

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Igor HLADNIK

**VPLIV PODALJŠANEGA SKLADIŠČENJA NA MIKROBIOLOŠKO  
KAKOVOST SUROVEGA MLEKA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EFFECT OF PROLONGED STORAGE ON MICROBIOLOGICAL  
QUALITY OF RAW MILK**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Bogdana Perka, za somentorico doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič in za recenzentko doc. dr. Barbaro Jeršek.

Mentor: prof. dr. Bogdan Perko

Somentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Recenzentka: doc. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Igor HLADNIK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 637.112:579.24(043)=163.6  
KG mleko/surovo mleko/dvodnevno zbiranje mleka/dolivanje neohlajenega mleka/  
nihanje temperature mleka/mikrobiološka kakovost surovega mleka  
AV HLADNIK, Igor  
SA PERKO, Bogdan (mentor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (somentorica)/  
JERŠEK, Barbara (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2010  
IN VPLIV PODALJŠANEGA SKLADIŠČENJA NA MIKROBIOLOŠKO  
KAKOVOST SUROVEGA MLEKA  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 36 str., 18 pregl., 12 sl., 27 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Raziskovali smo spremembe mikroflore pri dvodnevem zbiranju mleka v  
hladilnem bazenu pri 4 °C. Spremljali smo 10 ciklov dvodnevnega zbiranja mleka,  
za vsak cikel smo odvzeli po štiri vzorce. Na gojišču PCA z dodatkom mleka v  
prahu smo določali skupno število mikroorganizmov, število proteolitov, število  
psihrotrofov in število proteolitskih psihrotrofov. Na selektivnih gojiščih pa smo  
določali laktobacile (MRS) in skupaj laktokoke in enterokoke (M17). Med  
dvodnevnim zbiranjem mleka se je število mikroorganizmov v mleku povečalo,  
predvsem se je spremenilo razmerje med posameznimi skupinami  
mikroorganizmov. Najbolj se je povečalo število psihrotrofov, predvsem  
proteolitskih, ki pa so najbolj nezaželeni, saj izločajo proteolitične encime, ki jih pri  
predelavi mleka s toplotnimi postopki, ki so v uporabi, ne moremo uničiti. Najbolj  
se je število mikroorganizmov povečalo drugi dan zbiranja, kar pomeni, da je  
mikrobiološka kakovost pri dvodnevnem zbiranju mleka občutno poslabšana v  
primerjavi z dnevnim zbiranjem.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 637.112:579.24(043)=163.6  
CX milk/raw milk/two-day milk collecting/adding of warm milk/milk temperature oscillation/microbiological quality of raw milk  
AU HLADNIK, Igor  
AA PERKO, Bogdan (supervisor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (co-advisor)/JERŠEK, Barbara (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dep. of Food Sci. and Techn.  
PY 2010  
TI EFFECT OF PROLONGED STORAGE ON MICROBIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 36 p., 18 tab., 12 fig., 27 ref.  
LA SI  
AL SI/en  
AB We researched the changing of the micro flora in milk that is collected every second day in cooling tank at 4 °C. We examined 10 cycles of two-day milk collecting taking four samples during each cycle. With PCA nutrient medium with added milk powder we determined the total number of microorganisms, the number of proteolytic, the number of psychrotrophic and the number of proteolytic psychrotrophic bacteria. In selective nutrient media we determined lactobacilli (MRS) and together lactococci and enterococci (M17). During the two-day milk collecting the number of microorganisms in the milk increased and particularly the ratio between the groups of microorganisms changed. The number of psychrotrophic bacteria increased the most, particularly proteolytic, which are however most unwanted, because they secrete proteolytic enzymes, that cannot be destroyed by processing the milk with heat treatments that are normally used. The number of microorganisms increased most on the second day of collecting. This means that the microbiological quality of milk in the two-day collecting system is remarkably worse in comparison to the one-day collecting system.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI)</b>	<b>III</b>
<b>Key Words Documentation (KWD)</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic</b>	<b>VII</b>
<b>Kazalo slik</b>	<b>VIII</b>
<b>Okrajšave in simboli</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 SKUPNO ŠTEVILO MIKROORGANIZMOV	2
2.2 BAKTERIJE RODU <i>LACTOBACILLUS</i>	3
2.3 BAKTERIJE VRSTE <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i>	3
2.4 BAKTERIJE RODU <i>ENTEROCOCCUS</i>	4
2.5 BAKTERIJE VRSTE <i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i>	5
2.6 PSIHROTROFNI MIKROORGANIZMI	5
<b>2.6.1 Bakterije rodu <i>Pseudomonas</i></b>	<b>6</b>
<b>2.6.2 Vpliv na kvaliteto mlečnih izdelkov</b>	<b>6</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>8</b>
3.1 NAČRT POSKUSA	8
<b>3.1.1 Opis zbiralnice</b>	<b>9</b>
3.2 MATERIALI	10
<b>3.2.1 Vzorci</b>	<b>10</b>
<b>3.2.2 Gojišča in raztopine</b>	<b>10</b>
3.2.2.1 Gojišče PCA z dodatkom mleka v prahu	10
3.2.2.2 Gojišče MRS	10
3.2.2.3 Gojišče M17	10
3.2.2.4 Fiziološka raztopina	11
3.2.2.5 Pufer TAE (Tris Acetatni EDTA pufer)	11
3.2.2.6 Pufer TE (Tris EDTA pufer)	11
<b>3.2.3 Kemikalije</b>	<b>11</b>
3.2.3.1 Izolacija DNA	11
3.2.3.2 Mešanica za PCR	12
3.2.3.3 Elektroforeza in barvanje	12
3.3 METODE	13
<b>3.3.1 Spremljanje fizikalnih parametrov</b>	<b>13</b>
<b>3.3.2 Klasična mikrobiološka tehnika gojenja</b>	<b>13</b>
<b>3.3.3 Ugotavljanje prisotnosti posameznih bakterijskih rodov in vrst</b>	<b>13</b>
3.3.3.1 Priprava konzorcijev kolonij s petrijevih plošč	13
3.3.3.2 Izolacija DNA	14
3.3.3.3 Priprava reakcijske mešanice za PCR	14

3.3.3.4	Potek PCR	15
3.3.3.5	Agarozna gelska elektroforeza	16
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>17</b>
4.1	UGOTOVITVE STANJA NA TERENU	17
<b>4.1.1</b>	<b>Zbiranje mleka</b>	<b>17</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Nihanje temperature med dvodnevni zbiranjem</b>	<b>17</b>
4.2	REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH RAZISKAV	18
<b>4.2.1</b>	<b>Skupno število mikroorganizmov</b>	<b>18</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Skupno število proteolitov</b>	<b>19</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Psihrotrofi</b>	<b>19</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Proteolitski psihrotrofi</b>	<b>20</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Laktobacili</b>	<b>21</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Laktokoki in enterokoki (gojišče M17)</b>	<b>22</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Ugotavljanje prisotnosti posameznih bakterijskih vrst oz. rodov s PCR</b>	<b>23</b>
4.2.7.1	Bakterije rodu <i>Lactobacillus</i>	24
4.2.7.2	Bakterije vrste <i>Lactococcus lactis</i>	24
4.2.7.3	Bakterije rodu <i>Enterococcus</i>	25
4.2.7.4	Bakterije vrste <i>Streptococcus thermophilus</i>	25
4.2.7.5	Bakterije rodu <i>Pseudomonas</i>	26
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>27</b>
5.1	RAZPRAVA	27
<b>5.1.1</b>	<b>Stanje na terenu</b>	<b>27</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Skupno število mikroorganizmov</b>	<b>27</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Psihrotrofi</b>	<b>28</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Laktobacili, laktokoki in enterokoki</b>	<b>29</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Ugotavljanje prisotnosti posameznih bakterijskih vrst oz. rodov s PCR</b>	<b>29</b>
5.2	SKLEPI	30
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>33</b>

**ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razredi mikrobiološke kakovosti mleka (Uredba, 1999) .....	2
Preglednica 2: Vpliv rasti psihrotrofov v surovem mleku pred toplotno obdelavo na kakovost mlečnih izdelkov (Sorhaug in Stepaniak, 1997). .....	7
Preglednica 3: Vpliv rasti psihrotrofov med hladnim skladiščenjem mlečnih izdelkov na njihovo kakovost (Sorhaug in Stepaniak, 1997). .....	7
Preglednica 4: Sestava reakcijskih mešanitic za PCR in dolžine specifičnih pomnožkov.....	15
Preglednica 5: Potek PCR za določanje bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> .....	15
Preglednica 6: Potek PCR za določanje bakterij vrste <i>Lactococcus lactis</i> . .....	16
Preglednica 7: Potek PCR za določanje bakterij rodu <i>Enterococcus spp.</i> .....	16
Preglednica 8: Potek PCR za določanje bakterij <i>Streptococcus thermophilus</i> . .....	16
Preglednica 9: Potek PCR za določanje bakterij rodu <i>Pseudomonas spp.</i> .....	16
Preglednica 10: Skupno število mikroorganizmov (SŠMO) vzorcev mleka odvzetih za namen odkupa .....	17
Preglednica 11: Skupno število mikroorganizmov v vzorcih A pri 10-ih ciklih dvodnevnega zbiranja mleka .....	18
Preglednica 12: Gibanje populacije skupnega števila mikroorganizmov v vzorcih A, B, C in D pri 8-10 ciklu dvodnevnega zbiranja mleka .....	19
Preglednica 13: Skupno število proteolitskih mikroorganizmov v vzorcih A .....	19
Preglednica 14: Skupno število psihrotrofnih mikroorganizmov. ....	20
Preglednica 15: Število proteolitskih psihrotrofov .....	21
Preglednica 16: Število laktobacilov na gojišču MRS .....	21
Preglednica 17: Število laktokokov in enterokokov na gojišču M17. ....	22
Preglednica 18: Prisotnost posameznih vrst oz. rodov v konzorcijih kolonij. ....	23

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Zbiralnica mleka .....	9
Slika 2: Hladilni bazen .....	9
Slika 3: Graf povprečnega nihanja temperature med dvodnevним zbiranjem mleka. ....	18
Slika 4: Graf spreminjanja števila psihrotrofnih mikroorganizmov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevnega zbiranja mleka. ....	20
Slika 5: Graf spreminjanja števila proteolitskih psihrotrofov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevnega zbiranja mleka. ....	21
Slika 6: Graf spreminjanja števila laktobacilov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevnega zbiranja mleka .....	22
Slika 7: Graf spreminjanja števila laktokokov in enterokokov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevnega zbiranja mleka. ....	23
Slika 8: Rezultati reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma LbLMA-rev in R16-1 za rod <i>Lactobacillus</i> . ....	24
Slika 9: Rezultati reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma 27f in Lla za vrsto <i>Lactococcus lactis</i> . ....	24
Slika 10: Rezultati reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma E1 in E2 za rod <i>Enterococcus</i> . ....	25
Slika 11: Rezultati reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma ThI in ThII za vrsto <i>Str. thermophilus</i> . ....	25
Slika 12: Rezultati reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma SM2F in SM3R za rod <i>Pseudomonas</i> . ....	26



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$a_w$	aktivnost vode
bp	bazni par
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	mešanica nukleotidov
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
KE	kolonijske enote
M	molarnost (mol/L)
M17	gojišče za streptokoke
MRS	gojišče de Man-Rogosa-Sharpe
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
TAE	tris acetatni pufer
UHT mleko	mleko pasterizirano kratek čas pri visoki temperaturi (Ultra High Temperature)

## 1 UVOD

Mleko je energijsko in prehransko zelo bogato živilo, saj vsebuje vse snovi, potrebne za rast in razvoj novorojenih sesalcev. Hkrati pa je tudi zelo primeren medij za rast zelo različnih mikroorganizmov. Ti mikroorganizmi so lahko tehnološko zaželeni in izdelavo različnih fermentiranih mlečnih izdelkov. Žal so v mleku lahko prisotni tudi tehnološko nezaželeni mikroorganizmi, ki znižujejo njegovo prehransko vrednost, obstojnost in primernost za predelavo. V mleku lahko preživijo tudi nekateri zdravju škodljivi mikroorganizmi.

Za ohranjanje prehranske in biološke kakovosti mleka uporabljamo hitro hlajenje mleka takoj po molži. Hlajenje mleka učinkovito zavre rast večine mikroorganizmov, ne pa vseh. Z boljšo higieno pridelave mleka in pravilnim hlajenjem se je kakovost mleka na rampah mlekarne, ob ustreznem vzorčenju in analitski kontroli, bistveno izboljšala.

V zadnjih letih so, zaradi zaostrenih razmer na trgu mlečnih izdelkov in s tem povezanim padcem cen, mlekarne začele iskati načine za znižanje stroškov. Eden od ukrepov v tej smeri je tudi prehod na dvodnevno zbiranje mleka, pri katerem se mleko odvaža od proizvajalcev oziroma zbiralnic le enkrat na dva dni. Vendar se pri nadaljnji predelavi takšnega mleka včasih pojavijo problemi, najpogosteje pri predelavi v trde sire.

### 1.1 NAMEN NALOGE

Zaradi tehnoloških problemov, ki se pojavljajo pri predelavi mleka zbranega z dvodnevним zbiranjem, smo se odločili da raziščemo, kako se med dvodnevним zbiranjem spreminja mikroflora surovega mleka. Posebej smo se osredotočili na psihrotrofne mikroorganizme, ki zaradi tvorbe encimov najbolj znižujejo kakovost mleka.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Mikrobiološka kakovost mleka se pri dvodnevnem zbiranju bistveno poslabša v primerjavi z dnevnim zbiranjem mleka.
- Pri dvodnevnem zbiranju mleka se bistveno poveča število psihrotrofnih mikroorganizmov v mleku.
- Skupno število mikroorganizmov se pri dvodnevnem zbiranju mleka ne poveča bistveno.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SKUPNO ŠTEVILO MIKROORGANIZMOV

Skupno število mikroorganizmov (SŠMO), med katerimi vedno prevladujejo bakterije, se giblje med  $<10^3$ /ml pri minimalni okužbi in  $>10^6$ /ml ob močni okužbi. Število mikroorganizmov izražamo kot število kolonijских enot (KE) na mililiter mleka, saj standardna metoda določanja SŠMO sloni na cepljenju mleka na hranljivo podlago in po inkubaciji štetju izraslih kolonij (IDF standard, 100B, 1991). Vrsto let SŠMO določa bakteriološko sprejemljivost oziroma higiensko kakovost surovega mleka, saj je dober indikator bakterijske okužbe med pridobivanjem mleka. Nizko SŠMO v surovem mleku je znak dobre proizvodne prakse, ki jo največkrat označimo z angleško kratico GMDP (Good Manufacture Dairy Practice). Visoko SŠMO, ki presega 100.000 KE v ml mleka, pa je znak slabe higiene pri proizvodnji mleka. Takšno mleko, ki je še neustrezno hlajeno in nadalje okuženo med skladiščenjem in transportom, lahko vsebuje več milijonov mikroorganizmov. V mlekarstvu razvitih deželah velja število 100.000 KE/ml surovega mleka kot zgornja meja higiensko sprejemljivega mleka (Rogelj, 2003).

Uredba o določitvi elementov odkupne cene kravjega mleka (Uredba, 1999) določa štiri razrede mikrobiološke kakovosti mleka, za katere so predpisani določeni dodatki in odbitki pri ceni mleka, kar je prikazano v Preglednici 1.

Preglednica 1: Razredi mikrobiološke kakovosti mleka (Uredba, 1999)

Kakovostni razred	SŠMO (KE/ml)	Dodatek /odbitek
E	Do 50.000	+ 5% izhodiščne cene
1.	Od 50.001 do 100.000	0% izhodiščne cene
2.	Od 100.001 do 400.000	-5% izhodiščne cene
3.	Od 400.001 do 800.000	-15% izhodiščne cene

Pravilnik o veterinarsko-sanitarnem nadzoru živilskih obratov, veterinarsko-sanitarnih pregledih ter o pogojih zdravstvene ustreznosti živil in surovin živalskega izvora (1999), ki je usklajen z evropskimi, predpisuje z vidika higienske kakovosti za surovo mleko dve kategoriji, in sicer za:

- Surovo kravje mleko, namenjeno proizvodnji toplotno obdelanega pitnega mleka in izdelkov iz toplotno obdelanega mleka, pri katerem geometrijsko povprečje SŠMO pri 30 °C v obdobju dveh mesecev z vsaj dvema vzorcema mesečno ne sme preseči 100.000 KE/ml.
- Surovo kravje mleko, namenjeno neposredno prehrani ljudi in surovo kravje mleko za proizvodnjo izdelkov, narejenih s surovim mlekom, pri katerem ista vrednost ne sme preseči 50.000 KE/ml.

V Sloveniji je mikrobiološka kakovost surovega mleka zelo dobra in je primerljiva z mlekarsko razvitimi deželami. V letu 2005 je imelo kar 99,5 % od skupno 448,5 milijonov litrov odkupljenega mleka vsebnost SŠMO nižjo od 100.000 KE/ml, 93,6 % mleka pa je imelo do 50.000 KE/ml (Godič Torkar in Golc Teger, 2008)

Po letu 2005 pa so nekatere slovenske mlekarnice prešle na dvodnevno zbiranje mleka namesto vsakodnevnega. Tako mleko ostaja v hladilnih bazenih dva dni in se meša s toplim mlekom ob vsaki molži. V letu 2008 pa je bila izvedena raziskava, v kateri so bili odvzeti 203 vzorci mleka iz hladilnih bazenov in transportnih cistern, od katerih je 23,6 % vzorcev preseglo mejo 100.000 KE/ml (Godič Torkar in Golc Teger, 2008).

## 2.2 BAKTERIJE RODU *Lactobacillus*

Bakterije tega rodu spadajo med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije, ki so istočasno najpomembnejša skupina industrijsko uporabnih bakterij v živilstvu. To so po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene paličice. V okolju z nizko vrednostjo pH se barvajo po Gramu negativno. Ne vsebujejo porfirinov in citokromov, nimajo transportne verige elektronov, energijo pa pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Prehransko so zahtevni, poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokisliline, vitamini in organske baze. Naseljujejo okoljske niše, ki vsebujejo potrebna hranila, med drugim številne živilske surovine rastlinskega in živalskega izvora (Adamič in sod., 2003). Laktobacili se razmnožujejo pri temperaturah od 2 °C do 53 °C (odvisno od vrste), optimum je med 30 °C in 40 °C. Rastejo pri vrednostih pH od 3,0 do 7,0, minimalna vrednost  $a_w$  za rast je okoli 0,90 (Adamič in sod., 2003).

Glede na končne produkte presnove jih delimo v dve skupini:

- Homofermentativne, pri katerih je končni produkt razgradnje glukoze mlečna kislina,
- Heterofermentativne, ki iz glukoze tvorijo mlečno in očetno kislino ter ostale produkte, med njimi pline (ogljikov dioksid) (Adamič in sod., 2003).

## 2.3 BAKTERIJE VRSTE *Lactococcus lactis*

Poleg laktobacilov, so tudi bakterije vrste *Lactococcus lactis* eni najpomembnejših mlečnokislinskih mikroorganizmov, ki se v mlekarski industriji širom po svetu uporabljajo kot tehnološke oz. starterske kulture. Prvič so bile izolirane koncem 18. stoletja iz spontano fermentiranih mlečnih izdelkov. Bakterije vrste *L. lactis* so po Gramu pozitivni, mezofilni, fakultativno anaerobni, nesprogeni in negibljivi koki. Imajo homofermentativen metabolizem ogljikovih hidratov, kjer iz glukoze nastaja predvsem L(+) mlečna kislina. Njihova optimalna temperatura rasti je 25-30 °C njihova rast je inhibirana pri vrednosti pH 4,5 ali nižje, za rast ne potrebujejo kisika, vendar ga tolerirajo (Courtney, 1999).

Poznamo dve podvrsti *L. lactis* subspp. *lactis* in *cremoris*, ki se razlikujeta po fenotipskih lastnostih. *L. lactis* subspp. *lactis* raste tudi pri 40 °C, tolerira prisotnost NaCl v koncentraciji 4 %, in tvori amoniaka iz arginina, medtem ko za *L. lactis* subspp. *cremoris* omenjene lastnosti ne veljajo. Znotraj podvrste *lactis* obstaja biovarianta *L. lactis* subspp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, ki se razlikuje po zmožnosti metaboliziranja citrata. Eden od pomembnejših produktov metabolizma *L. lactis* subspp. *lactis* biovar. *diacetylactis* je tudi diacetil, spojina z vonjem po maslu. Ostali končni produkti pa so CO<sub>2</sub>, acetat, laktat, formiat, aceton in butandiol. Proizvodnja diacetila je posebno pomembna pri proizvodnji pinjenca (Courtney, 1999).

Nekateri sevi vrste *L. lactis* proizvajajo bakteriocine, to so peptidi ali proteini, ki protimikrobno delujejo proti sorodnim bakterijskim vrstam. Bakteriocini sevov vrste *L. lactis* najpogosteje pripadajo majhnim, membransko aktivnim, toplotno stabilnim lantibiotikom, za katere je značilna prisotnost lantionina in obsežne posttranslacijske spremembe, oziroma nelantibiotikom, ki so brez lantionina in so podvrženi le manjšim posttranslacijskim spremembam. Med lantibiotiki, ki ga proizvajajo nekateri sevi vrste *L. lactis* subspp. *Lactis*, je najbolj znan in najbolj opisan nizin, ki je zaenkrat tudi edini bakteriocin, dovoljen kot živilski dodatek. Nizin inhibira vegetativne celice bakterij *Listeria monocytogenes*, *Bacillus*, *Clostridium* in nekaterih mlečno kislinskih bakterij, in preprečuje rast spor rodov *Bacillus* in *Clostridium* (Courtney, 1999).

## 2.4 BAKTERIJE RODU *Enterococcus*

Bakterije rodu *Enterococcus* so Gram pozitivni koki, ki se pojavljajo v parih ali kratkih verižicah. Prvotno so bili vključeni v rod *Streptococcus* kot »fekalni« streptokoki oz. kot streptokoki skupine D po Lancefieldovi razvrstitvi. So ubikvitarne narave, kar pomeni, da jih najdemo praktično povsod. Čeprav velja za njihov primarni habitat prebavni trakt ljudi in živali, jih izoliramo tudi iz zemlje, vode, rastlin, insektov itd., zato so pogosto prisotni v živilih. Ker so relativno odporne bakterije, preživijo mnoge postopke obdelave in predelave živil. V tehnologiji mesnih izdelkov lahko povzročijo kvarjenje. Zaradi njihove primarne ekološke niše, prebavni trakt sesalcev, pa je prisotnost enterokokov tradicionalno veljala kot indikator onesnaženja vode oz. higiensko oporečnega stanja živil ter njihove proizvodnje, predvsem določenih tipov živil kot so na primer zamrznjena živila. V neugodnih okoljskih razmerah so enterokoki odpornejši od sicer pogosteje uporabljenih indikatorjev fekalnega onesnaženja, koliformnih organizmov, vključno z bakterijami vrste *E. coli*. Vendar pa je pomen enterokokov v živilstvu v marsičem še nedorečen. Poleg tega, da se je s spremembami v klasifikaciji spremenil tudi njihov status kot indikatorskih mikroorganizmov fekalnega onesnaženja, ni povsem jasen njihov vpliv na varnost živil. Po eni strani so danes enterokoki sestavni del starterskih oz. podpornih kultur v mlekarski industriji, saj pomembno prispevajo predvsem k oblikovanju senzoričnih lastnosti fermentiranih mlečnih izdelkov. Po drugi strani pa lahko v nekaterih primerih povzročajo črevesna obolenja, narašča pa tudi število bolnišničnih okužb, povezanih z enterokoki. Enterokoki lahko sintetizirajo biogene amine, so lahko prenašalci genov, odgovornih za odpornost proti antibiotikom, ter lahko posedujejo genske zapise za virulene dejavnike (Giraffa, 2002). In ravno ta dvoličnost enterokokov predstavlja poseben izziv raziskovalcem, saj so znane tudi nekatere vrste oz. sevi enterokokov, ki igrajo vodilno

vlogo pri fermentaciji nekaterih vrst sirov, uporabljajo pa jih tudi v proizvodnji probiotičnih fermentiranih mlečnih izdelkov (Franz in sod., 1999).

## 2.5 BAKTERIJE VRSTE *Streptococcus thermophilus*

Bakterije vrste *Str. thermophilus* spadajo med termofilne mlečnokislinske bakterije. So po Gramu pozitivni koki, premera od 0,7 do 0,9 µm. Pojavljajo se lahko v parih ali verižicah (Pearce in Flint, 2002). Podatki o optimalni temperaturi rasti se v literaturi rahlo razlikujejo. Tako Pearce in Flint (2002) navajata optimalno temperaturo rasti med 40 in 45 °C, Rogelj in Perko (2003) ter Robinson (2002) pa navajajo kot optimalno temperaturo rasti 37 °C. Minimalna temperatura, ki še omogoča rast je 20 – 25 °C, maksimalna temperatura pa 47 - 50 °C. Fermentirajo laktozo, fruktozo, saharozo in glukozo. Bakterije vrste *Str. thermophilus* so precej občutljive za antibiotike in dezinfekcijska sredstva. So slabi proteoliti (Pearce in Flint, 2002).

Vrsta *Str. thermophilus* je dobro prilagojena na razmere v mleku in mlečnih izdelkih, zato je praktično ne najdemo v drugih ekoloških nišah. Za svojo rast potrebujejo proste aminokislino: glutaminsko kislino, histidin, metionin, cistein, valin, levcin, izolevcin, triptofan, arginin in tirozin. Ker je vsebnost razpoložljivega dušika v surovem mleku običajno nezadostna za dobro rast, si pomagamo tako, da mleko za proizvodnjo jogurta segrevamo na ustrezno temperaturo, da povzročimo precipitacijo sirotkinih beljakovin ali pa dodamo kulturo bakterij, ki so dobri proteoliti. Med slednje sodijo že omenjeni laktobacili (Pearce in Flint, 2002).

Bakterije vrste *Str. thermophilus* so homofermentativne. Laktozo fermentirajo po Embden – Meyerhofovi poti, pri čemer nastane L(+) laktat. S pomočjo sistema antiport v celice vstopa laktoza, kjer pride do njene cepitve, in izstopa galaktoza, glukoza pa se pretvarja v L(+) laktat (Pearce in Flint, 2002).

## 2.6 PSIHROTROFNI MIKROORGANIZMI

Vpeljava sodobnih tehnologij v pridelavi in predelavi mleka, predvsem vpeljavo hlajenja na celotni poti mleka od farme do porabnika, je povzročila tudi spremembo sestave mikroflore. Najbolj se je spremenila mikroflora surovega mleka, v katerem so pred vpeljavo hlajenja prevladovali po Gramu pozitivne, kislinotvorne bakterije, s hlajenjem mleka pa je postala prevladujoča po Gramu negativna, psihrotrofna mikroflora, predvsem z vrstami iz rodu *Pseudomonas* kot njenega najbolj značilnega predstavnika (Rogelj, 2003).

Kontaminacija mleka z mezofilnimi in psihrotrofnimi mikroorganizmi je odvisna od: zdravstvenega stanja živali, higiene okolja v katerem se živali redi in molze, načina priprave vimena in molže, kvalitete čiščenja molzne opreme, hladilnih bazenov in pomožne opreme (Cempírková, 2007). Hitrost hlajenja mleka na zeleno temperaturo in dolžina skladiščenja sta druga pomembna faktorja, ki vplivata na njihovo namnožitev v mleku.

Psihrotrofne bakterije lahko rastejo pri temperaturi 7 °C kljub temu, da je optimalna temperatura za njihovo rast višja. Hitro hlajenje in hladno skladiščenje mleka favorizirata rast psihrotrofov v mleku (Barbano in sod., 2006). Psihrotrofi postanejo med hladnim skladiščenjem prevladujoča mikroflora in njihovi izvencelični encimi, predvsem proteaze in lipaze, prispevajo h kvarjenju mlečnih izdelkov (Hantsis-Zacharov in Halpern, 2007).

### 2.6.1 Bakterije rodu *Pseudomonas*

Bakterije rodu *Pseudomonas* so v naravi zelo razširjene. Najdemo jih v zemlji, vodi, zraku, na rastlinah in živilih, bogatih z beljakovinami (meso, jajca, mleko). So najštevilčnejši rod po Gramu negativnih bakterij, ki naseljujejo surova živila. Kljub številnim taksonomskim spremembam, rod *Pseudomonas* še vedno vključuje preko 130 vrst, za katere je značilna velika raznolikost. Številne vrste so psihrofilne ali psihrotrofne, zato so to najpomembnejše bakterije, ki povzročajo kvar hlajenih živil. So citokromoksidaza-pozitivne, striktno aerobne bakterije, ki se izjemno hitro razmnožujejo, celo v temperaturnem območju med 0 in 7 °C. Običajno predstavljajo manj kot 10 % normalne mikrobne združbe surovega mleka, a zaradi zelo kratkega generacijskega časa v mikrobni združbah, izoliranih iz pokvarjenih izdelkov, prevladujejo. Že pri nizkih temperaturah hlajenih živil sintetizirajo številne proteolitične in lipolitične encime. V mleku na primer hidrolizirajo kazein in razgrajujejo mlečno maščobo. Optimalno rastejo pri 20 °C do 30 °C, vendar rastejo tudi pri –6 °C. Minimalna vrednost  $a_w$  za rast je od 0,97 do 0,98, ne rastejo pri vrednosti pH pod 4,5. K pogostosti izolacije pseudomonasov s površine živil in opreme v živilstvu vsekakor prispeva njihova sposobnost pritrjevanja na trde površine in tvorba biofilmov (Hood in sod., 1997) ter relativno pogosta naravna odpornost proti antimikrobnim sredstvom, na primer proti razkužilom, ki se uporabljajo v živilstvu (Langsrud in sod., 2003). Pri nizki temperaturi in visoki vlažnosti povzročajo kvar surovega mesa, ki se kaže kot sluzavost, proteoliza, žarkost mesnin in tvorba pigmentov. *P. aeruginosa* lahko povzroči zastrupitve s hrano, če je koncentracija celic visoka (več kot  $10^6$  KE v g ali ml) (Adamič in sod., 2003).

Pri 4 °C in ob primerni aeraciji mleka lahko sevi iz rodu *Pseudomonas* spp. proizvedejo dovolj proteinaz za razgradnjo vsega kazeina v topne peptide. Ta rod je znan tudi kot močan lipolit (Sørhaug in Stepaniak, 1991).

Zanimiva posledica encimske aktivnosti psihrotrofov je spodbujanje rasti starterskih mlečnokislinskih bakterij. Verjetna razlaga je, da mlečnokislinske bakterije izrabljajo peptide, aminokislino in amoniak, ki jih v mleko sproščajo psihrotrofi. Po drugi strani pa lahko proste maščobne kisline, ki jih sprošča pseudomonas, inhibirajo rast mlečnokislinskih bakterij (Jaspe in sod., 1995).

### 2.6.2 Vpliv na kvaliteto mlečnih izdelkov

Kvaliteta mlečnih izdelkov je lahko prizadeta zaradi delovanja toplotno odpornih encimov, ki jih psihrotrofi izločijo v surovo mleko pred toplotno obdelavo (Preglednica 2), ali zaradi delovanja encimov in drugih produktov, ki jih psihrotrofi proizvajajo med rastejo med hladnim skladiščenjem mlečnih izdelkov (Preglednica 3).

V številnih državah so vsi mlečni izdelki narejeni iz skladiščenega mleka; zato je malo virov o komercialnih izdelkih narejenih iz neskladiščenega mleka (Stepaniak, 1991).

Preglednica 2: Vpliv rasti psihrotrofov v surovem mleku pred toplotno obdelavo na kakovost mlečnih izdelkov (Sorhaug in Stepaniak, 1997).

Tip izdelka	Log KE/ml psihrotrofov v surovem mleku	Učinek na kvaliteto
UHT mleko	5,9	Sladko sirjenje ne prej kot v 20 tednih
	6,9-7,2	Sladko sirjenje po 2-10 tednih, postopno izgubljanje svežine, nečistost, grenak okus
Mleko v prahu, liofilizirano mleko	6,3-7	Slabša toplotna stabilnost, povečano penjenje rekonstituiranega mleka
Pasterizirano mleko	5,5	Slabši okus v primerjavi s pasteriziranim mlekom, narejenim iz svežega mleka
	7-8	Krajši rok trajanja, tehnološki problemi pri toplotni obdelavi mleka
Trdi siri	6,5-7,5	Žarkost
	7,5-8,3	Različne napake okusa; predvsem žarkost in milnat okus, zmanjšana dobit sira
Skuta	5-7,8	Značilna korelacija med številom psihrotrofov v surovem mleku in grenkim okusom skute
Maslo	nedoločeno	Hitrejši razvoj žarkosti v maslu, izdelanega iz skladiščenega mleka kot v maslu, izdelanega iz neskladiščenega mleka; lipaza ki jo proizvaja vrsta <i>Pseudomonas</i> je bila aktivna v zmrznjenem maslu
Jogurt	7,6-7,8	Grenki, nečisti ali sadni okusi, odvisno od vrste mikroflоре

Preglednica 3: Vpliv rasti psihrotrofov med hladnim skladiščenjem mlečnih izdelkov na njihovo kakovost (Sorhaug in Stepaniak, 1997).

Tip izdelka	Psihrotrofi (log KE/ml) ob kvaru	Učinek na kvaliteto
Pasterizirano mleko in smetana	6-7,5	Priokusi; grenkoba, nečisti okusi
Skuta	8	Grenak, nečist, sadni okusi
Pinjenec	nedoločeno	Zmanjšana vsebnost diacetila
Maslo	nedoločeno	Žarek okus



### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 NAČRT POSKUSA

Raziskava je bila opravljena na vzorcih mleka, ki so bili odvzeti v vaški zbiralnici v Vanči vasi, v katero vozi mleko šest okoliških kmetov. Mleko se v zbiralnici ohladi na 4 °C in vsak drugi dan odvaža z avtocisterno v mlekarno.

Mleko se v zbiralnici zbira po naslednjem redu:

1. dan: 7:45-8:00 oddaja mleka jutranje molže (predhodno zbiralec očisti hladilni bazen)  
20:00-20:15 oddaja mleka večerne molže
2. dan: 7:45-8:00 oddaja jutranjega mleka  
20:00-20:15 oddaja mleka večerne molže
3. dan: 5:30 odvoz mleka v mlekarno

Poskus smo izvedli poleti 2009, v obdobju od 15. julija do 8. avgusta. V tem obdobju smo spremljali gibanje različnih skupin mikrobnih populacij z vzorčenjem mleka pri 10-ih ciklih dvodnevnega zbiranja mleka. Pri vsakem ciklu dvodnevnega zbiranja mleka smo odvzeli 4 vzorce po naslednjem redu:

- Vzorec A je bil odvzet po ohladitvi jutranjega mleka prvega dne na želeno temperaturo (4 °C)
- Vzorec B je bil odvzet drugi dan zjutraj pred dodajanjem mleka jutranje molže
- Vzorec C je bil odvzet drugi dan zjutraj, ko se je skupno mleko treh molž ohladilo na želeno temperaturo (4 °C).
- Vzorec D je bil odvzet tretji dan zjutraj pred odvozom mleka v mlekarno

Vse vzorce smo takoj po odvzemu shranili v hladilno torbo in jih v najkrajšem možnem času prinesli do laboratorija. Tu smo vzorce primerno razredčili, nacepili na izbrana gojišča in inkubirali pri predpisanih temperaturah:

- za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov in skupnega števila proteolitov smo uporabili trdno gojišče Plate Count Agar (PCA) z dodatkom mleka v prahu ter inkubirali 48 h pri 30 °C
- za ugotavljanje psihrotrofnih mikroorganizmov in proteolitskih psihrotrofov smo uporabili trdno gojišče PCA z dodatkom mleka v prahu ter inkubirali 7 dni pri 7 °C
- za ugotavljanje prisotnosti laktobacilov smo uporabili trdno gojišče deMan-Rogosa Sharpe (MRS) ter inkubirali 48 h pri 37 °C
- za ugotavljanje prisotnosti laktokokov in enterokokov smo uporabili trdno gojišče M17 ter inkubirali 48 h pri 37 °C

Po končanem osnovnem poskusu smo z nekaj gojišč izrasle kolonije sprali in iz tako pripravljenih konzorcijev, kolonij osamili celokupno DNA ter s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR-polymerase chain reaction) in gelske elektroforeze potrdili prisotnost nekaterih rodov oz. vrst bakterij.

### 3.1.1 Opis zbiralnice

Vzorčenje je potekalo v vaški zbiralnici, ki stoji na ravnici ob glavni cesti skozi vas. Notranji tloris zbiralnice je 430x330 cm, v njej se nahaja starejši (približno 30 let) bazen znamke alfa-laval, volumna 1200 litrov. Zbiralnica ima vrata, okno in za kompresorjem hladilnega bazena še eno odprtino za zračenje. Okno in odprtina za zračenje sta bili ves čas poskusa zaprta le z mrežo, ki je preprečevala prehod insektom, a omogočala zračenje.



Slika 1: Zbiralnica mleka



Slika 2: Hladilni bazen

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Vzorci

V poskusu smo odvzeli 10 serij s po štirimi vzorci ohlajenega mleka, skupaj 40 vzorcev. Vzorce smo odvzeli s pomočjo sterilne zajemalke v sterilne vzorčne stekleničke in jih v hladilni torbi odnesli v laboratorij.

### 3.2.2 Gojišča in raztopine

#### 3.2.2.1 Gojišče PCA z dodatkom mleka v prahu

Trdno hranljivo gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, 1.05463, Darmstadt, Nemčija). Zatehtali smo 22,5 g gojišča PCA v prahu ter ga s segrevanjem raztopili v 1 L destilirane vode. Gojišče smo razdelili v stekleničke (po 180 ml) ter avtoklavirali 15 min pri 121 °C.

Posebej smo pripravili rekonstituirano mleko (Merck, 1.15363, Darmstadt, Nemčija) tako, da smo 20 g posnetega mleka v prahu raztopili v 200 ml destilirane vode ter avtoklavirali 15 min pri 110 °C.

Pred uporabo smo trdno gojišče PCA, ki smo ga hranili v hladilniku, s segrevanjem v mikrovalovni pečici raztopili in ko je bilo ohlajeno na 45 °C smo na 180 ml gojišča dodali 20 ml ogretega rekonstituiranega mleka. Tako pripravljeno gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot skupnega števila mikroorganizmov, proteolitov, psihrotrofov in proteolitskih psihrotrofov.

#### 3.2.2.2 Gojišče MRS

Trdno hranljivo gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, 1.10660, Darmstadt, Nemčija). Zatehtali smo 66,2 g gojišča MRS v prahu ter ga s segrevanjem raztopili v 1 L destilirane vode. Gojišče smo razdelili v stekleničke (po 200 ml) ter avtoklavirali 15 min pri 115 °C. Pred razlivanjem smo ga ohladili na 45 °C. Tako pripravljeno gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktobacilov.

#### 3.2.2.3 Gojišče M17

Trdno hranljivo gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, 1.15108, Darmstadt, Nemčija). Zatehtali smo 55 g gojišča M17 v prahu ter ga s segrevanjem raztopili v 1 L destilirane vode. Gojišče smo razdelili v stekleničke (po 200 ml) ter avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Pred razlivanjem smo ga ohladili na 45 °C. Tako

pripravljeno gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktokokov in enterokokov.

#### 3.2.2.4 Fiziološka raztopina

S pomočjo Ringerjevih tablet smo po navodilih proizvajalca (Merck, 1.15525, Darmstadt, Nemčija) pripravili  $\frac{1}{4}$  Ringerjeve raztopine. V epruvete smo razdelili po 9,4 ml raztopine ter jih avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Raztopino smo uporabljali za razredčevanje po Kochu in pri spiranju zraslih kolonij s površine gojišč.

#### 3.2.2.5 Pufer TAE (Tris Acetatni EDTA pufer)

Iz 242 g Tris baze (Sigma, T6066, Steinheim, Nemčija), 57,1 ml ledocetne kisline (Fluka, 45731, Buchs, Švica) in 100 ml 0,5 M EDTA (Sigma, E5134, Steinheim, Nemčija), smo pripravili 50-kratno založno raztopino. Pred uporabo smo raztopino razredčili z vodo v razmerju 1:50.

1-kratni pufer TAE smo uporabljali pri analizah pomnožkov PCR s pomočjo gelske elektroforeze.

#### 3.2.2.6 Pufer TE (Tris EDTA pufer)

Iz 100 mM Tris-Cl (pH 8.0) (Sigma, T3253, Steinheim, Nemčija) in 10mM EDTA (pH 8.0) (Sigma, E5134, Steinheim, Nemčija) smo pripravili 10-kratno založno raztopino. Pred uporabo smo raztopino razredčili z vodo v razmerju 1:10. 1-kratni pufer TE smo uporabili pri izolaciji DNA.

### 3.2.3 Kemikalije

#### 3.2.3.1 Izolacija DNA

- komercialni set za izolacijo genomske DNA – Maxwell 16 DNA Purification Kit (Promega, AS1030, Madison, WI, ZDA)
- založna raztopina mešanice encimov za lizo: 10  $\mu$ l mutanolizina (Sigma, M9901, St. Louis, ZDA) in 25 mg lizocima (Sigma, L6876, St. Louis, ZDA) / ml sterilne miliQ
- založna raztopina RNaza (Sigma, R6513 St. Louis, ZDA): 10 mg / ml sterilne miliQ

### 3.2.3.2 Mešanica za PCR

- 10 mM dNTP (Fermentas, R0192 Latvija)
- 5x zeleni GoTaq<sup>®</sup> Flexi pufer za polimerazo brez MgCl<sub>2</sub> (Promega, M8911, Madison, WI, ZDA)
- 5x zeleni GoTaq<sup>®</sup> pufer z dodanim MgCl<sub>2</sub> (7,5 mM) (Promega, M791A, Madison, WI, ZDA)
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, A351B Madison, WI, ZDA)
- GoTaq DNA Polimeraza (5u/μl) (Promega, M8301, Madison, WI, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi: (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija )
  - za rod *Lactobacillus* (Coeuret in sod., 2004):  
LbLMA 1 rev (5'-CTCAAACTAAACAAAAGTTTC-3')
  - R16-1 (5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3')
  - za vrsto *Lactococcus lactis* (Barakat in sod., 2000)  
27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
  - Lla (5'-CAGTCGGTACAAGTACCAAC-3')
  - za rod *Enterococcus* (Deasy in sod., 2000)  
E1 (5'-TCAACCGGGGAGGGT-3')
  - E2 (5'-ATTACTAGCGATTCCGG-3')
  - za vrsto *Streptococcus thermophilus* (Timisjärvi in Alatossava, 1997)  
Th I (5'-ACGGAATGTAAGTTGAGTTTC-3')
  - Th II (5'-TTTGGCCTTTCGACCTAAC-3')
  - za rod *Pseudomonas* (Marchand in sod., 2009)  
SM2F (5' AAATCGATAGCTTCAGCCAT 3')
  - SM3R (5' TTGAGGTTGATCTTCTGGTT 3')
- Pozitivna kontrola za rod *Lactobacillus*: *Lb paracasei* DSM 5622 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany)
- Pozitivna kontrola za vrsto *Lactococcus lactis*: *Lc. lactis ssp. lactis* DSM 20481<sup>T</sup> (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany)
- Pozitivna kontrola za rod *Enterococcus*: *E. faecalis* F4 IM 270 (Mikrobna zbirka Katedre za mlekarstvo, Domžale, Slovenija)
- Pozitivna kontrola za vrsto *Streptococcus thermophilus*: *Str. thermophilus* CCM 7711 (Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic)
- Pozitivna kontrola za rod *Pseudomonas*: *P. fluorescens* LMG 1794<sup>T</sup> (LMG Culture Collection, Universiteit Gent, Gent, Belgium)

### 3.2.3.3 Elektroforeza in barvanje

- 1-x pufer TAE
- Barvilo Sybr Safe<sup>™</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen, S33102, ZDA)
- Agarozna SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose (Lonza, 50004, Rockland, ME, ZDA)
- Molekularni označevalec velikosti 100 bp (Gene Ruler<sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder, Fermentas, SM0243 Litva)
- Molekularni označevalec velikosti 1 kb (Gene Ruler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder, Fermentas, SM0313 Litva)

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Spremljanje fizikalnih parametrov

Med zbiranjem mleka smo s pomočjo zapisovalca podatkov s štirimi temperaturnimi tipali beležili temperaturo mleka in zbiralnice. Tri tipala so bila potopljena v mleko v bazenu, četrto tipalo pa je merilo temperaturo zbiralnice. Zapisovalec podatkov je beležil temperature vsakih pet minut, njegova natančnost pa je bila 0,4 °C. Temperature, zabeležene med zbiranjem mleka, smo predstavili v grafih, s pomočjo katerih smo ugotavljali, kakšno je nihanje temperature med skladiščenjem in ob dolivanju toplega mleka.

Merili smo temperaturo mleka, ki so ga po vsaki molži prinašali kmetje. Od Agencije republike Slovenije za okolje smo pridobili podatke o temperaturah iz avtomatske meteorološke postaje Murska Sobota.

#### 3.3.2 Klasična mikrobiološka tehnika gojenja

Vzorci mleka smo redčili po Kochu, jih nacepili na ustrezna gojišča in inkubirali pri predpisani temperaturi določen čas:

- PCA z mlekom v prahu: 30 °C, 48 h (SŠMO in proteoliti)  
7 °C, 7 dni (psihrotrofi in proteolitski psihrotrofi)
- MRS: 37 °C, 48 h (laktobacili)
- M17: 37 °C 48 h (laktokoki in enterokoki)

S štetjem kolonij na ploščah z različnimi razredčitvami in preračunom na ml smo ugotovili število kolonijskih enot posameznih bakterijskih skupin v vzorcih mleka. Nekaj plošč z izraslimi kolonijami smo shranili v hladilniku in iz njih pripravili konzorcije kolonij.

#### 3.3.3 Ugotavljanje prisotnosti posameznih bakterijskih rodov in vrst

##### 3.3.3.1 Priprava konzorcijev kolonij s petrijevih plošč

Na petrijevo ploščo z izraslimi kolonijami smo s pipeto nanesti 1 ml fiziološke raztopine. S pipeto smo srkali fiziološko raztopino in z njo s plošče spirali kolonije. Ker je gojišče vpilo del fiziološke raztopine, smo dodali še 1 ml fiziološke raztopine in nadaljevali s spiranjem. Tako dobljene vzorce konzorcijev kolonij smo shranili v mikroeprevetah ter jih zamrznjene shranili do nadaljnje analize.

### 3.3.3.2 Izolacija DNA

- Odmrznjene konzorcije kolonij (približno 1,5 ml) smo centrifugirali in previdno odlili supernatant.
- Usedline celic smo zmešali z dodatkom 400  $\mu$ l pufra TE.
- Nato smo dodali še po 100  $\mu$ l založne mešanice encimov za lizo.
- Pripravljene mešanice smo inkubirali 2 h pri 37 °C.
- Po inkubaciji smo odpipetirali celotne vzorce v prve prostorčke predpripravljenih kartuš.
- V prostorčke na drugem koncu kartuš smo vstavili potopne bate.
- Pripravljene kartuše z vzorci smo vstavili v aparat Maxwell<sup>®</sup> 16.
- Za vsak vzorec smo poleg kartuše vstavili še elucijsko posodico s 300  $\mu$ l elucijskega pufra in 0,6  $\mu$ l založne raztopine RNaze.
- Nato smo po navodilih proizvajalca na aparatu zagnali program za izolacijo DNA.
- Po končanem programu je aparat osamljeno DNA zbral v elucijskih posodicah, ki smo jih prestavili v magnetni podstavek in odpipetirali očiščeno DNA v mikroeprovete. DNA smo hranili v zamrzovalniku pri –20 °C.

### 3.3.3.3 Priprava reakcijske mešanice za PCR

Za izvedbo PCR smo kot tarčno DNA uporabili vzorce celokupne DNA, ki smo jo pripravili iz konzorcijev kolonij s posameznih gojišč. Reakcijsko mešanico za PCR smo pripravili v posebni komori. Pri delu smo uporabljali rokavice za enkratno uporabo. Po končanem delu smo prostor razkužili in osvetlili z UV-svetlobo za dve uri. Vse kemikalije, ki smo jih uporabili za pripravo mešanic PCR, smo imeli ves čas na ledu. Volumni posameznih sestavin mešanice za en vzorec in dolžine dobljenih specifičnih pomnožkov so prikazani v Preglednici 4. Glede na število vzorcev smo izračunali volumne posameznih sestavin, potrebnih za mešanico.

Preglednica 4: Sestava reakcijskih mešanitic za PCR in dolžine specifičnih pomnožkov

Sestavina	Rod, vrsta				
	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
Pufer	4 µl GoTag <sup>®</sup> pufer z MgCl <sub>2</sub> (7,5 mM),	4 µl GoTag <sup>®</sup> pufer z MgCl <sub>2</sub> (7,5 mM),	10 µl GoTaq <sup>®</sup> Flexi pufer brez MgCl <sub>2</sub>	4 µl GoTag <sup>®</sup> pufer z MgCl <sub>2</sub> (7,5 mM),	4 µl GoTag <sup>®</sup> pufer z MgCl <sub>2</sub> (7,5 mM),
MgCl <sub>2</sub>	/	/	10 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	/	/
Oligonukleotidni začetnik 1	1 µM LbLMA	1 µM 27f	1 µM E1	1 µM Th I	1 µM SM2F
Oligonukleotidni začetnik 2	1 µM R16-1	1 µM L1a	1 µM E2	1 µM Th II	1 µM SM3R
dNTP	0,2 µl	0,2 µl	0,5 µl	0,2 µl	0,2 µl
GoTaq <sup>®</sup> DNA polimeraza	0,1 µl	0,1 µl	0,2 µl	0,1 µl	0,1 µl
Dest. H <sub>2</sub> O	13,3 µl	13,3 µl	26,3 µl	13,3 µl	13,3 µl
Vzorec DNA	2 µl	2 µl	2 µl	0,2 µl	2 µl
Skupaj:	20 µl	20 µl	50 µl	20 µl	20 µl
Dolžina pomnožka:	250 bp	87 bp	1775 bp	259 bp	850 bp

### 3.3.3.4 Potek PCR

Za ugotavljanje prisotnosti posameznih skupin mikroorganizmov smo uporabili molekularno metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR), ki temelji na *in vitro* pomnoževanju dela tarčne DNA z encimom DNA polimerazo v cikličnem termostatu v treh fazah. V prvi fazi poteče denaturacija dvovertične DNA, v drugi fazi poteče prileganje začetnih oligonukleotidov, v tretji fazi pa podaljševanje verige DNA. V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. Izbira začetnih oligonukleotidov je odvisna od vrste PCR in vrste preiskovanih mikroorganizmov, kjer pomnožimo del tarčne DNA med izbranimi začetnima oligonukleotidoma. Velikost in ustreznost nastalih pomnožkov najenostavneje preverimo z agarozno gelsko elektroforezo s pomočjo velikostne lestvice ter ustrezne pozitivne kontrole.

Mikropruvete z 20 µl ali 50 µl reakcijske mešanice smo prenesli v aparaturo za PCR (Eppendorf Mastercycler gradient). V aparaturo smo vnesli programe kot so prikazani v Preglednicah 5, 6, 7, 8 in 9.

Preglednica 5: Potek PCR za določanje bakterij rodu *Lactobacillus*

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija	95 °C	5 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prilagajanje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 s
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	30 s
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	7 min
1	Ohladitev	4 °C	∞



Preglednica 6: Potek PCR za določanje bakterij vrste *Lactococcus lactis*.

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija	99 °C	5 min
35	Denaturacija DNA	94 °C	30 s
	Prilagajanje začetnih oligonukleotidov	55 °C	45 s
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	3 min
1	Ohladitev	4 °C	∞

Preglednica 7: Potek PCR za določanje bakterij rodu *Enterococcus spp.*

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija	95 °C	5 min
25	Denaturacija DNA	94 °C	1 min
	Prilagajanje začetnih oligonukleotidov	60 °C	1 min
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	5 min
1	Ohladitev	4 °C	∞

Preglednica 8: Potek PCR za določanje bakterij *Streptococcus thermophilus*.

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija	92 °C	2 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prilagajanje začetnih oligonukleotidov	55 °C	30 s
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	30 s
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	5 min
1	Ohladitev	4 °C	∞

Preglednica 9: Potek PCR za določanje bakterij rodu *Pseudomonas spp.*

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija	95 °C	5 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prilagajanje začetnih oligonukleotidov	60 °C	30 s
	Podaljševanje verige DNA	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige DNA	72 °C	8 min
1	Ohladitev	4 °C	∞

### 3.3.3.5 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozni gel smo pripravili s pufrom TAE in agaroze. V mikrovalovni pečici smo raztopino segrevali do stopnje, ko je ta postala bistra in homogena. Agarozno raztopino smo nato ohlajeno vlili v model z glavnikom. Počakali smo, da se je gel strdil in iz gela odstranili glavnik. Nato smo gel potopili v pufer TAE v posodi za elektroforezo in v žepke po vrsti nanесли po 10 µL pomnožkov preiskovanih vzorcev in pozitivnih kontrol ter po 2,5 µL molekularnega označevalca velikosti 100bp in 1 kb. Elektroforeza je potekala pri 100 V. Po končani elektroforezi smo gel potopili v barvilo Sybr Safe (10 µL barvila / 100 ml pufera TAE) za 30 min. Agarozni gel smo analizirali v transiluminatorju s pomočjo UV-svetlobe pri valovni dolžini 254 nm ter rezultate dokumentirali.

## 4 REZULTATI

### 4.1 UGOTOVITVE STANJA NA TERENU

#### 4.1.1 Zbiranje mleka

Mleko se je v zbiralnici zbiralo po naslednjem redu:

1. dan: 7:45-8:00 oddaja mleka jutranje molže (predhodno zbiralec očisti hladilni bazen)  
20:00-20:15 oddaja mleka večerne molže
2. dan: 45-8:00 oddaja jutranjega mleka  
20:00-20:15 oddaja mleka večerne molže
3. dan: 5:30 odvoz mleka v mlekarno

Zbiranje mleka je potekalo po ustaljenem redu. Pred zbiranjem mleka prve molže je zbiralec temeljito očistil hladilni bazen. Nato je pripeljano mleko zlil v hladilni bazen in ga vključil.

Količino oddanega mleka so kmetje merili sami doma, tako da je zbiralec količine samo zapisoval v tabelo, na podlagi katere je ob koncu meseca izračunal količino oddanega mleka za posameznega kmeta. Ker so se kmetje urnika zbiranja mleka kar dobro držali, se je le redko zgodilo, da je bilo treba na oddajo mleka čakati.

Količine oddanega mleka so bile zelo različne in sicer od 3 pa do 76 litrov (povprečno 32 litrov) mleka na molžo. Tudi temperature oddanega mleka so bile zelo različne in sicer od 26,3 °C pa do 35,9 °C, povprečno 32,3 °C kar kaže na to, da mleko predhodno ni bilo nič hlajeno. Tako se je zbralo povprečno po 180 litrov mleka na molžo, kar je v dveh dneh od štirih molž nanese od 680 pa do 750 litrov mleka. Za prvo molžo devetega cikla smo pridobili tudi rezultate analiz vzorcev, ki jih je za namen oblikovanja cene odvezel odkupovalec, iz katerih je razvidno, da oddano mleko ni presehalo meje 100 000 KE/ml. Podatki so prikazani v Preglednici 10.

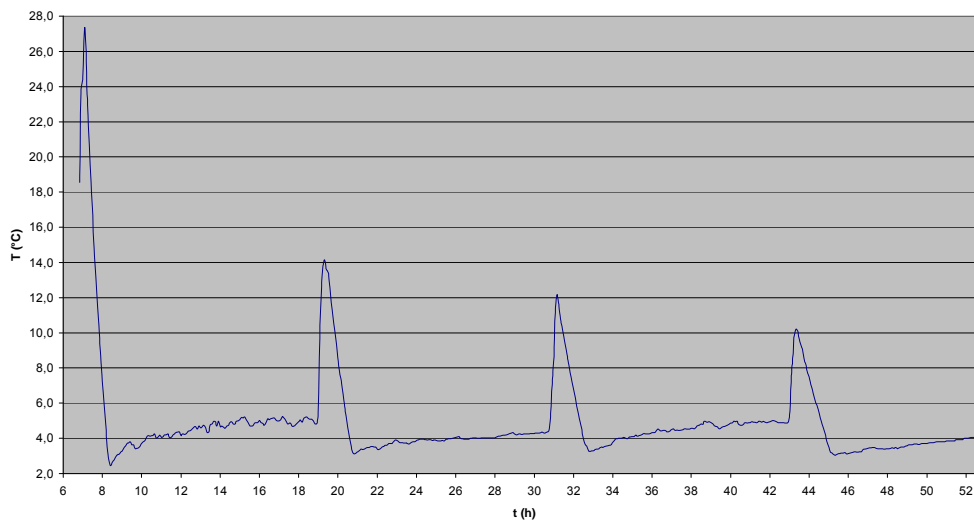
Preglednica 10: Skupno število mikroorganizmov (SŠMO) vzorcev svežega mleka odvzetih za namen odkupa

Vzorec	Kmet 1	Kmet 2	Kmet 3	Kmet 4	Kmet 5	Skupni vzorec
SŠMO (KE/ml)	43.000	34.000	45.000	33.000	100.000	50.000

#### 4.1.2 Nihanje temperature med dvodnevni zbiranjem

Ob vsakokratnem dolivanju mleka nove molže v hladilni bazen, se je temperatura mleka v bazenu dvignila nad želeno vrednost 4 °C. Hladilni bazen pa je nato celotno količino mleka hladil, kar mu je vzelo določen čas, ki je bil odvisen od količine mleka v bazenu, dviga temperature in temperature okolice. Hladilni bazen je zadovoljivo opravljal svojo nalogo,

saj je kljub visokim zunanjim temperaturam (do 33,7 °C) in visokim porastom temperature v zbiralnici (do 44,4 °C) vedno uspel ohladiti mleko pod 4 °C v največ dveh urah. Vendar pa je iz grafa na Sliki 3 razvidno, da je bilo mleko kljub temu po vsakem zbiranju nekaj časa izpostavljeno temperaturam višjim od želene (4 °C), kar je pospešilo razvoj mikroorganizmov, predvsem psihrotrofov.



Slika 3: Graf povprečnega nihanja temperature mleka med dvodnevним zbiranjem

## 4.2 REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH RAZISKAV

### 4.2.1 Skupno število mikroorganizmov

Skupno število mikroorganizmov smo ugotavljali pri vzorcih A. Rezultati so prikazani v Preglednici 11.

Preglednica 11: Skupno število mikroorganizmov v vzorcih A pri 10-ih ciklih dvodnevnega zbiranja mleka

Vzorec:	Cikel:										N (KE/ml)	povprečje
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A	245.000	234.000	263.000	580.000	220.000	264.000	277.000	249.000	164.000	205.000	270.000	

Pri določanju skupnega števila mikroorganizmov v vzorcih A smo dobili zelo različne rezultate, od 164.000 KE/ml pa do 580.000 KE/ml, kar kaže na zelo različno začetno okužbo mleka. Povprečno pa je bilo prisotnih 270.000 mikroorganizmov na mililiter mleka kar kaže na visoko okužbo mleka glede na zahteve (Pravilnik o veterinarsko-sanitarnem, 1999). Vendar visoko skupno število mikroorganizmov samo po sebi še ni problematično.

Pri zadnjih treh ciklih poskusa smo naredili še analizo vzorcev B, C in D, da bi ugotovili, kako se spreminja skupno število mikroorganizmov med dvodnevno zbiranjem mleka. Rezultati so prikazani v Preglednici 12.

Preglednica 12: Gibanje populacije skupnega števila mikroorganizmov v vzorcih A, B, C in D pri 8-10 ciklu dvodnevnega zbiranja mleka

Cikel: Vzorec:	N (KE/ml)			
	8	9	10	Povprečje
A	249.000	164.000	205.000	206.000
B	248.000	145.000	239.000	211.000
C	*	201.000	246.000	224.000
D	340.000	340.000	261.000	314.000

\* ni podatka zaradi okužbe gojišča

Analiza skupnega števila mikroorganizmov v vseh vzorcih zadnjih treh ciklov zbiranja mleka je pokazala trend rasti skupnega števila mikroorganizmov. Ta trend je bil rahel, saj se je število povečalo le za faktor 1,5.

#### 4.2.2 Skupno število proteolitov

Skupno število proteolitskih mikroorganizmov smo ugotavljali le v vzorcih A pri vseh 10-ih ciklih zbiranja mleka. Zaradi težav z gojiščem, rezultatov za prve tri cikle nimamo. Rezultati so prikazani v Preglednici 13. Skupno število proteolitov v vzorcih A se je gibalo 19.000 KE/ml pa do 38.500 KE/ml (povprečno 27.700) in je predstavljalo med 10 in 15 % skupnega števila mikroorganizmov.

Preglednica 13: Skupno število proteolitskih mikroorganizmov v vzorcih A

Cikel: Vzorec:	N (KE/ml)							
	4	5	6	7	8	9	10	Povprečje:
A	23.000	26.000	38.500	33.000	32.000	19.000	22.500	27.700

#### 4.2.3 Psihrotrofi

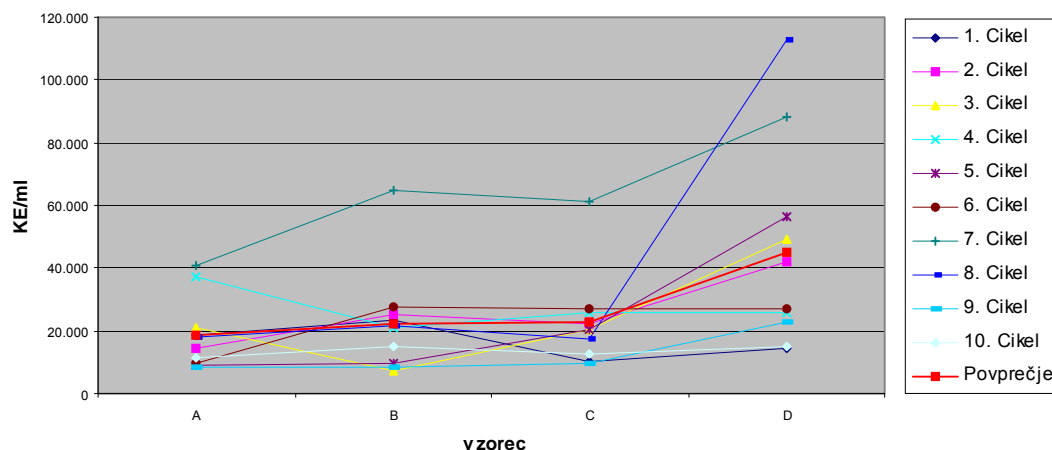
Število psihrotrofnih mikroorganizmov smo določali pri vseh vzorcih vseh 10-ih ciklov dvodnevnega zbiranja mleka, rezultati so prikazani v Preglednici 14.

Preglednica 14: Skupno število psihrotrofnih mikroorganizmov.

Cikel: Vzorec:	N (KE/ml)										Povprečje:
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	18.700	14.400	21.000	37.000	8.700	9.900	41.000	18.200	8.300	11.300	18.800
B	23.300	25.000	7.300	21.000	9.700	27.400	65.000	21.600	8.200	15.200	22.300
C	10.100	22.300	20.300	25.800	20.400	27.000	61.000	17.500	9.800	12.500	22.700
D	14.200	42.000	49.000	25.900	56.500	26.800	88.000	113.000	22.800	15.300	45.300

Začetna okužba mleka s psihrotrofi je bila zelo različna, saj smo v vzorcih A določili od 8.300 KE/ml pa do 41.000 KE/ml (povprečno 18.800 KE/ml). Psihrotrofi so predstavljali med 3,8 in 15 % (povprečno 7 %) SŠMO. Delež psihrotrofov pri nobenem od vzorcev A, razen pri ciklu 7, ni presegal 10 % celokupne populacije SŠMO, kar pomeni, da je bilo mleko pridobljeno v ustreznih higienskih razmerah (Rogelj, 2003)

Število psihrotrofov se je med skladiščenjem povečalo s povprečno 18.800 KE/ml na 45.300 KE/ml, kar pomeni povečanje za faktor 2,4. Za lažjo predstavbo je spreminjanje populacije psihrotrofov prikazano na sliki 4, iz katere je razvidno da se njihovo število najbolj poveča v času med odvzemom vzorcev C in D.



Slika 4: Spreminjanje števila psihrotrofnih mikroorganizmov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevne zbiranja mleka

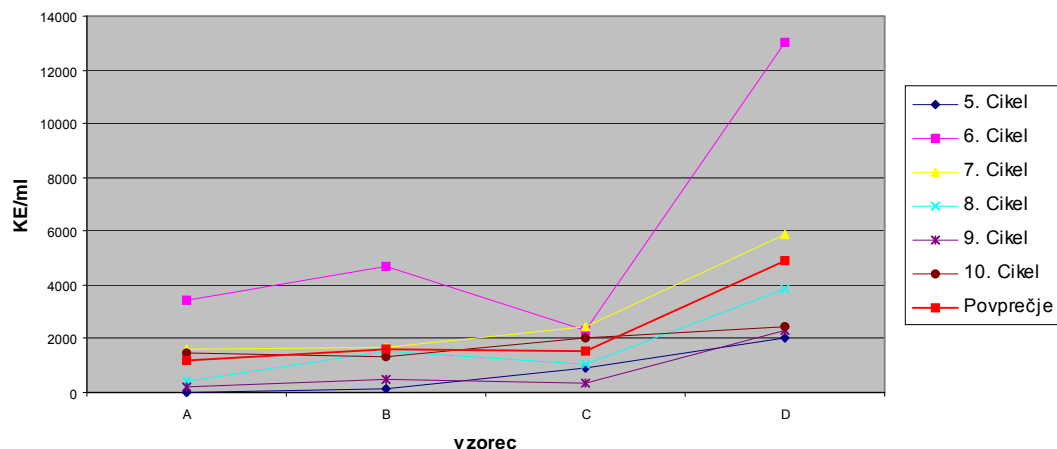
#### 4.2.4 Proteolitski psihrotrofi

Število proteolitskih psihrotrofov smo določali pri vseh vzorcih vseh 10-ih ciklov dvodnevne zbiranja mleka, a zaradi težav z gojiščem rezultatov za prve štiri cikle nimamo. Podatki so prikazani v Preglednici 15.

Preglednica 15: Število proteolitskih psihotrofov

Cikel: Vzorec:	N (KE/ml)						Povprečje:
	5	6	7	8	9	10	
A	0	3.400	1.600	400	210	1.450	1.180
B	140	4.700	1.700	1.550	470	1.300	1.640
C	900	2.300	2.450	1.070	350	2.050	1.520
D	2.000	13.000	5.900	3.850	2.300	2.450	4.920

Med dvodnevним zbiranjem mleka se je povprečno število proteolitskih psihotrofov povečalo s 1.180 KE/ml na 4.920 KE/ml kar pomeni povečanje za približno faktor 4,2. Povečal pa se je tudi njihov delež v skupini psihotrofov s 6,2 % na 10,8 %, kar kaže na to, da se v mleku pri nizkih temperaturah razmnožujejo bolje kot celotna skupina psihotrofov. Za lažjo predstavo so rezultati prikazani na sliki 5, kjer je jasno razvidno da se število proteolitskih psihotrofov najbolj poveča v času med odvzemom vzorcev C in D.



Slika 5: Spreminjanje števila proteolitskih psihotrofov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevne zbiranja mleka

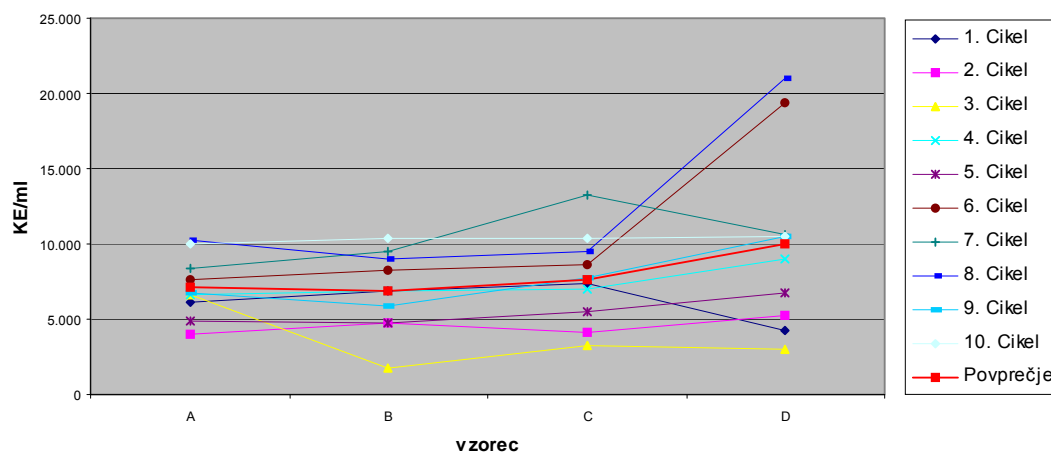
#### 4.2.5 Laktobacili

Število laktobacilov na gojišču MRS smo določali pri vseh odvzetih vzorcih mleka, rezultati so prikazani v Preglednici 16.

Preglednica 16: Število laktobacilov na gojišču MRS

Cikel: Vzorec:	N (KE/ml)										Povprečje:
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	6.100	4.000	6.600	6.600	4.900	7.650	8.400	10.300	6.800	9.950	7.130
B	6.900	4.800	1.810	6.900	4.800	8.300	9.500	9.050	5.900	10.400	6.840
C	7.400	4.100	3.220	7.000	5.550	8.600	13.200	9.450	7.800	10.350	7.670
D	4.300	5.200	3.000	9.000	6.750	19.400	10.600	21.000	10.500	10.500	10.030

Med dvodnevним zbiranjem mleka se je povprečno število laktobacilov povečalo s 7.130 KE/ml na 10.030 KE/ml, kar pomeni povečanje za faktor 1,4, kar je majhno povečanje. Za lažjo predstavbo so rezultati prikazani v grafu Slike 6 kjer je razvidno, da je bilo začetno število laktobacilov precej različno in da se je njihovo število po posameznih ciklih zbiranja mleka precej različno spreminjalo.



Slika 6: Graf spreminjanja števila laktobacilov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevnega zbiranja mleka.

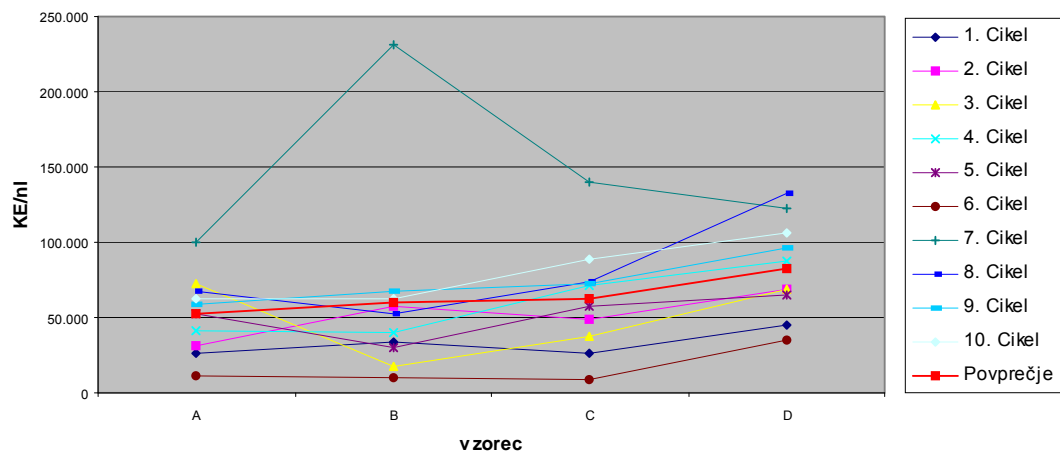
#### 4.2.6 Laktokoki in enterokoki (gojišče M17)

Število laktokokov in enterokokov na gojišču M17 smo določali pri vseh odvzetih vzorcih mleka, rezultati so prikazani v Preglednici 17.

Preglednica 17: Število laktokokov in enterokokov na gojišču M17.

Cikel: Vzorec:	N (KE/ml)										Povprečje
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A	26.800	31.800	72.000	41.000	52.500	11.100	100.500	67.000	59.000	62.000	52.400
B	33.500	58.000	17.300	40.000	30.000	10.600	231.500	52.500	68.000	63.000	60.400
C	26.800	49.000	37.000	71.000	57.000	9.050	140.500	73.500	72.000	89.000	62.500
D	45.000	69.000	69.000	87.000	64.500	35.400	122.000	132.000	96.500	106.000	82.600

Med dvodnevним zbiranjem mleka se je povprečno število laktokokov in enterokokov povečalo z 52.400 KE/ml na 82.600 KE/ml, kar pomeni povečanje za faktor 1,6, kar je majhno povečanje. Za lažjo predstavbo so podatki prikazani v grafu Slike 7, kjer je razvidno, da je bilo začetno število laktokokov in enterokokov precej različno in da se je njihovo število po posameznih ciklih zbiranja mleka precej različno spreminjalo.



Slika 7: Graf spreminjanja števila laktokokov in enterokokov v vzorcih A, B, C in D posameznega cikla dvodnevne zbiranja mleka

#### 4.2.7 Ugotavljanje prisotnosti posameznih bakterijskih vrst oz. rodov s PCR

Po glavnem poskusu smo z izbranih gojišč vzorcev D (psihrotrofi 10. cikel, MRS 10. cikel, SŠMO 9. cikel, SŠMO 10. cikel, psihrotrofi 8. cikel in M17 10. cikel) sprali izrasle kolonije in na celokupni DNA tako pridobljenih konzorcijev kolonij s PCR ugotavljali prisotnost nekaterih vrst oz. rodov. Rezultati so prikazani v Preglednici 18.

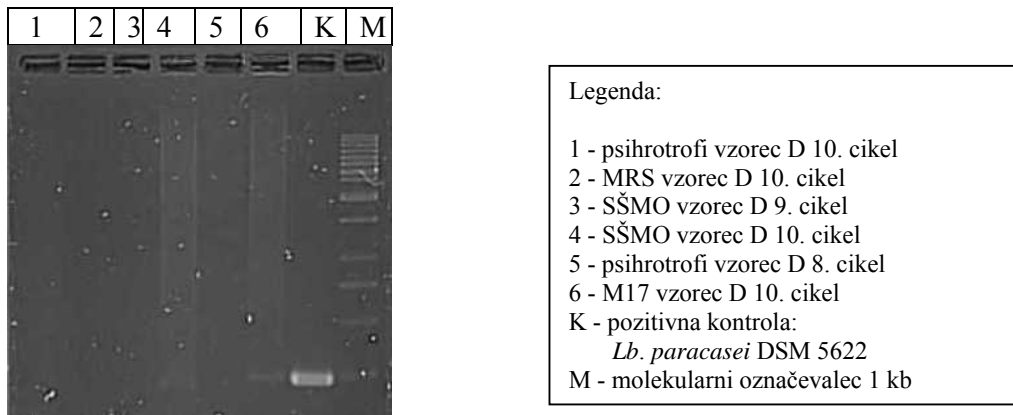
Preglednica 18: Prisotnost posameznih vrst oz. rodov v konzorcijih kolonij.

Vzorec: Rod oz. vrsta:	Psihrotrofi vzorec D 10. cikel	MRS vzorec D 10. cikel	SŠMO vzorec D 9. cikel	SŠMO vzorec D 10. cikel	Psihrotrofi vzorec D 8. cikel	M17 vzorec D 10. cikel
<i>Lactobacillus spp.</i>	Ni prisoten	Ni prisoten	Ni prisoten	Prisoten	Ni prisoten	Prisoten
<i>Lactococcus lactis</i>	Prisoten	Prisoten	Prisoten	Prisoten	Prisoten	Prisoten
<i>Enterococcus spp.</i>	Ni prisoten	Prisoten	Prisoten	Prisoten	Prisoten	Prisoten
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Ni prisoten	Ni prisoten	Ni prisoten	Ni prisoten	Ni prisoten	Ni prisoten
<i>Pseudomonas spp.</i>	Ni prisoten	Prisoten	Ni prisoten	Prisoten	Prisoten	Ni prisoten



#### 4.2.7.1 Bakterije rodu *Lactobacillus*

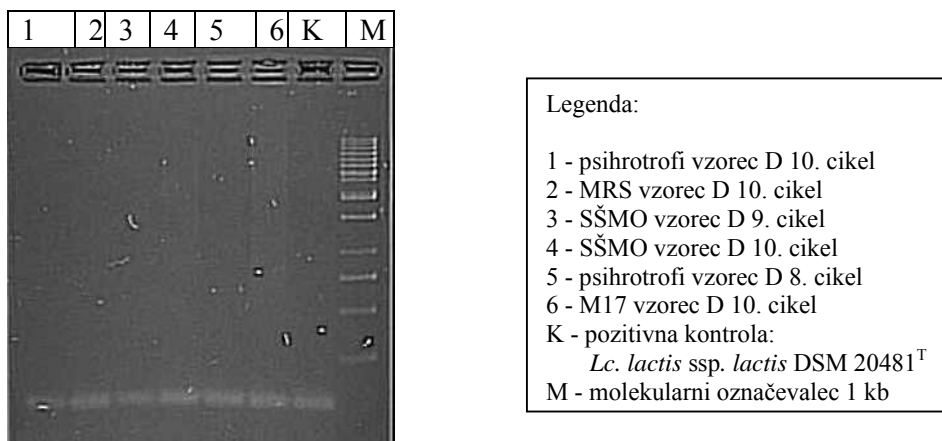
S PCR smo ugotavljali prisotnost predstavnikov rodu *Lactobacillus*. Za analizo smo uporabili začetna oligonukleotida LbLMA-rev in R16-1, ki dajeta pomnožke dolžine 250 bp. Iz slike elektroforeznega gela (Slika 8) je razvidno, da smo predstavnike rodu *Lactobacillus* potrdili le v dveh konzorcijih kolonij, in sicer SŠMO vzorec D 10. cikel in M17 vzorec D 10. cikel. Obe gojišči, s katerih smo pridobili omenjena konzorcija kolonij, sta bili močno preraščeni z bakterijami.



Slika 8: Rezultati PCR z začetnima oligonukleotidoma LbLMA-rev in R16-1 za rod *Lactobacillus*.

#### 4.2.7.2 Bakterije vrste *Lactococcus lactis*

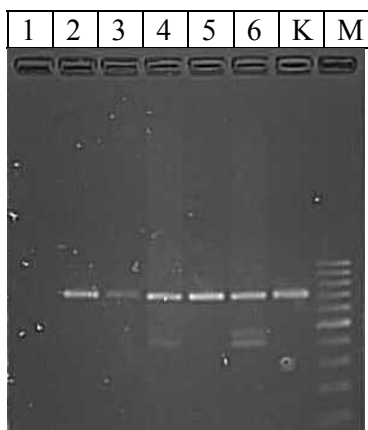
S PCR smo ugotavljali prisotnost predstavnikov vrste *Lactococcus lactis*. Analizo smo izvedli z uporabo začetnih oligonukleotidov 27f in L1a, ki dajeta pomnožke dolžine 87 bp. Iz slike elektroforeznega gela (Slika 9) je razvidno, da smo prisotnost predstavnikov omenjene vrste potrdili v vseh analiziranih konzorcijih kolonij.



Slika 9: Rezultati PCR z začetnima oligonukleotidoma 27f in L1a za vrsto *Lactococcus lactis*.

#### 4.2.7.3 Bakterije rodu *Enterococcus*

S PCR smo ugotavljali prisotnost predstavnikov rodu *Enterococcus*. Za analizo smo uporabili začetna oligonukleotida E1 in E2, ki dajeta pomnožke dolžine 733 bp. Iz slike elektroforeznega gela (Slika 10) je razvidno, da predstavnikov rodu nismo dokazali le v enem od analiziranih konzorcijev kolonij, in sicer psihrotrofi vzorec D 10. cikel.



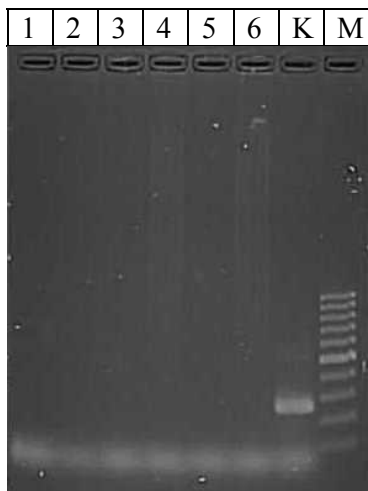
Legenda:

- 1 - psihrotrofi vzorec D 10. cikel
- 2 - MRS vzorec D 10. cikel
- 3 - SŠMO vzorec D 9. cikel
- 4 - SŠMO vzorec D 10. cikel
- 5 - psihrotrofi vzorec D 8. cikel
- 6 - M17 vzorec D 10. cikel
- K - pozitivna kontrola:  
*E. faecalis* F4 IM 270
- M - molekularni označevalec 100 bp

Slika 10: Rezultati PCR z začetnima oligonukleotidoma E1 in E2 za rod *Enterococcus*.

#### 4.2.7.4 Bakterije vrste *Streptococcus thermophilus*

Z analizo PCR smo ugotavljali prisotnost predstavnikov vrste *Streptococcus thermophilus*. Za analizo smo uporabili začetna oligonukleotida ThI in ThII, ki dajeta pomnožke dolžine 259 bp. Iz slike elektroforeznega gela (Slika 11) je razvidno, da pripadnikov iskane vrste nismo potrdili pri nobenem od preiskovanih konzorcijev kolonij, saj smo dobili pomnožek zelene dolžine le pri pozitivni kontroli. Pri vzorcih so vidne lise, ki pa so posledica tvorbe oligonukleotidnih dimerov.



Legenda:

- 1 - psihrotrofi vzorec D 10. cikel
- 2 - MRS vzorec D 10. cikel
- 3 - SŠMO vzorec D 9. cikel
- 4 - SŠMO vzorec D 10. cikel
- 5 - psihrotrofi vzorec D 8. cikel
- 6 - M17 vzorec D 10. cikel
- K - pozitivna kontrola:  
*Str. thermophilus* CCM 7711
- M - molekularni označevalec 100 bp

Slika 11: Rezultati PCR z začetnima oligonukleotidoma ThI in ThII za vrsto *Str. thermophilus*.

#### 4.2.7.5 Bakterije rodu *Pseudomonas*

S PCR smo ugotavljali prisotnost predstavnikov rodu *Pseudomonas*. Za analizo smo uporabili začetna oligonukleotida SM2F in SM3R, ki dajeta pomnožke dolžine 850 bp. Iz slike elektroforeznega gela (Slika 12) je razvidno, da smo prisotnost predstavnikov iskanega rodu dokazali v treh konzorcijih kolonij, in sicer MRS vzorec D 10. cikel, SŠMO vzorec D 10. cikel in psihrotrofi vzorec D 8. cikel.



Legenda:

- 1 - psihrotrofi vzorec D 10. cikel
- 2 - MRS vzorec D 10. cikel
- 3 - SŠMO vzorec D 9. cikel
- 4 - SŠMO vzorec D 10. cikel
- 5 - psihrotrofi vzorec D 8. cikel
- 6 - M17 vzorec D 10. cikel
- K - pozitivna kontrola:  
*P. fluorescens* LMG 1794Ts

Slika 12: Rezultati PCR z začetnima oligonukleotidoma SM2F in SM3R za rod *Pseudomonas*.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Stanje na terenu

Zbiralnica, v kateri smo opravili poskus, je manjša vaška zbiralnica, kakršnih je v severozahodnem delu Slovenije še veliko. Količine oddanega mleka v teh zbiralnicah so majhne, do 100 litrov mleka na molžo. Zbrano mleko se hladi v približno 30 let starem hladilnem bazenu, ki komaj še zadovoljivo hladi mleko, saj je potreboval tudi do dve uri, da je mleko ohladil na 4 °C. Eden glavnih razlogov za počasno ohlajevanje je, da kmetje v zbiralnico prinašajo nehlajeno mleko, ki ima ob oddaji v zbiralnico temperaturo nad 30 °C (povprečno 32,3 °C). To je zelo slabo, saj bi morale biti mleko takoj po molži hlajeno, tako pa je, kljub temu, da ga kmetje takoj po končani molži odnesejo v zbiralnico, kar nekaj časa izpostavljeno temperaturam, ki omogočajo hiter razvoj mikroflore. Ta hiter razvoj sicer zavira proti mikrobnim sistemom mleka. Ko pa nehlajeno mleko zlijemo v hladilni bazen, kjer je že zbrano mleko prejšnjih molž, se temperatura v bazenu dvigne preko 10 °C, kar pospeši razvoj psihotrofnih mikroorganizmov v hladilnem bazenu.

#### 5.1.2 Skupno število mikroorganizmov

Skupno število mikroorganizmov smo določali pri 30 °C na gojišču PCA z mlekom v prahu tako, da smo lahko hkrati prešteli tudi proteolite. Skupno število mikroorganizmov smo najprej določali le v vzorcih A pri vseh 10-ih ciklih dvodnevnega zbiranja mleka, medtem ko smo SŠMO pri zadnjih treh ciklih določali še pri vzorcih B, C in D.

Skupno število mikroorganizmov v vzorcih A je bilo zelo različno, vendar vedno višje od 100.000 KE/ml, povprečno 270.000 KE/ml, kar kaže na visoko okužbo mleka z mikroorganizmi. V raziskavi izvedeni leta 2006 sta Godič in Golc (2008) v 203 vzorcih svežega mleka določili povprečno 34.000 KE/ml, kar kaže da smo imeli opravka z nadpovprečno visokim SŠMO. Vendar pa samo podatek o SŠMO ni najboljši pokazatelj kakovosti mleka, saj je pomembna sestava mikroflore. V primeru, da mikrofloro mleka sestavljajo predvsem mlečnokislinske bakterije, to pri izdelavi fermentiranih mlečnih izdelkov kakor tudi sirov ni problematično, če pa velik del tako velike populacije SŠMO predstavljajo psihotrofi, pa je lahko to zelo problematično.

Pri zadnjih treh ciklih, ko smo SŠMO določali v vzorcih A, B, C in D smo ugotovili, da se SŠMO med dvodnevno zbiranjem ne dvigne drastično, saj je SŠMO naraslo le za faktor 1,4. Vendar pa je lahko že tak dvig problematičen, če glavnino tega dviga predstavljajo glavni kvarljivci hlajenega mleka, psihotrofi. Naše rezultate je težko primerjati z raziskavami drugih raziskovalcev, ker nismo zasledili raziskave, ki bi imela opravka z mešanjem že ohlajenega mleka z ne ohlajenim, tako kot naša. Vendar je dvig SŠMO v naši raziskavi nekako primerljiv z raziskavo, ki sta jo opravili Cempirkova in Mikulova (2009).

Pri devetem ciklu, ko smo imeli podatke analize vzorcev, ki jih je za namen oblikovanja cene odvezal odkupovalec lahko primerjamo tudi vzorec A s skupnim vzorcem. Primerjava nam pokaže, da je SŠMO v času, ki ga je bazen porabil, da je mleko v bazenu ohladil na 4 °C zelo naraslo. V skupnem vzorcu je bilo SŠMO 50.000 KE/ml, naš A vzorec pa je vseboval 164.000 KE/ml, kar pomeni da se je število potrojilo. Hkrati je to očiten znak, da so se mikroorganizmi v razpoložljivem času, ko je bila temperatura povišana, že prilagodili na razmere v mleku.

Število proteolitov v vzorcih A je bilo povprečno 27.700 KE/ml in je predstavljalo približno 10 % skupne mikroflore, je pa bilo njihovo štetje oteženo zaradi različno velikih con proteolize in njihovega prekrivanja.

### 5.1.3 Psihrotrofi

Število psihrotrofov smo določali pri 7 °C na gojišču PCA z dodanim mlekom v prahu tako, da smo hkrati lahko prešteli še proteolite. Psihrotrofe smo določali v vzorcih A, B, C in D vseh 10-ih ciklov dvodnevnega zbiranja mleka, določevanje proteolitov pa je bilo zaradi težav z gojiščem neuspešno pri prvih štirih ciklih zbiranja mleka.

Število psihrotrofov v vzorcih A je bilo precej različno, gibalo se je od 8.300 pa do 37.000 KE/ml (povprečno 18.800). Pri vseh vzorcih A, razen enem, so psihrotrofi predstavljali manj kot 10 % SŠMO v mleku, kar kaže na zadovoljivo higieno molže.

Med dvodnevno zbiranjem mleka se je število psihrotrofov povprečno dvignilo z 18.800 na 45.300 KE/ml, kar je dvig za faktor 2,4 in predstavlja precejšen dvig. Zanimiv podatek pa je da je bilo še pri vzorcih C povprečno število psihrotrofov 22.700 KE/ml, iz česar vidimo, da se število psihrotrofov v prvem dnevu le malo poveča, nato pa se v drugem dnevu podvoji. Naše rezultate je težko primerjati z raziskavami drugih raziskovalcev, ker ni zaslediti raziskave ki bi imela opravka z mešanjem že ohlajenega mleka z ne ohlajenim kot naša. Če pa primerjamo podatke z raziskavo, ki sta jo opravili Cempirkova in Mikulova (2009), pa se naši podatki bolje ujemajo z rezultati, ki sta jih dobili pri vzorcu pri 6,5 °C kot pri vzorcih pri 4 °C. Iz tega lahko sklepamo, da je dvig temperature pri dolivanju toplega mleka pospešil razvoj psihrotrofnih bakterij.

Število proteolitskih psihrotrofov se je med dvodnevno zbiranjem mleka povprečno povečalo s 1.180 na 4.920 KE/ml, kar predstavlja dvig za faktor 4,2 in je še precej višji dvig kot smo ga zasledili pri skupnih psihrotrofi. Zanimiv je podatek, da je še pri vzorcih C povprečje 1.520 KE/ml, iz česar je razvidno, da se je njihovo število v prvem dnevu zelo malo spremenilo, v drugem dnevu pa se je njihovo število več kot potrojilo.

Iz rezultatov je razvidno, da se število proteolitskih psihrotrofov s hladnim skladiščenjem povečuje precej hitreje kot skupno število psihrotrofov, proteoliti pa so v mleku najbolj nezaželena skupina mikroorganizmov, saj razgrajujejo beljakovine mleka in s tem poslabšujejo njegovo kvaliteto.

S poskusom smo ugotovili, da začno psihrotrofi v drugem dnevu dvodnevnega zbiranja intenzivneje rasti in proizvajati encime. To pa pomeni, da imamo v primeru dvodnevnega zbiranja mleka v mleku mnogo več psihrotrofov in njihovih encimov v primerjavi z dnevnim zbiranjem. Celotna situacija se lahko še precej poslabša v primeru, da mleko po prihodu v mlekarno ni takoj toplotno obdelano.

Proteinaze in lipaze psihrotrofov so termostabilne in jih ne uniči nobeden od postopkov toplotne obdelave mleka. Encimi psihrotrofov tako delujejo naprej v mlečnih izdelkih tudi, če smo psihrotrofe s toplotno obdelavo uničili, in nam razgrajujejo beljakovine in maščobe, kar privede do kvara mlečnih izdelkov.

#### **5.1.4 Laktobacili, laktokoki in enterokoki**

Število laktobacilov, laktokokov in enterokokov smo ugotavljali pri 37 °C na gojiščih MRS oz. M17, njihovo število smo določali v vseh vzorcih.

Število laktobacilov se nam je povprečno dvignilo s 7.130 na 10.030 KE/ml, kar predstavlja dvig za faktor 1.4, kar je majhen dvig, še nekoliko manjši kot pri SŠMO. Večji del dviga števila se je zgodil v drugem dnevu zbiranja.

Število laktokokov in enterokokov se nam je povprečno dvignilo z 52.400 na 82.600 KE/ml, kar predstavlja dvig za faktor 1.6, kar ni velik dvig, glavnina tega dviga se je zgodila v drugem dnevu zbiranja. Dvig števila je bil nekoliko večji kot pri SŠMO

Porast števila laktobacilov in laktokokov je bil relativno majhen, se je pa večina tega dviga zgodila drugi dan zbiranja mleka. Opazen dvig števila teh dveh rodov v mleku ni problematičen, saj rodova spadata med mlečnokislinske bakterije, mnogi njuni predstavniki pa se uporabljajo kot starterske kulture v mlekarnstvu.

#### **5.1.5 Ugotavljanje prisotnosti posameznih bakterijskih vrst oz. rodov s PCR**

Rod *Lactobacillus* smo uspešno dokazali v dveh konzorcijih kolonij in sicer: SŠMO vzorec D 10. cikel in M17 vzorec D 10. cikel ki pa sta bila pridobljena iz močno preraščenih gojišč.

Vrsto *Lactococcus lactis* smo uspešno dokazali v vseh konzorcijih kolonij, kar kaže na to da je bila vrsta prisotna v mleku v zadostnem številu, in da je sposobna rasti na različnih gojiščih in tudi pri nizkih temperaturah.

Rod *Enterococcus* smo uspešno dokazali v vseh konzorcijih kolonij razen enega in sicer: Psihrotrofi vzorec D 10. cikel. To je razumljivo saj je rod v naravi razširjen in običajno prisoten v mleku ob enem pa sposoben rasti pri nižjih temperaturah.

Vrste *Streptococcus thermophilus* nismo uspeli dokazati v nobenem konzorciju kolonij, kar je razumljivo saj je vrsta termofilna in kot taka manj razširjena v naših podnebnih razmerah.

Rod *Pseudomonas* smo uspešno dokazali v treh konzorcijih kolonij in sicer: MRS vzorec D 10. cikel, SŠMO vzorec D 10. cikel in Psihrotrofi vzorec D 8. cikel. Nekoliko presenetljivo je da smo pri vzorcu D 10. cikla dokazali rod *Pseudomonas* v konzorcijih kolonij pridobljenih iz gojišča za SŠMO in gojišča MRS ne pa iz gojišča za psihrotrofe kjer bi ga pričakovali.

## 5.2 SKLEPI

- Mleko mora biti takoj po molži hlajeno, da izkoristimo prilagoditveno fazo mikroorganizmov in baktericidno fazo mleka, ki nekoliko pomagata pri ohranjanju mikrobiološke kakovosti mleka.
- Pri dvodnevno zbiranju mleka se občutno poveča število psihrotrofov, predvsem proteolitskih, v primerjavi z dnevnim zbiranjem mleka.
- Mleko je potrebno po prevozu v mlekarno čim hitreje toplotno obdelati, da uničimo psihrotrofe, ki so aktivni tudi pri nizkih temperaturah in izločajo lipaze in proteinaze, ki pa jih s toplotno obdelavo mleka ne uničimo.

## 6 POVZETEK

Mleko je energijsko in prehransko zelo bogato živilo in je kot tako tudi zelo dober medij za rast mikroorganizmov. V mleku uspevajo tako tehnološko zaželeni kot nezaželeni mikroorganizmi. Za ohranjanje prehranske in biološke vrednosti mleka se uporablja hitro hlajenje takoj po molži, ki zavira rast mikroorganizmov. V zadnjih letih se zaradi ekonomskih razlogov vse bolj uveljavlja dvodnevno zbiranje mleka. Vendar pa se pri nadaljnji predelavi tako zbranega mleka včasih pojavijo težave, zato smo želeli z našo diplomsko nalogo proučiti, kako se spreminja mikrobiološka kakovost mleka med dvodnevnim zbiranjem mleka.

Raziskavo smo izvedli v poletnem času na manjši vaški zbiralnici mleka, kjer smo v 10 ciklih spremljali nihanje temperature v hladilnem bazenu in odvzeli po štiri vzorce: po ohladitvi mleka prve molže, pred dolivanjem mleka tretje molže, po ohladitvi mleka prvih treh molž in tretji dan zjutraj pred odvozom mleka v mlekarno.

V zbranih vzorcih smo določali različne skupine mikroorganizmov. Na gojišču PCA z dodatkom mleka v prahu smo določali: skupno število mikroorganizmov in število proteolitov pri 30 °C, število psihrotrofov in proteolitskih psihrotrofov pri 7 °C. Na gojišču MRS smo določali število laktobacilov pri 37 °C. Na gojišču M17 pa skupaj laktokoke in enterokoke pri 37 °C.

Kmetje so oddajali manjše količine (povprečno 32 l) ne ohlajenega mleka (povprečno 32,3 °C). Hladilni bazen je za hlajenje oddane količine mleka (povprečno 180 l na molžo) na želeno temperaturo 4 °C porabil do dve uri.

Ugotovljeno skupno število mikroorganizmov je bilo že po ohladitvi mleka prve molže visoko (270.000 KE/ml). Proteoliti so predstavljali 10 - 15 % skupnega števila mikroorganizmov. Med zbiranjem se je skupno število mikroorganizmov povečalo za faktor 1,5 večji del tega dviga pa se je zgodil drugi dan.

Ugotovljeno število psihrotrofov po ohladitvi prve molže se je gibalo med 8.300 in 41.000 KE/ml (povprečno 18.800 KE/ml) in je predstavljalo približno 7% celotne mikroflore. Med dvodnevnim zbiranjem mleka se je njihovo število povečalo za faktor 2,4 večina tega dviga se je zgodila drugi dan.

Povprečno ugotovljeno število psihrotrofnih proteolitov po ohladitvi prve molže je bilo 1.180 KE/ml. Med dvodnevnim zbiranjem mleka se je njihovo število povečalo za faktor 4,2, na povprečno 4.920 KE/ml. Povečal se je tudi njihov delež med psihrotrofi s 6,2 % na 10,8 %.

Med dvodnevnim zbiranjem mleka se je povprečno število laktobacilov povečalo s 7.130 KE/ml na 10.030 KE/ml, kar pomeni povečanje za faktor 1,4. Med dvodnevnim zbiranjem mleka se je povprečno število laktokokov in enterokokov povečalo z 52.400 KE/ml na 82.600 ke/ml, kar pomeni povečanje za faktor 1,6. Večji del dviga se je pri obeh skupinam zgodil drugi dan.



Med dvodnevnim zbiranjem mleka se je število mikroorganizmov v mleku povečalo, predvsem se je spremenilo razmerje med posameznimi skupinami mikroorganizmov. Najbolj se je povečalo število psihrotrofov, predvsem proteolitskih, ki pa so najbolj nezaželeni, saj izločajo proteolitične encime, ki jih pri predelavi mleka toplotnimi postopki, ki so v uporabi, ne moremo uničiti. Najbolj se je število mikroorganizmov povečalo drugi dan zbiranja, kar pomeni, da je mikrobiološka kakovost pri dvodnevnem zbiranju mleka občutno slabša v primerjavi z dnevnim zbiranjem.

## 7 VIRI

Adamič J., Smole-Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45

Barakat R.K., Griffiths M.W., Harris L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus*, spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 1-2: 83-94

Barbano D. M., Ma Y., Santos M. V. 2006. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of Dairy Science*, 89: E15-E19

Cempírková R. 2007. Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. *Czech Journal of Animal Science*, 52: 387-393

Cempírková R., Mikulová M. 2009. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech Journal of Animal Science*, 54: 65-73

Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 147-156

Courtney D. P. 1999. *Lactococcus Lactis* Subspecies *Lactis* and *Cremoris*. V: *Encyclopedia of food microbiology*. Vol. 2. Robinson K. R. (ed.). Oxford, Elsevier: 1166-1171

Deasy B. M., Rea M. C., Fitzgerald G. F., Cogan T. M., Beresford T. P. 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 23: 510-522

Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H., Stiles M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47: 1-24

Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 163-171

Godič Torkar K., Golc Teger S. 2008. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agriculturae Slovenica*, 92, 1. 61-74

Hantsis-Zacharov E., Halpern M. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7162-7168

Hood, Scott K. Zottola, Edmund A. 1997. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 60, 9: 1034-1037

IDF standard, 100B.1991 Milk and milk products: Enumeration of microorganisms - Colony count technique at 30 °C. Brussels International Dairy Federation: 3 str.

Jaspe A., Fernandez L., Palacios P., Sanjose C. 1995. Interaction between *Pseudomonas fluorescens* and lactic starter Hansen No. 44 in milk at 7 °C. *Milchwissenschaft*, 50: 607-610

Langsrud S., Singh Sidhu M., Heir E., Holck A. L. 2003. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 283-290

Marchand s., Vandriesche G., Coorevits A., Coudijzer K., De Jonghe V., Dewettinck K., De Vos P., Devreese B., Heyndrickx M., De Block J. 2009. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 1-2: 68-77

Pearce L., Flint S. 2002. *Streptococcus thermophilus*. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Vol. 4. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. (eds.) London, Academic Press: 2577-2582

Pravilnik o veterinarsko-sanitarnem nadzoru živilskih obratov, veterinarsko-sanitarnih pregledih ter o pogojih zdravstvene ustreznosti živil in surovin živalskega izvora. 1999. Uradni list Republike Slovenije, 9, 100: 14926-14977

Robinson R. K. 2002. *Dairy microbiology handbook*. 3rd ed. New York, Wiley Interscience: 765 str.

Rogelj I. 2003. Mleko. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole M. S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 515-539

Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541-578

Stepaniak L. 1991. Factors affecting quality and possibilities of predicting shelf-life of pasteurized and ultra-high temperature heated milks. *Italian Journal of Food Science*, 3: 11-26

Sørhaug T., Stepaniak L. 1991. Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. *Food Enzymology*, 1: 169-218

Sorhaug T., Stepaniak L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8: 35-41

Timisjärvi A.T., Alatossava T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S–23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 1: 49–56

Uredba o določitvi elementov odkupne cene kravjega mleka. 1999. *Uradni list Republike Slovenije*, 9, 69: 9078-9079

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Bogdanu Perku in somentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za vso pomoč in nasvete pri načrtovanju izvedbi in končnem oblikovanju te diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Barbari Jeršek za strokovno recenzijo diplomskega dela.

Zahvaljujem se staršem da so mi omogočili študij in vsem prijateljem ki so mi polepšali študijska leta.

Iskrena hvala vsem!

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Igor HLADNIK

**VPLIV PODALJŠANEGA SKLADIŠČENJA NA  
MIKROBIOLOŠKO KAKOVOST SUROVEGA  
MLEKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010