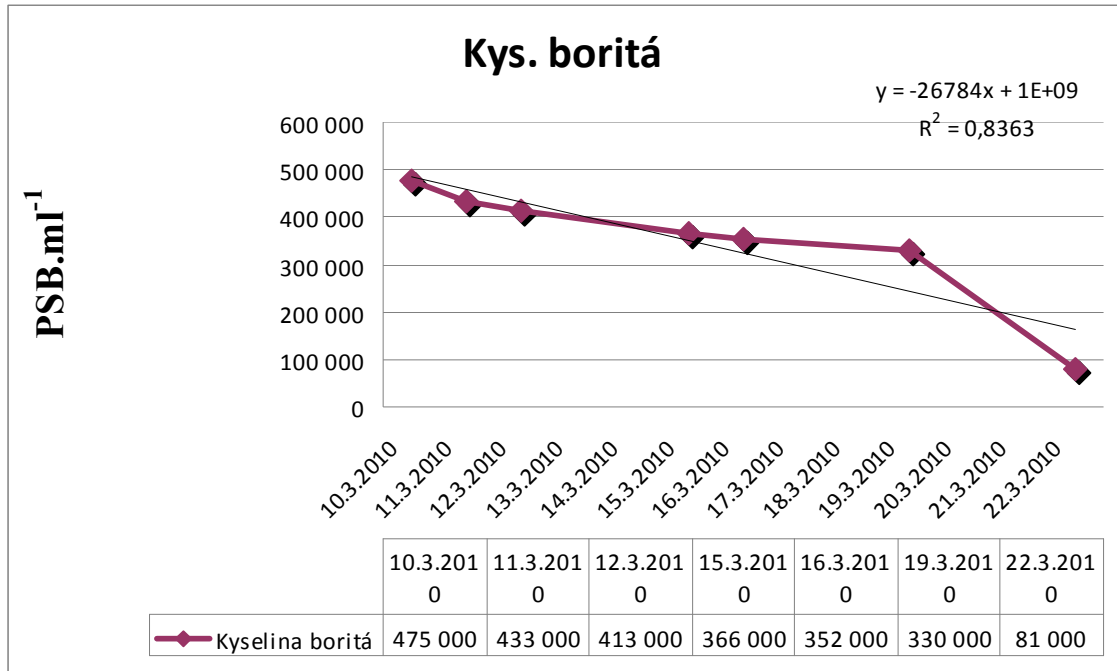
4 Výsledky práce a diskusia

Vplyv konzervačných činidiel na celkový počet somatických buniek v surovom kravskom mlieku.

Vzorka mlieka konzervovaná konzervačným činidlom kyseliny boritej.

Tabuľka 5 Somatické bunky konzervované kyselinou boritou počas jednotlivých dní skladovania.

Jednotlivé dni	Počet somatických buniek po konzervácii
10.3.2010	475 000 SB.ml ⁻¹
11.3.2010	433 000 SB.ml ⁻¹
12.3.2010	413 000 SB.ml ⁻¹
15.3.2010	366 000 SB.ml ⁻¹
16.3.2010	352 000 SB.ml ⁻¹
19.3.2010	330 000 SB.ml ⁻¹
22.3.2010	81 000 SB.ml ⁻¹



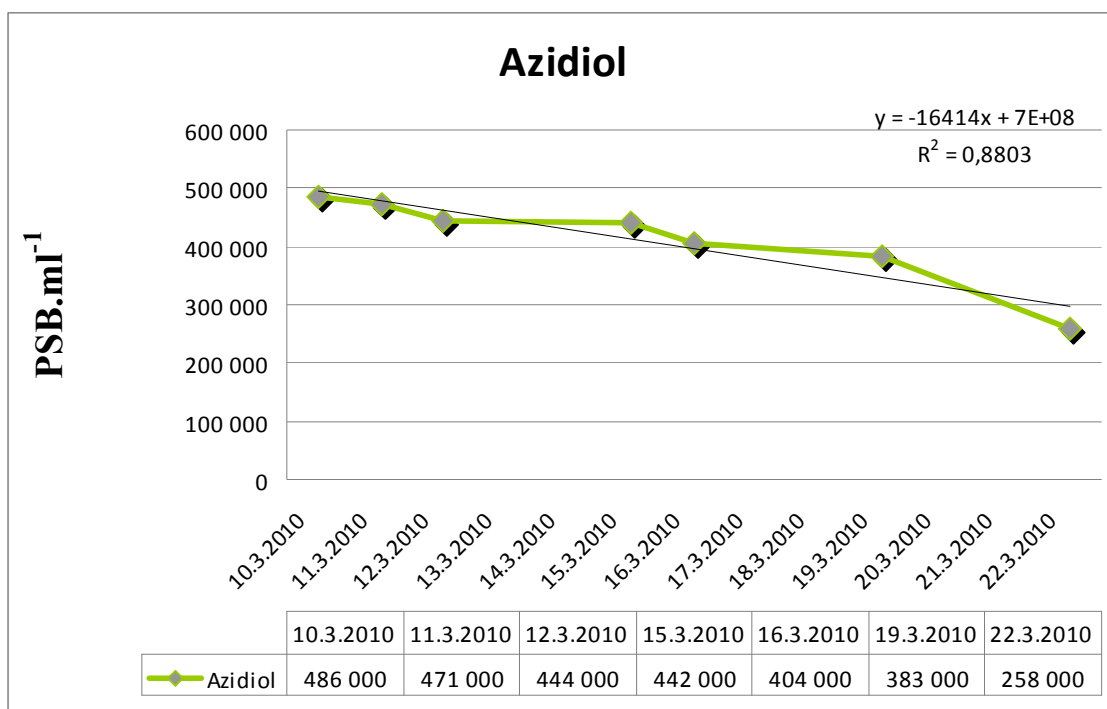
Obr. 4 Priebeh zmeny počtu somatických buniek počas konzervácie kyselinou boritou.

Z výskumu vyplynulo, že priemerný pokles počtu somatických buniek pri reakcii s kyselinou boritou, počas 14 dňovej konzervácie je v priemere 28 000 SB.ml⁻¹.

Vzorka mlieka konzervovaná konzervačným činidlom - azidiol.

Tabuľka 6 Somatické bunky konzervované azidiolom počas jednotlivých dní skladovania.

Jednotlivé dni	Počet somatických buniek po konzervácii
10.3.2010	486 000 SB.ml ⁻¹
11.3.2010	471 000 SB.ml ⁻¹
12.3.2010	444 000 SB.ml ⁻¹
15.3.2010	442 000 SB.ml ⁻¹
16.3.2010	404 000 SB.ml ⁻¹
19.3.2010	383 000 SB.ml ⁻¹
22.3.2010	258 000 SB.ml ⁻¹



Obr. 5 Priebeh zmeny počtu somatických buniek počas konzervácie azidiolom.

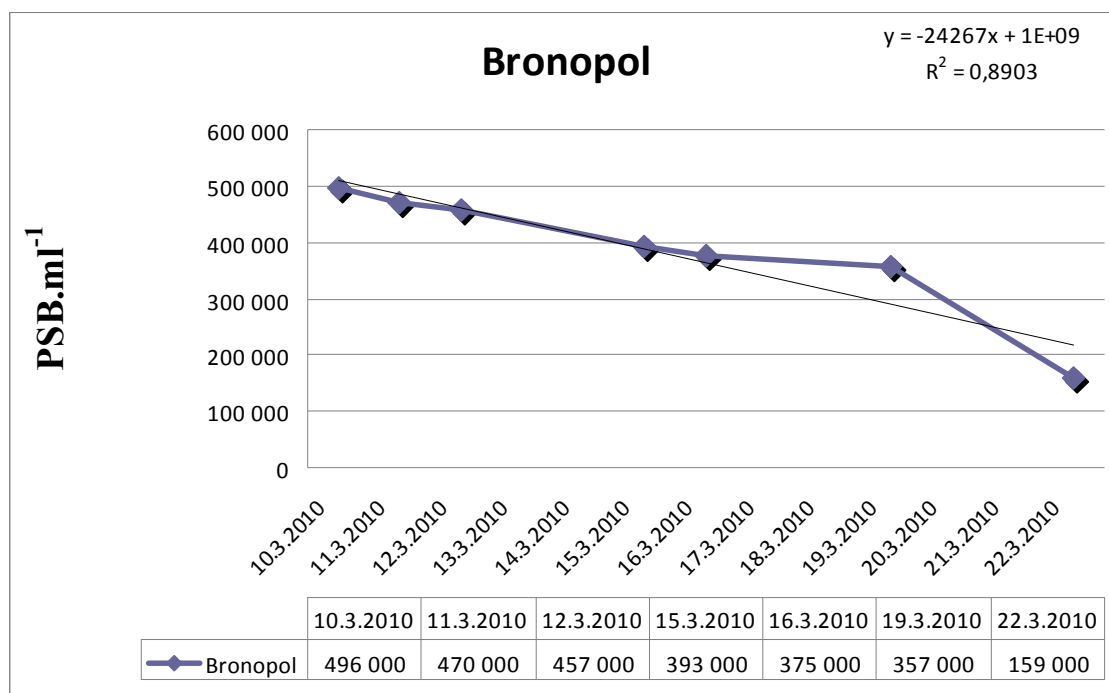
Z uvedeného vyplýva že priemerný pokles počtu somatických buniek pri reakcii s azidiolom, počas 14 dňovej konzervácie je v priemere 16 000 SB.ml⁻¹.

Rapp, Munch, (1984) udávajú, že azidiol ako najlepšie konzervačné činidlo, má najlepší vplyv na zachovanie celkového počtu somatických buniek, čo najbližšie k požadovanej hodnote.

Vzorka mlieka konzervovaná konzervačným činidlom bronopolu.

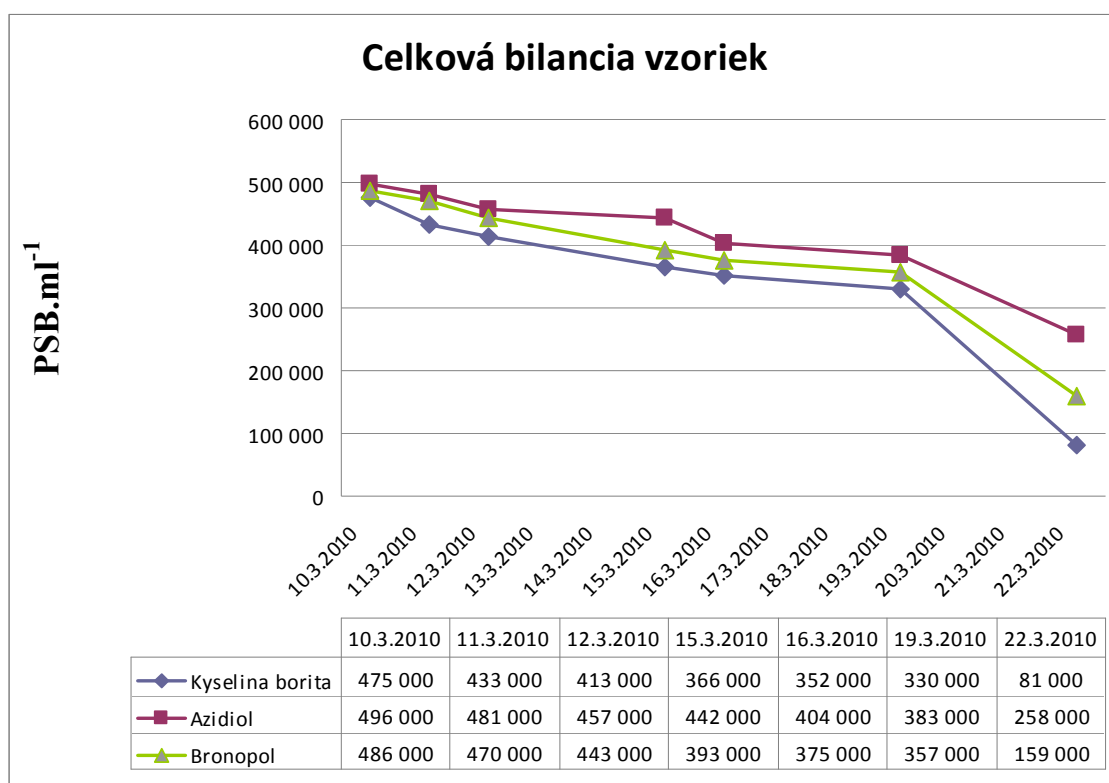
Tabuľka 7 Somatické bunky konzervované bronopolom počas jednotlivých dní skladovania.

Jednotlivé dni	Počet somatických buniek po konzervácii
10.3.2010	496 000 SB.ml ⁻¹
11.3.2010	470 000 SB.ml ⁻¹
12.3.2010	457 000 SB.ml ⁻¹
15.3.2010	393 000 SB.ml ⁻¹
16.3.2010	375 000 SB.ml ⁻¹
19.3.2010	357 000 SB.ml ⁻¹
22.3.2010	159 000 SB.ml ⁻¹



Obr. 6 Priebeh zmeny počtu somatických buniek počas konzervácie bronopolom.

Z výskumu vyplynulo, že priemerný pokles počtu somatických buniek pri reakcii s bronopolom, počas 14 dňovej konzervácie je v priemere 24 000 SB.ml⁻¹.



Obr. 7 Celková bilancia konzervovaných vzoriek s jednotlivými činidlami.

Tabuľka 8

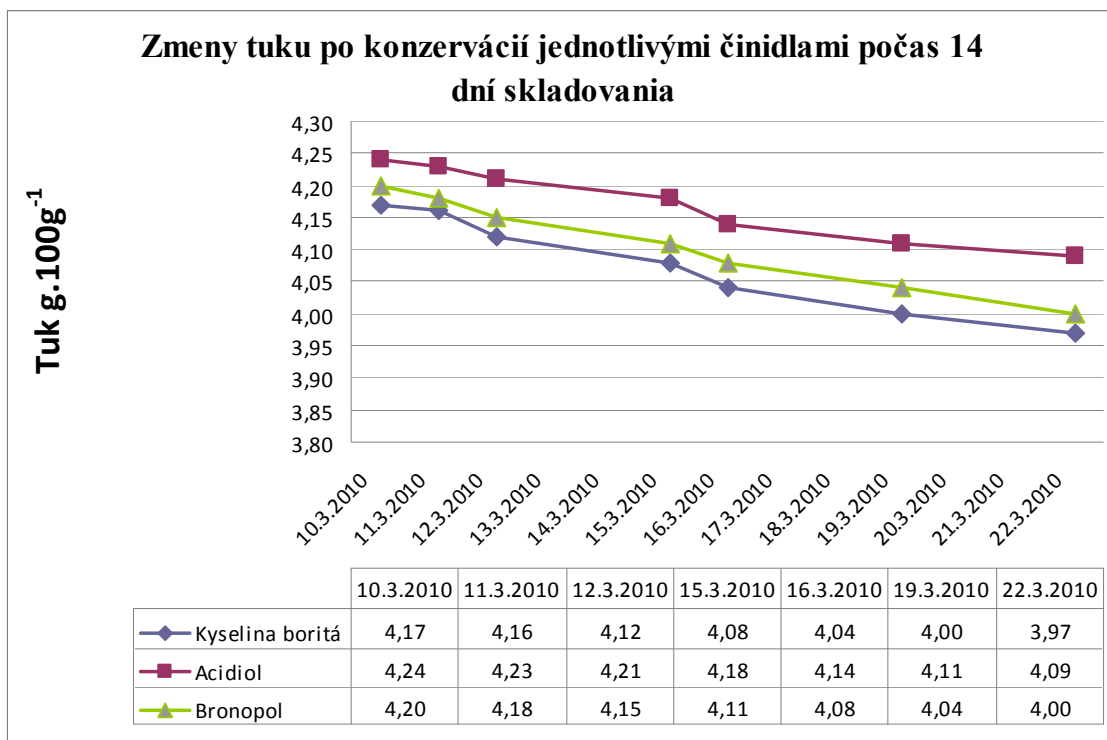
Konzervačné činidlá	Priemerný pokles počtu somatických buniek počas 14 dní v tis./ml ⁻¹ .
Kyselina boritá	28 000 SB.ml ⁻¹
Azidiol	16 000 SB.ml ⁻¹
Bronopol	24 000 SB.ml ⁻¹

Z výskumu vyplynulo, že najlepším konzervačným činidlom je azidiol, ktorý takmer zachoval celkový počet somatických buniek počas celých 14 dní konzervácie, ktorý sa podľa normy **STN 57 0529 (1999)** v Slovenskej republike pohybuje do 400 000 SB.ml⁻¹. Azidiol obsahuje chloramfenikol, ktorý obsahuje bakteriostatické antibiotikum preto, koncentrácia azidiolu ovplyvňuje detekciu ostatných inhibítorov vyskytujúcich sa v mlieku (**Mediavilla - Flo 'Hrdza, 1992**).

Ďalším vyhovujúcim činidlom bol bronopol, ktorý v našom výskume uspel na druhom mieste, so svojou účinnosťou k celkovému počtu somatických buniek počas celého výskumu.

Najhorší konzervačný účinok sa dosiahol s kyselinou boritou, počas 14 dní výskumu.

Vplyv konzervačných činidiel kyseliny boritej, azidiolu a bronopolu na jednotlivé zložky mlieka počas procesu konzervácie.



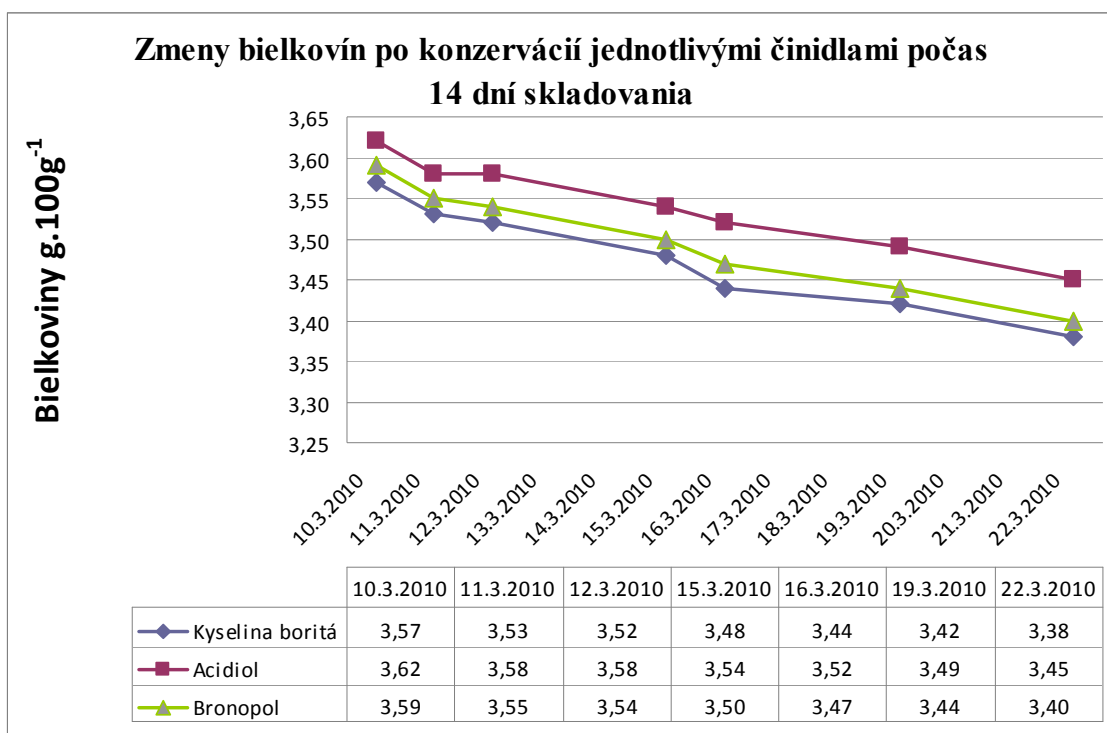
Obr. 8 Zmeny tuku po konzervácii jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.

Z grafu vyplýva, že najlepším konzervačným činidlom pri mliečnom tuku je azidiol. Konzervačné činidlo azidiol dokázal udržať hodnoty tuku takmer v rovnakom rozmedzí počas celého výskumného procesu. Druhou najlepšou konzervačnou látkou bol bronopol. A na poslednom mieste bola kyselina boritá, pre jej slabé konzervačné účinky.

Semjan, (1994) uvádza, že k poklesu hodnôt tuku môže dôjsť aj dôsledku rýchleho chladenia mlieka po nadojení.

Podľa normy **STN 57 0529** je min. obsah tuku v surovom kravskom mlieku 3,2 g.100g⁻¹. Na speňažovanie sa ako základná hodnota udáva 3,6 g.100g⁻¹.

Pri našom výskume sa počas konzervácie obsah tuku pohyboval pri kyseline boritej od 4,17 do 3,97 g.100g⁻¹, pri bronopole od 4,20 do 4,0 g.100g⁻¹ a pri azidole od 4,24 do 4,09 g.100g⁻¹.

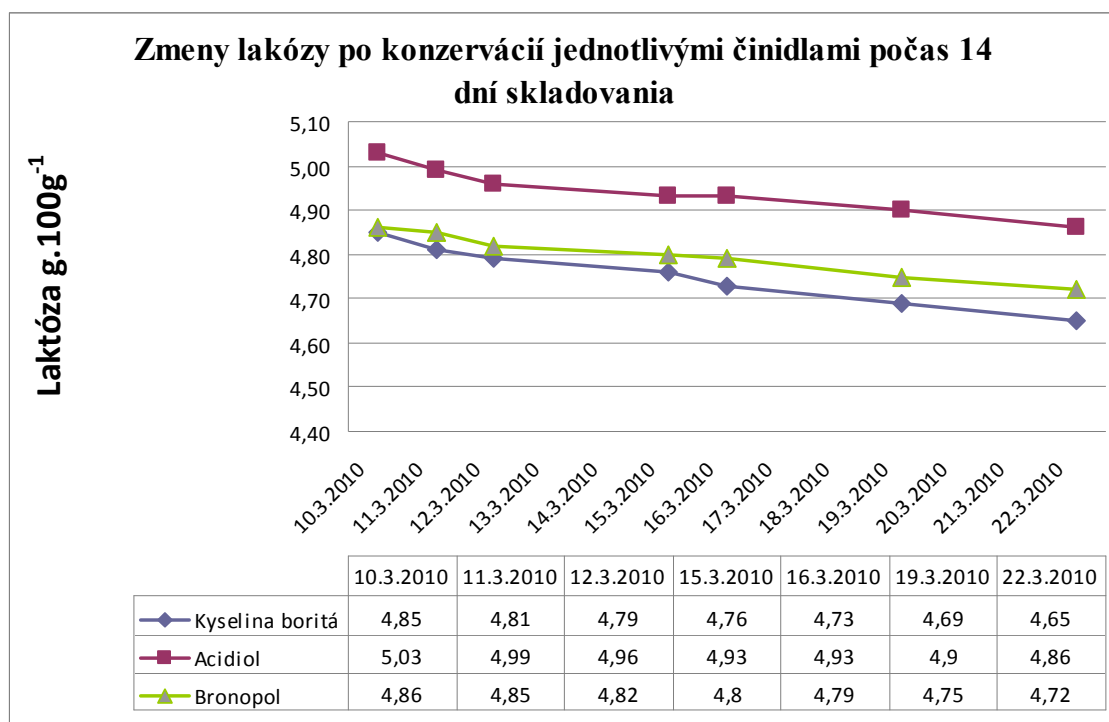


Obr. 9 Zmeny bielkovín po konzervácií jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.

Z grafu vyplýva, že najlepším konzervačným činidlom je opäť azidiol. Druhý v poradí je bronopol s tretie konzervačné činidlo je kyselina boritá.

Podľa normy STN 57 0529 je min. obsah bielkovín v surovom kravskom mlieku 2,8 g.100g, avšak základný obsah bielkovín na speňažovanie mlieka je 3,2 g.100g⁻¹.

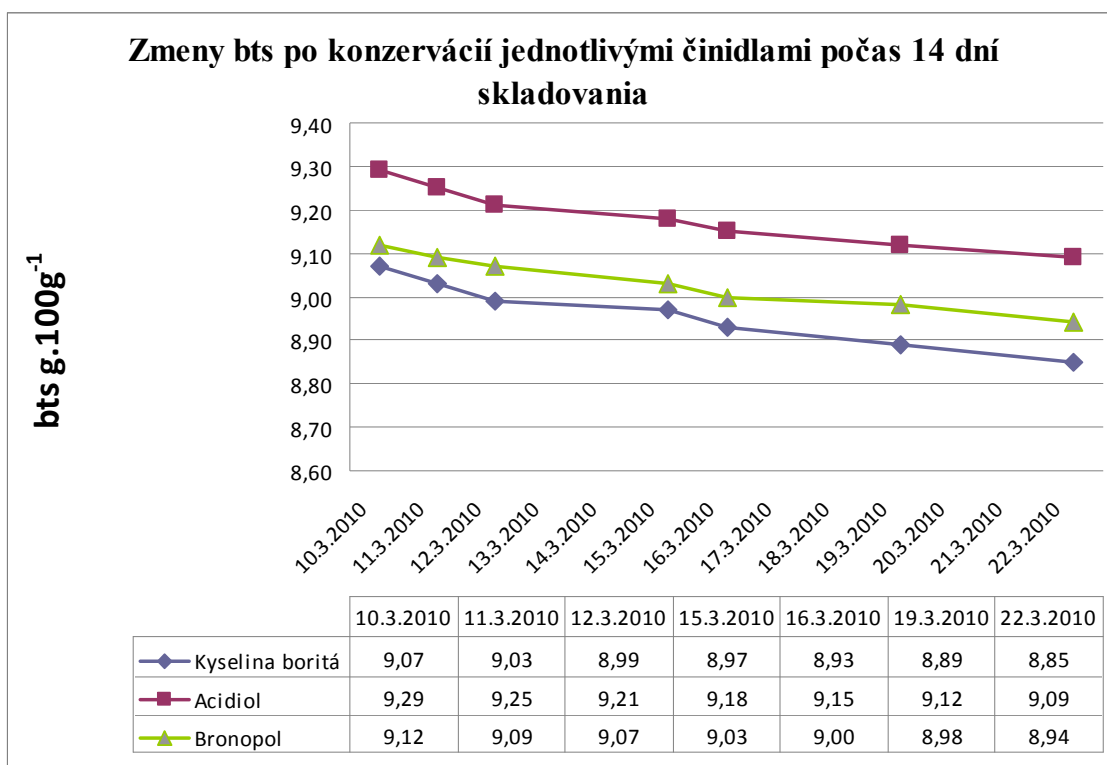
Obsah bielkovín pri konzervácií kyselinou boritou sa pohyboval od 3,57 do 3,38 g.100g⁻¹, pri konzervačnom činidle bronopolu sa hodnoty pohybovali od 3,59 do 3,40 g.100g⁻¹ a pri konzervačnom činidle azidiolu od 3,62 do 3,45 g.100g⁻¹.



Obr. 10 Zmeny laktózy po konzervácií jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.

Z obrázku 7 je opäť jasné, že azidiol je najlepším konzervačným činidlom. Najhorším je kyselina boritá.

Norma udáva, že min. obsah laktózy je $4,6 \text{ g.100g}^{-1}$. V našom prípade sa obsah laktózy v surovom kravskom mlieku, konzervovaného kyselinou boritou pohyboval od 4,85 do $4,65 \text{ g.100g}^{-1}$. Pri bronopole sa pohybovala hodnota od 4,86 do $4,72 \text{ g.100g}^{-1}$ a pri azidole od 5,03 do $4,86 \text{ g.100g}^{-1}$.



Obr. 11 Zmeny bts po konzervácii jednotlivými činidlami počas 14 dní skladovania.

Azidiol najlepšie konzervačné činidlo, pre jej najlepšie chemické zloženie. Kyselina boritá opäť najhoršia.

Norma STN 57 0529 udáva min. obsah bts 8,5 g.100g⁻¹.

V našom prípade sa obsah beztukovej sušiny pohyboval pri konzervačnom činidle kyseliny boritej od 9,07 do 8,85 g.100g⁻¹, pri konzervačnom činidle bronopolu sa pohybovala beztuková sušina od 9,12 do 8,94 g.100g⁻¹ a pri azidole od 9,29 do 9,09 g.100g⁻¹.

Kennedy et al, (1982); Kwon, Kim, (1982); Raimond, Kroger, (1974) uvádzajú, že zložky mlieka konzervované azidiolom zotrvávajú počas celého konzervačného procesu, najbližšie k svojmu pôvodnému zloženiu.

Ďalej uvádzajú, že ešte lepšie zachovanie zložiek mlieka sa dosiahne ak je vzorka mlieka konzervovaná azidiolom a následne sa počas celého výskumu skladuje pri chladničkových teplotách 4 ±2 °C.

Heeschen et al. (1969) a Pettipher, Rodrigues (1982) uvádzajú, že zmes kyseliny boritej bola úspešne používaná na konzerváciu vzoriek mlieka. Ale aj napriek svojej účinnosti nedosiahla kyselina boritá účinok azidiolu.

Stanovenie CPM vo vzorkách surového kravského mlieka

1. Vzorka surového kravského mlieka konzervovaná kyselinou boritou.

$$\begin{aligned} \text{Riedenie: } 10^{-2} &> 300, > 300 & N &= \frac{\Sigma C}{0,0022} \\ & & N &= \frac{224 + 230 + 25 + 27}{0,0022} \\ 10^{-3} & \quad 224, 230 & N &= 2,3 \cdot 10^5 \text{ KTJ.ml}^{-1} \\ 10^{-4} & \quad 25, 27 & & \end{aligned}$$

2. Vzorka surového kravského mlieka konzervovaná azidiolom.

$$\begin{aligned} \text{Riedenie: } 10^{-2} &> 300, > 300 & N &= \frac{\Sigma C}{0,0022} \\ & & N &= \frac{238 + 232 + 24 + 26}{0,0022} \\ 10^{-3} & \quad 238, 232 & N &= 2,4 \cdot 10^5 \text{ KTJ.ml}^{-1} \\ 10^{-4} & \quad 24, 26 & & \end{aligned}$$

3. Vzorka surového kravského mlieka konzervovaná bronopolom.

$$\begin{aligned} \text{Riedenie: } 10^{-2} &> 300, > 300 & N &= \frac{\Sigma C}{0,0022} \\ & & N &= \frac{228 + 218 + 32 + 30}{0,0022} \\ 10^{-3} & \quad 228, 218 & N &= 2,3 \cdot 10^5 \text{ KTJ.ml}^{-1} \\ 10^{-4} & \quad 32, 30 & & \end{aligned}$$

V našom prípade použité stabilizačné činidlá konzervovali rovnako.

Z meraní sa zistilo, že podľa Nariadenia ES č. 1662/2006 sa nezhodovala ani jedna vzorka s kritériom maximálnej hodnoty CPM do 100 000 KTJ.ml⁻¹. Naše vzorky mali hodnoty nad 100 000 KTJ.ml⁻¹. Hodnoty v našom surovom kravskom mlieku boli nad normu a to dôsledku toho, že vzorky mlieka boli odobraté deň predtým a následne došlo pomnoženiu MO vo vzorke mlieka.

Mlieko takýmto počtom mikroorganizmov by sa nemalo uviesť na trh.

Hofericová (2003) uvádza, že priemerná hodnota CPM v SR v roku 2002 bola 116 000 KTJ.ml⁻¹

5 Návrh na využitie poznatkov

Táto práca môže uľahčiť proces výberu pri kúpe konzervačného činidla pre potreby akejkoľvek organizácie zaoberajúcej sa skúmaním, konzerváciou či distribúciou kravského mlieka.

Poskytujeme návrh na využitie výsledkov pri pričom azidiol je najlepším konzervačným činidlom pre celkový počet somatických buniek a zložiek mlieka. Poznatky zhrnuté v predkladanej diplomovej práci budú využité pre účely Národného referenčného laboratória pre mlieko a mliečne výrobky (ŠVPÚ BA, DSL Nitra) a študijné účely na katedre hygieny a bezpečnosti potravín SPU v Nitre.

Záver

Touto prácou sme vytvorili prehľad o najlepšom konzervačnom činidle. Konzervačné činidlá v praxi slúžia na konzerváciu celkového počtu somatických buniek a jednotlivých zložiek mlieka, počas celého výskumu, tak ako u nás tak aj vo svete. V našom prípade sme použili 3 druhy konzervačných činidiel, ktorými boli kyselina boritá, azidiol a bronopol.

V praktickej časti nášho výskumu sme zisťovali, ktorá konzervačná látka má najlepší konzervačný účinok, počas celých 14 dní nášho výskumu.

V prvej časti výskumu sme konzervovali somatické bunky, pomocou kyseliny boritej, azidiolu a bronopolu. Na túto analýzu sme použili prístroj Fossomatic 5000, ktorý stanovuje somatické bunky pomocou prietokovej cytometrie. Z tejto časti výskumu vyplynulo, že najslabším konzervačným činidlom pri zachovaní celkového počtu somatických buniek je kyselina boritá. Konzervačné činidlo bronopol pri zachovaní celkového počtu somatických bol priemerným konzervačným činidlom. V našom prípade najlepším stabilizačným činidlom bol azidiol, ktorý zachoval celkový počet somatických buniek na najlepšej úrovni. Straty v priemere počas 14 dní skladovania boli pri kyseline boritej 28 000 SB.ml⁻¹, pri bronopole 24 000 SB.ml⁻¹ a pri azidole 16 000 SB.ml⁻¹. Z výskumu vyplynulo, že hodnoty somatických buniek pri konzervácií sa v posledných dňoch konzervácie pohybovali pod normu a to pri kyseline boritej 81 000 SB/ml⁻¹, pri azidole 258 000 SB/ml⁻¹, pri bronopole 158 000 SB/ml⁻¹. Aj napriek tomu bol azidiol najlepším konzervačným činidlom.

V druhej časti nášho výskumu sme konzervovali jednotlivé zložky mlieka a to: tuk, bielkoviny, laktózu a bts.

Pri druhej časti výskumu sme použili prístroj MilkoScan. Princíp stanovenia funguje na princípe infračerveného spektrofotometra. Vo vzorkách mlieka sa stanovuje obsah tuku, bielkovín, laktózy, bts. Vo vzorkách mlieka, ktoré boli konzervované kyselinou boritou sa obsah tuku počas celého výskumu pohyboval od 4,17 do 3,97 g.100g⁻¹ pri azidole sa obsah tuku pohyboval od 4,24 do 4,09 g.100g⁻¹ a pri bronopole boli hodnoty od 4,20 do 4,0 g.100g⁻¹. Obsah bielkovín pri kyseline boritej sa pohyboval od 3,57 do 3,38 g.100g⁻¹, pri bronopole od 3,59 do 3,40 g.100g⁻¹, pri azidole od 3,62 do 3,45. Obsah laktózy sa pohyboval pri kyseline boritej od 4,85 do 4,65 g.100g⁻¹, pri bronopole od 4,86 do 4,72 g.100g⁻¹ a pri azidole od 5,03 do 4,86 g.100g⁻¹. Hodnoty

beztukovej sa pri konzervačnom činidle kyseliny boritej pohybovali od 9,07 do 8,85 g.100g⁻¹, pri bronopole od 9,12 do 8,94 g.100g⁻¹ a pri azidole od 9,29 do 9,09 g.100g⁻¹. Z výskumu vyplynulo, že azidiol je opäť najlepším konzervačným činidlom a kyselina boritá najhorším. Z výskumu opäť vyplynulo, že bronopol je druhým najlepším konzervačným činidlom pri vzorkách mlieka.

Stanovenie CPM vo vzorkách surového kravského mlieka nám ukázalo, že podľa Nariadenia ES č. 1662/2006 sa nezhodovala ani jedna naša vzorka s kritériom maximálnej hodnoty CPM do 100 000 KTJ.ml⁻¹. Vzorky nášho surového kravského mlieka mali hodnoty nad 100 000 KTJ.ml⁻¹. Zo všetkého vyplýva, že celkový počet mikroorganizmov vo vzorkách surového kravského mlieka stúpol dôsledku toho, že vzorky boli odobraté deň pred samotnou analýzou.

Stanovený cieľ sme dosiahli dôkladným porovnaním konzervačného účinku kyseliny boritej, bronopolu a azidiolu vo vzorkách surového kravského mlieka.

Zoznam použitej literatúry

1. **ARDÖ, Y.** 1979. Bronopol as a preservative in milk samples. *Milchwissenschaft*, roč. 34, 1979, roč. 1, s. 14.
2. **BECKLEY, M. S. – JOHNSON, T.** 1966. Five year study of a California mastitis test on a commercial dairy herd. In *Journal Dairy Science* [online]. 1966, [cit. 2011-4-1]. 746s. Dostupné na internete: <<http://archive.uky.edu/bitstream/10225/84/05CHAPTER.pdf>>
3. **BIOBAN™.** 2007. *Bronopol PC Preservative Safety Data Sheet*, The Dow Chemical Company, May 25, 2007, s. 4.
4. **BIOBAN.** 2007. *Bronopol PC, BIOBAN Bronopol PC 30 Preservative for Cosmetics and Personal Care Products*, The Dow Chemical Company, 2007, s. 1. ISBN 253-02363-07-02-07.
5. **BIOBAN.** 2007. *Bronopol PC, BIOBAN Bronopol PC 30 Preservative for Cosmetics and Personal Care Products*, The Dow Chemical Company, 2007, s. 2. ISBN 253-02363-07-02-07.
6. **BIOBAN.** 2007. *Bronopol PC Preservative Safety Data Sheet*, The Dow Chemical Company, May 25, 2007, s. 2–4.
7. **BYTYGI, H. - ZAUGG, U. - SHERIFI, K. - HAMIDI, A. - GJONBALAJ, M. - MUJI, S. – MEHMETI, H.** 2010. Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw milk in Kosova. In *Veterinarski Archiv*, roč. 2, 2010, 173-183 s.
8. **BOYSO, J. O.** 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. In *Journal of Infection*, roč. 4, 2007, 399 – 409 s.
9. **CLARKSON, T. W.** 1991. Inorganic and Organometal Pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology* [online]. 1991 [cit. 2011-4-1]. s. 497-583. Dostupné na: <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/pyrethrins-ziram/zinc-phosphide-ext.html>>. ISBN 14853-0901.

-
10. **CRONSHAW, B. – GROVES, MJ. – LESSEL, B.** 1964. Some properties of Bronopol, a new antimicrobial agent active against *Pseudomonas aeruginosa*, In *Journal Pharm Pharmacol.* [online]. 1964 [cit. 2011-4-2]. s. 124. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14265925>>.
 11. **DAIRYMANS, D.** 2009. What you should know about somatic cells. Winter issue. In *Journal Animal Science*, roč. 24, 2009, č. 3, s. 429-438.
 12. **DOHOO, I. R. – MEEK, A. H.** 1982. Somatic cell counts in bovine milk. In *Canadian Veterinary Journal*, roč. 23, 1982, č. 4, s. 119-125.
 13. **EISLER, R.** 1990. Boron Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. In *Fish and Wildlife Serv. Biol. Rep.*, roč. 8, 1990, s. 1-32 ISSN 1998-0001.
 14. **FELKL, et al.** 1995. Vplyv kŕmení na počet bunecných elementu v mléce dojníc. In *Veterinárství*, roč. 45, 1995, s. 65-68.
 15. **FLEMING, M. G.** 1979. Lipolysis in Bovine Milk as Affected by Mechanical and Temperature Activation. In *Irish Journal of Food Science Technology*, roč. 3, 1979, s. 111-129.
 16. **FRANČÁKOVÁ et al.** 2005. Hodnotenie poľnohospodárskych produktov. ES SPU Nitra, 2005. s. 178. ISBN 80-8069-471-0.
 17. **GALLIN, J. I. – IRA, M. G. – SNYDERMAN, R.** 1988. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. In *Annals of the Rheumatic Diseases*, roč. 48, 1988, s. 792. ISBN 0-88167-344-7.
 18. **GARCÍA, G. C. - VAN OPSTAL, I. – VANMUYSEN, S. C. M. - MICHIELS, C. W.** 2003. The lactoperoxidase system increases efficacy of high - pressure inactivation of foodborne bacteria. In *Journal Food Microbiological*, roč. 81, 2003, s. 211 – 221.
 19. **GRIEGER, C. – HOLEC, J.** 1990. Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1990. s. 397. ISBN 80-07-00253-7.

-
20. **HANUŠ, O. – FOLTYS, V.** 1991. Některé vlastnosti a minerální složky mléka plemen skotu v Československu. In *Živočišna výroba*, roč. 36, 1991, s. 497 – 505. ISBN 978-80-871-44-03-9.
 21. **HARMON, J. R.** 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. In *Journal Dairy Science*, roč. 77, s. 2103-2112.
 22. **HARMON, J. R.** 2001. Somatic cell counts: A primer. In *Proceedings National Mastitis Council Annual Meeting*, 2001, s. 3-9.
 23. **HEESCHEN, W. – REICHMUTH, J. – TOLLE, A. – ZEIDER, H.** 1969, Die Konservierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchung. *Milchwissenschaft*, roč. 24, 1969, s. 729 – 734.
 24. **HILTON, C. D.** 2006. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. In *Science Direct*, roč. 6, s. 555-562.
 25. **HOFERICOVÁ, M.** 2003. Kvalita surového kravského mlieka. In *Mliekarstvo*, roč. 34, 2003, č. 1, s. 41. ISSN 1210 – 3144.
 26. **JENSEN, D. L. – EBERHART, R. J.** 1981. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. In *American Journal of Veterinary Research*, roč. 42, 1981, č. 5, s. 743-747.
 27. **KERESTEŠ, Ján. – SELECKÝ, Ján.** 2005. *Srárstvo na Slovensku história a technológia*. Eminent Považská Bystrica, 2005, s. 368. ISBN 80-9693387-9-7.
 28. **KHATE, K. – YADAV, B. R.** 2010. Incidence of mastitis in Sahiwal cattle and Murrah buffaloes of a closed organized herd. In *Indian Journal Animal Science*, roč. 80, 2010, č. 5, s. 467-469.
 29. **KOVÁČIK, J. – VALENT, M. – KOLLÁROVÁ, E.** *Fyziológia zvierat. 2.* upravené vyd. Nitra: Vydavateľské a edičné stredisko Vysokej školy poľnohospodárskej v Nitre, 1996. s. 284. ISBN 80-7137-322-2.
 30. **LEE, C. S. - WOODING, F. B. P. – KEMP, P.** 1980. Identification properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows

-
- secretions, colostrum and milk from normal cows. In *Journal of Dairy Research*, roč. 47, 1980, č. 1, s. 39.
31. **McDONALD, J. S. – ANDERSON, A. J.** 1981. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands; the peripartum period. In *American Journal Veterinary Research*, roč. 42, 1981, s. 1366-1368.
32. *Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu. (Ú. v. EÚ L 139, 30.4.2004), s. 55 – 205.*
33. *Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1662/2006 zo 6. novembra 2006, ktorým sa mení a dopĺňa nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu (Text s významom pre EHP). (Ú. v. EÚ L 320, 18.11.2006), s. 1-10.*
34. *Nariadenie Komisie (ES) č. 1020/2008 zo 17. októbra 2008, ktorým sa menia a dopĺňajú prílohy II a III k nariadeniu Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu a nariadenie (ES) č. 2076/2005, pokiaľ ide o identifikačné značky, surové mlieko a mliečne výrobky, vajcia a vaječné výrobky určité produkty rybolovu (Text s významom pre EHP). (Ú. v. EÚ L 277, 18.10.2008).*
35. *Nariadenie Komisie (ES) č. 1243/2007 z 24. októbra 2007, ktorým sa mení a dopĺňa príloha III k nariadeniu Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, ktorým sa ustanovujú osobitné hygienické predpisy pre potraviny živočíšneho pôvodu (Text s významom pre EHP). (Ú. v. EÚ L 281, 25.10.2007).*
36. **NONNCKE, B. J. – HARP, J. H.** 1986. Effect of chronic staphylococcal mastitis on mitogenic responses of bovine lymphocytes. In *Journal Dairy Science*, roč. 68, 1986, č. 12, s. 3323 - 3328.
37. **OPDEBEECK, J. P.** 1982. Mammary gland immunity. In *Journal American Veterinary Medical Association*, roč. 10, 1982, s. 1061-1065.
38. **PAAPE, M. J. - MILLER, R. H.** 1985. Relationship between milk somatic cell count and milk yield. In *Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council*, 1985, s. 60-72.
-

-
39. **PARK, Y. H. – FOX, L. K.** 1992. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. In *Journal Dairy Science*, roč. 75, 1992, č. 4, s. 998-1006.
 40. **PETTIPHER, G. L. – RODRIGUES, U. M.** 1982. A bacteriostatic mixture for milk samples and its effect on bacteriological, cytological and chemical compositional analysis. In *Journal Applied Bacteriology*, roč. 52, 1982, s. 259 – 265.
 41. **RAPP, M. – MÜNCH, S.** 1984. Neuentwicklung von flüssigen Konservierungsmitteln für Milchproben. *Deutsche Molkerei Zeitung*, roč. 39, 1984, s. 1264 – 1272.
 42. **REICHMUTH, J.** 1975. Somatic cell counting--interpretation of results. In *Proc. of Seminar on Mastitis Control*, roč. 85, 1975, s. 93-109.
 43. **Reregistration Eligibility Decision Document:** 1993. Boric Acid and its Sodium Salts; Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, 1995, s. 1-2.
 44. **Reregistration Eligibility Decision:** 1995. *Bronopol*, United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Special Review and Reregistration Division, October. 1995. s. 2–3.
 45. **Reregistration Eligibility Decision:** 1995. *Bronopol*, United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Special Review and Reregistration Division, 1995, s. 17–23.
 46. **Reregistration Eligibility Decision:** 1995. *Bronopol*, United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Special Review and Reregistration Division, 1995, s. 23–28.
 47. **SEMJAN, Štefan.** 1994. Mliekarstvo. 2. prepracované vydanie. Nitra: VŠP, 1994. 93 – 94 s. ISBN 80-7137-157-2.
 48. **STN ISO 6887: 1997.** Všeobecné pokyny na prípravu riedení pri mikrobiologickom skúšaní. Bratislava : SÚTN, 1997, 12 s.
 49. **STN 57 0529: 1999,** *Surové kravské mlieko na mliekárenské ošetrovanie a spracovanie.*

-
50. **STN EN ISO 4833: 2004**, *Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mikroorganizmov. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C.*
51. **ŠKARDA, J. – HEMROVÁ - ŠEDINOVÁ, V. – ŠKARDOVÁ, V. – URBANOVÁ, E.** 1989. Vliv vnejších faktorů na dynamiku výskytu mastitid ve stáde dojníc. In *Živočišná výroba*, roč. 34, 1989, č. 1, 25-38 s. ISBN 80-86454-77-0.
52. **TEUBNER, CH. et al.** 2003. *Velká encyklopédia syrov.* Trio Publishing, 2003. 231 s. ISBN 80-968705-1-3.
53. **The Dow Chemical Company**, 2010. Product Safety Assessment, *Bronopol Antimicrobial*, May 1, 2010, s. 2.
54. **VARCHOLA, V.** 2004. *Vieme chovať zdravšie kravy...?*. In *Slovenská Holsteinská asociácia*, maxiinfo, august, 2004. s. 21.
55. **WOODS, W. G.** 1994. An Introduction to Boron: History, Sources, Users and Chemistry. In *Environmental Health Perspect*, roč. 7, 1994, s. 5-11.
56. **World Health Organization.** 1998. *Boron*, Environmental Health Criteria. Geneva, Switerland, 1998. s. 102.
57. **ZAJÁC, P. – GOLIAN, J. – NOVÁKOVÁ, R.** Vplyv Zvýšeného počtu somatických buniek na zdravotnú neškodnosť surového kravského mlieka, In *Zborník z medzinárodnej vedeckej konferencie „Bezpečnosť a kontrola potravín“*. Nitra 6. – 7. apríl 2005: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, s. 151 – 155. ISBN 80-8069-503-2.
58. **www.inolex.com.** Bronopol [online].[s.a.]. [Cit. 2011-03-12] Dostupné na internete: <http://www.inolex.com/cosmetic_ingredients/preservation_systems/bronopol>.
59. **www.jtbaker.com.** Boric acid – Handling and storage [online].[s.a.]. [Cit. 2011-03-12] Dostupné na internete: <<http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/b3696.htm>>.
60. **www.webbook.nist.gov.** Bronopol [online].[s.a.]. [Cit. 2011-03-20] Dostupné na internete: <<http://webbook.nist.gov/cgi/inchi/InChI%3D1S/C3H6BrNO4/c4-3%281-6,2-7%295%288%299/h6-7H,1-2H2>>.
-
