

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Alenka KOMAT

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI LISTERIJ V SUROVEM MLEKU IN
SIRIH IZDELANIH IZ SUROVEGA MLEKA**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**DETECTION OF LISTERIA IN RAW MILK AND RAW MILK
CHEESES**

GRADUATION THESIS
Higher Professional Studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstva – zootehniko. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo, v laboratoriju za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič.

Recenzentka: prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Andreja ČANŽEK MAJHENIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Alenka Komat

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Vs
DK UDK 637.1:579(043.2)=163.6
KG surovo mleko/mlečni izdelki/siri/mikrobiologija/listerije/*Listeria monocytogenes*/kontrola/Slovenija
KK AGRIS Q02/9412
AV KOMAT, Alenka
SA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2009
IN UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI LISTERIJ V SUROVEM MLEKU IN SIRIH IZDELANIH IZ SUROVEGA MLEKA
TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP IX, 29 str., 2 pregl., 11 sl., 36 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Listerije kakor tudi *Listeria monocytogenes* so pogosto prisotne v človekovi prehranjevalni verigi, predvsem v živilih, narejenih iz toplotno neobdelanih surovin. Povzročajo bolezen listeriozo, ki pri zdravih ljudeh poteka kot blago obolenje, pri določenem odstotku bolnikov pa lahko povzroči trajne posledice ali celo smrt. Ker so listerije in tudi *L. monocytogenes* lahko prisotne tudi v mleku in mlečnih izdelkih, smo preverjali njihovo prisotnost v vzorcih slovenskih tradicionalnih sirov, narejenih iz surovega mleka. Zato smo v nalogi vzorčili mleko, sirnino in sir v konzumni zrelosti. V analizo so bili vključeni naslednji slovenski siri: tolminc, mohant, kraški ovčji sir in bovški ovčji sir. Prisotnost listerij smo v preiskovanih vzorcih ugotavljali po protokolu, predpisanim s standardom ISO 11290 – 1. Za kontrolo smo imeli referenčni tipski sev *L. monocytogenes* ATCC 19111. Z uporabljenimi metodami pri nobenem od preiskovanih vzorcev nismo potrdili prisotnosti listerij ali celo *L. monocytogenes*. Naši rezultati so vzpodbudni, saj so listerije v naravi zelo razširjene. Lahko zaključimo, da se na farmah izvaja dobra proizvodna praksa, ki je v skladu z mikrobiološkimi priporočili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 637.1:579(043.2)=163.6
CX raw milk/milk products/cheeses/microbiology/listeria/*Listeria monocytogenes*/control/Slovenia
CC AGRIS Q02/9412
AU KOMAT, Alenka
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2009
TI DETECTION OF LISTERIA IN RAW MILK AND RAW MILK CHEESES
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO IX, 29 p., 2 tab., 11 fig., 36 ref.
LA sl
AL en/sl
AB *Listeria* as well as *Listeria monocytogenes* are often present in human food chain. They cause a disease called listeriosis, which in healthy people presents only a mild disease but in certain percentage of people may have serious consequences including death. Because listeria and also *L. monocytogenes* can be found in milk and dairy products, samples of Slovenian traditional cheese made from raw milk were tested for their presence. Milk, curd and raw milk cheeses were sampled. The following cheeses were analyzed: Tolminc, Mohant, Karst ewe's cheese and Bovec ewe's cheese. The presence of listeria was accomplished by the protocol ISO 11290 – 1 standard. For positive control *L. monocytogenes* ATCC 19111 type reference strain was used. With the mentioned method, no listeria was found in the tested samples. Our results are encouraging, since listeria is very ubiquitous in the environment. We can conclude, that producers operate under the total respect of the Good Manufacturing Practices and follow the principles of the Hazard Analysis Critical Control Point plans, in order to avoid contamination throughout the whole processing.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ROD LISTERIA	2
2.2 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI LISTERIJ	2
2.3 RAZŠIRJENOST LISTERIJ	2
2.4 PATOGENOST LISTERIJ	3
2.4.1 Listerioza pri ljudeh	4
2.4.2 Listerioza pri živalih	5
2.5 DROBNICA V SLOVENIJI	6
2.5.1 Bovška ovca	6
2.5.2 Istrska pramenka	6
2.6 GOVEDOREJA V SLOVENIJI	7
2.6.1 Sivo-rjava pasma krav	7
2.6.2 Bohinjska cika	7
2.7 LISTERIJA TER MLEKO IN MLEČNI IZDELKI	8
2.7.1 Priporočila o preverjanju prisotnosti listerij v živilih	8
2.8 SLOVENSKI TRADICIONALNI SIRI	8
2.8.1 Nastanek sira	8
2.8.2 Sirarstvo v Sloveniji	9
2.9 DELOVNA HIPOTEZA	12
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 VZORCI	13
3.2 MATERIAL IN OPREMA	14
3.2.1 Mikrobiološka gojišča	14
3.2.2 Reagenti	15
3.2.3 Laboratorijska oprema	15

3.3	METODE DELA	16
3.3.1	Kratek opis poteka dela	18
4	REZULTATI	20
4.1	PREDELAVA MLEKA V SIR	20
4.2	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI LISTERIJ V MLEKU, SIRNINI IN SIRIH	20
4.2.1	Primarna in sekundarna obogatitev	20
4.2.2	Izolacija na trdnem selektivnem gojišču	21
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	22
5.1	RAZPRAVA	22
5.1.1	Identifikacija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	22
5.1.2	Primeri listerioze po svetu	23
5.1.3	Primer s Portugalske	23
5.1.4	Primeri listerioz v Sloveniji	24
5.2	SKLEPI	25
6	POVZETEK	26
7	VIRI	27
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Potek vzorčenja	13
Preglednica 2: Primeri listerioz, zabeleženi v Sloveniji v letih 2001–2007 (Zdravstveni statistični letopis 2001–2007, 2009)	24

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Možen vir okužbe z listerijo (A. Komat).....	3
Slika 2: Sir tolminc (foto: A. Čanžek Majhenič).....	9
Slika 3: Bovški ovčji sir (Bovški sir, 2005).....	10
Slika 4: Mohant (A. Čanžek Majhenič).....	11
Slika 5: Kraški ovčji sir (2009).....	11
Slika 6: Geografska območja izdelave slovenskih tradicionalnih sirov (A. Komat).....	12
Slika 7: Shematski prikaz poteka poskusov.....	17
Slika 8: Aseptična priprava sira, gnetilnik BagMixerR 400.....	18
Slika 9: Mikrobiološka gojišča; HF, F, Palcam.....	19
Slika 10: Gojišče HF in F po inkubaciji.....	19
Slika 11: Gojiče Palcam po inkubaciji.....	19

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

+	vzorčenje je potekalo
ATCC	American Type Culture Collection
CCM	Czech Collection of Microorganisms
F	Fraser
GMP	Good Manufacture Practise
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point= analiza tveganja kritičnih kontrolnih točk
HF	Half Fraser
IMS	immunomagnetic separation = imunomagnetno koncentriranje in ločevanje
ISO	International Organization for Standardization = mednarodna zveza pristojnih nacionalnih standardizacijskih organov za določanje skupnih standardov
KE	kolonijske enote
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
oz.	oziroma
P	Palcam

1 UVOD

Mikrobi so med vsemi organizmi najštevilnejši. Prevladujejo neškodljivi oziroma celo koristni mikrobi, medtem ko so nevarni oziroma patogeni v manjšini. Ene kot druge najdemo povsod v biosferi, to je povsod, kjer je le možno življenje (Urbanija, 1986).

Med slednje, torej škodljive oziroma patogene bakterije, prav gotovo sodijo tudi listerije. Danes vemo, da je med listerijami človeku najnevarnejša patogena *Listeria monocytogenes*, ki parazitira znotraj celično v makrofagih in monocitih jeter in vranice (Müller-Premru, 2002; Mena in sod., 2004). Bakterijska obolenja, ki jih povzročajo listerije, imenujemo listerioze, izražajo pa se v različnih oblikah. Pred približno 70-imi leti je bila listerioza prepoznana kot zoonoza, bolezen, ki se z živali, domačih ali divjih, lahko prenese na človeka.

Pojav listerijskih infekcij kot posledica krmljenja domačih živali s silažno krmo je znan že desetletja, medtem ko je šele v 80-ih letih prejšnjega stoletja postalo jasno, da ob zaužitju okuženega živila lahko do listerijskih okužb pride tudi pri človeku. To spoznanje je povzročilo intenzivne raziskave listerij (Low in Donachie, 1997).

Listerioza, ki jo povzroča bakterija *L. monocytogenes*, je relativno redka bolezen, nevarna predvsem trem rizičnim skupinam ljudi, kamor prištevamo nosečnice (okužba plodu, abortus), novorojenčke oz. majhne otroke ter ljudi z oslabljenim imunskim sistemom (starejši ljudje, sladkorni bolniki, osebe s presajenimi organi, bolniki z levkemijo, HIV/AIDS-om). Najpogosteje se listerioza, povzročena z *L. monocytogenes*, manifestira v obliki abortusa, meningoencefalitisa in septikemije (Low in Donachie, 1997; Roginski in sod., 2003).

Listerije naseljujejo raznolike ekološke niše, saj jih je moč osamiti iz zemlje, prahu, vode, odplak ter iztrebkov različnih domačih in divjih živali. Od živil pa jih najpogosteje najdemo v surovem mleku in izdelkih iz surovega mleka, predpripravljenih in hlajenih živilih, surovem mesu, ribah ter sadju in zelenjavi (Low in Donachie, 1997; Uzunović-Kamberović, 2009).

Obstoj in razmnoževanje listerij ter *L. monocytogenes* v sirih sta odvisna od različnih faktorjev kot so koncentracija kisline, soli in temperatura skladiščenja sirov. Znanih je kar nekaj primerov listerioz, povzročenih z okuženim sirom (Pintado in sod., 2005).

Pri okužbi s kontaminiranimi živali, podobno kot pri salmoneli, bakterije vdirajo skozi črevesno sluznico. Pri gostiteljih z normalnim imunskim odzivom se okužba omeji na črevesno steno. Le redko vdrejo listerije v kri, s krvjo pa v razne organe, zlasti osrednje živčevje. Inkubacijska doba traja od 11 do 70 dni, povprečno 31 dni (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešek, 2002).

Zaradi prepoznane nevarnosti, ki jo povzročajo okužbe z listerijo, ter vse večjim zanimanjem porabnikov za čimbolj naravna, nepredelana živila, smo z metodo dvostopenjske obogatitve ugotavljali prisotnost listerij v surovem mleku in sirih, izdelanih iz surovega mleka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD LISTERIA

Znotraj rodu *Listeria* je opisanih 8 vrst, ki se med seboj razlikujejo po biokemičnih lastnostih: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi* in *L. denitrificans* (Bergey's Manual ..., 1986). Zaradi prevelikih odstopanj od tipičnih značilnosti pa je postala razvrstitev vrste *L. denitrificans* znotraj rodu *Listeria* vprašljiva, kar so potrdile nadaljnje fenotipske in genotipske raziskave. Tako je bila vrsta *L. denitrificans* izključena iz rodu *Listeria* in uvrščena v rod *Jonesia* (Rocourt in sod., 1987).

Med listerijami najdemo za človeka in/ali živali patogene tri vrste in sicer *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* in *L. seeligeri*. Primeri okužbe z bakterijami vrste *L. seeligeri* so zelo redki tako pri živalih kot pri ljudeh, enako velja za bakterije vrste *L. ivanovii*. Večino obolenj pri ljudeh povzročijo bakterije vrste *L. monocytogenes*. Na splošno velja, da so bakterije vrste *L. ivanovii* manj patogene kot bakterije *L. monocytogenes* (Müller-Premru, 2002; Low in Donachie, 1997; Jeršek, 2005).

2.2 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI LISTERIJ

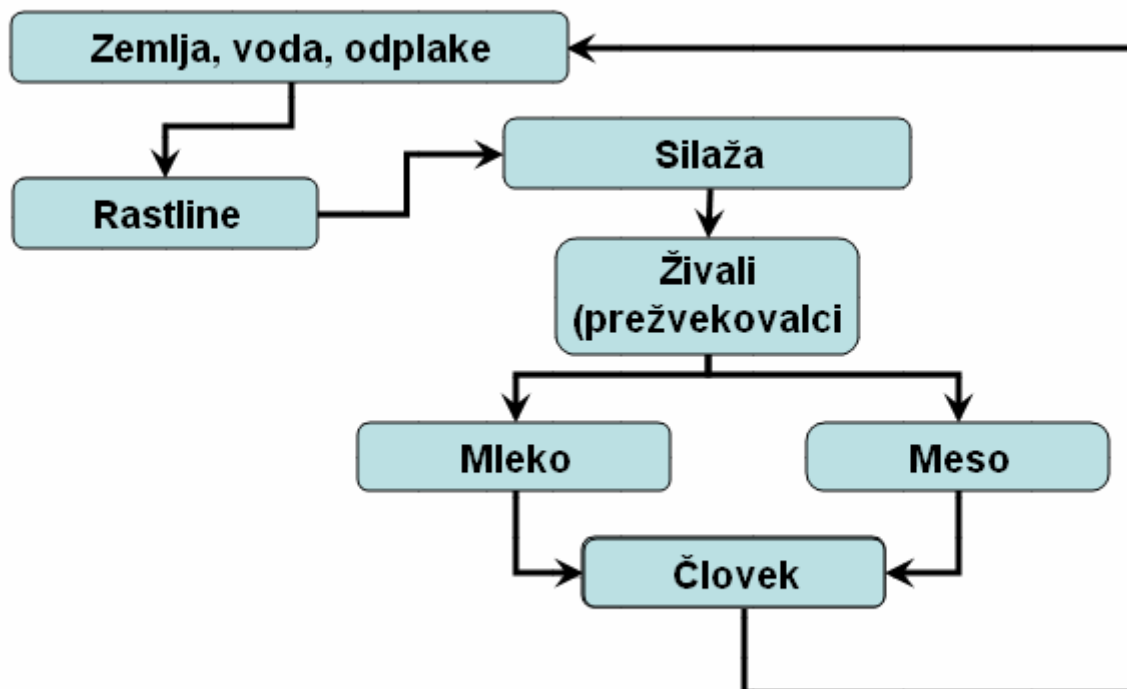
Listerije so kratki, po Gramu pozitivni bacili, dolgi 0,5–2 μm in široki 0,4–0,5 μm (Bergey's Manual ..., 1986). Iz kulture jih v mikroskopskem preparatu najdemo posamezno, v obliki črke V ali v kratkih verižicah. So nesporogene in brez kapsule (Müller-Premru, 2002).

Listerije rastejo v širokem temperaturnem območju, 1–45 °C, optimalna temperatura pa je 30–37 °C. Ne preživijo 30-minutne toplotne obdelave pri 60 °C. Razmnožujejo se v aerobnih in mikroaerofilnih razmerah pri vrednostih pH 6–9. Rast bakterij je ustavljena ali močno zavirana v anaerobnih razmerah in pri vrednostih pH, nižjih od 5,6 (Bergey's Manual ..., 1986).

Bakterijo, ki jo danes poznamo kot *L. monocytogenes*, so prvič osamili leta 1926 iz krvi obolelih kuncev (Low in Donachie, 1997).

2.3 RAZŠIRJENOST LISTERIJ

Listerije so v naravi zelo razširjene, saj jih najdemo v zemlji, vodi, odplakah, na rastlinah ter v živalskem in človeškem blatu. Nepasterizirano mleko in mlečni izdelki, nekatere vrste mesa, zelenjava, sadje ter hitro pripravljena hrana so lahko okuženi z listerijo (Müller-Premru, 2002; Listerioza, 2007).



Slika1: Možen vir okužbe z listerijo (A. Komat)

Ker so listerijske vrste v naravi močno razširjene, jih lahko najdemo tudi v silaži. Zato predstavlja pri domačih živalih glavni vir listerijskih infekcij prav uživanje nepravilno fermentirane silažne krme, medtem ko je ob pravilni in kvalitetni fermentaciji silaže razmnoževanje listerij onemogočeno. Predvsem aeroben kvar ter nepravilen potek fermentacije silaže, ko vrednost pH ne pade pod 4,5, ustvarita ugodne pogoje za razvoj listerij (Low in Donachie, 1997).

Poleg v prahu, tleh, vodi, na rastlinah, predvsem gnijočih, silaži in odpadkih, pa najdemo listerije in *L. monocytogenes* tudi v tkivih živali in ljudi. Ocenjuje se, da je 5–10 % ljudi klicenoscev, čeprav klinično ne kažejo bolezenskih znakov. Bakterija se lahko prenese na človeka z obolele živali, v večini primerov pa posredno preko kontaminiranega živila, tako živalskega kot rastlinskega izvora. Največkrat so to mleko in mlečni izdelki (posebno sveži sir). Kljub razširjenosti listerij, je bolezen redka. Pojavlja se občasno, znani pa so tudi primeri izbruhov epidemij zaradi uživanja kontaminiranih živil (Uzunović-Kamberović, 2009).

2.4 PATOGENOST LISTERIJ

Bakterijsko obolenje, ki ga povzročajo listerije, imenujemo listerioza. Listerioza je zoonoza, kar pomeni, da je možen prenos bolezni z živali na človeka, neposredno s kontaktom ali aerogeno. Pogosteje kot preko živali, se človek okuži z uživanjem kontaminiranih živil (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešček, 2002; Listerioza, 2007).

2.4.1 Listerioza pri ljudeh

Pri ljudeh je listerioza povzročena z *L. monocytogenes* redko obolenje, ki pa najbolj ogroža tri rizične skupine: nosečnice, novorojenčke ter ljudi z zmanjšano imunsko sposobnostjo (starejši ljudje, bolniki oboleli za rakom, ljudje s presajenimi organi, ljudje okuženi v virusom HIV, ljudje s cirozo jeter). Ob listerijski okužbi ljudje z zmanjšano imunsko sposobnostjo najpogosteje zbolijo za meningitisom, encefalitisom ali septikemijo (prisotnost patogenih mikroorganizmov in njihovih toksinov v krvi), medtem ko pri nosečnicah lahko listerioze izzovejo abortus, mrtvorojenost ali prezgodnji porod otroka s hudimi okužbami dihalnega, krvnega ali živčnega sistema, kar lahko vodi v smrt ali pusti trajne posledice (Roginski in sod., 2003; Listerioza, 2007).

Človek se z *L. monocytogenes* okuži na več načinov:

- z uživanjem kontaminiranih živil
- z neposrednim stikom z okuženo živaljo
- aerogeno
- plod se okuži preko posteljice

Pri tem se pojavijo značilni klinični sindromi:

- okužba v nosečnosti
- okužbe novorojenčka
- sepsa
- meningoencefalitis
- žariščne okužbe
- enterokolitis

Bolezen se pojavlja v dveh kliničnih oblikah; prva se pojavlja pri nosečnicah in njihovih novorojencih, druga pa pri odraslih, zlasti imunsko oslabljenih (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešček, 2002; Müller-Premru, 2002).

2.4.1.1 Listerioza pri nosečnicah in pri novorojencih

Okužba pri nosečnicah je pogosto asimptomatična ali pa imajo blage simptome do poroda. Najpogosteje se okužba pojavlja v tretjem trimesečju nosečnosti. Bolezen lahko izzove prezgodnji porod, splav, lahko se rodi okužen ali mrtev novorojenček. Listeriozo lahko zamenjamo z okužbo sečil ali gripo. Pri novorojenčkih sta opisani dve klinični obliki neonatalne listerioze, zgodnja ter pozna. Zgodnja neonatalna listerioza je septična okužba, ki se kaže kot pljučnica, hepatosplenomegalija, petehije, jetrni in možganski absces, peritonitis in enterokolitis. Pozna neonatalna listerioza se kaže kot meningitis in je na 3. mestu med meningitisi pri novorojencih (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešček, 2002; Müller-Premru, 2002).

2.4.1.2 Listerioza pri odraslih

Listerioza pri odraslih poteka kot razširjena ali omejena bolezen. Razširjena oblika poteka kot meningitis, sepsa ali endokarditis, omejena oblika bolezn pa kot abscesi in lokalne gnojne rane (Müller-Premru, 2002).

2.4.2 Listerioza pri živalih

Z veterinarskega vidika pomeni listerioza velik problem, saj obolevajo ovce, govedo in koze. Znaki okužbe z listerijo so različni, najpogosteje pa se kažejo kot encefalitis in okužbe maternice. Listerijski encefalitis povzroča razjede možganskega debla, žival otopi, obrača glavo v eno smer in hodi v krogih, lahko pa vodi tudi v smrt. Najpogostejši rezultat okužbe maternice pa je abortus oz. mrtvorojenost. Večino okužb povzroča *L. monocytogenes*, manj pa *L. ivanovii* (Müller-Premru, 2002; Low in Donachie, 1997).

2.4.2.1 Encefalitis pri živalih

Prvi zapisi o listerijskem encefalitisu so se pojavili v 30-tih letih prejšnjega stoletja na Novi Zelandiji, kjer so bolezen opisali kot živčno obolenje pri ovcah, znano tudi kot »bolezen kroženja«. Klinični znaki infekcije so posledica poškodb na možganskem deblu. Simptomi so: ne odzivanje na okolico, obračanje glave v eno smer in hoja v krogih, enostranska paraliza obraznega živca, povešene veke in ušesa, slinjenje živali zaradi delne paralize žrela. Pri kozah in ovcah nastopi smrt v 2–3 dneh, pri govedu pa je potek bolezn navadno daljši. Odvisno od stadija infekcije, je rektalna temperatura lahko normalna ali povišana. Čeprav je inkubacijska doba lahko različno dolga, pa rezultati eksperimentalnih študij in poskusov na terenu namigujejo, da ta doba traja 2–6 tednov. Pri encefalitisu *L. monocytogenes* lahko izoliramo samo iz možganov (Low in Donachie, 1997; Schlech, 2000).

2.4.2.2 Splav pri živalih

L. monocytogenes lahko pri prežvekovalcih in drugih domačih živalih povzroči splav. *L. ivanovii* pa povzroči, predvsem pri ovcah in govedu, splav redkeje kot *L. monocytogenes*. V Veliki Britaniji je listerija povzročitelj splava predvsem pri ovcah. Čeprav so primeri redki, je v izjemnih primerih lahko okuženo tudi približno 50 % črede. Zarodek je ponavadi avtolitičen, s številnimi nekrotičnimi področji vidnimi v jetrih in vranici. Histološko ta področja kažejo nekrozo in filtracijo različne stopnje z makrofagi in nevtrofilci. Povzročitelja lahko izoliramo iz zarodka ali placente z rutinskimi bakteriološkimi preiskavami. Okužba živali preko ust ne povzroči splava v vseh primerih, vendar je plod bolj dovzeten za infekcijo. Če pa ovco okužimo z intravensko injekcijo *L. monocytogenes* oziroma *L. ivanovii*, povzročimo splav (Low in Donachie, 1997).

2.4.2.3 Septikemija pri živalih

Septikemija je relativno redka. Ponavadi se pojavi pri novorojenih živalih kot posledica infekcije znotraj maternice. Najbolj prizadene jetra, vranico, redkeje ostala tkiva. Inkubacijska doba traja 2–3 dni. Listerijsko septikemijo ugotovimo z izolacijo tkiva okuženih živali. Po ugotovljeni diagnozi je uspešna terapija z antibiotiki, vendar pri brejih živalih lahko pride do splava (Low in Donachie, 1997).

2.5 DROBNICA V SLOVENIJI

Ovca je volnat prežvekovalac, ki se je verjetno razvila iz divjega muflona, ki je živel v osrednji in jugozahodni Aziji. Gospodarsko je vrsta pomembna zaradi predelave volne, mesa, mleka, kožuha in lanolina, zato so šli razvoj, odbira in selekcija v tej smeri uporabnosti. Ocenjuje se, da je sedaj na svetu okoli milijarda tristo milijonov ovc, največ naj bi jih bilo na Kitajskem in v Avstraliji. Žal pa je sredi 20. stoletja razvoj industrije izdelave umetnih snovi zmanjšal potrebo po naravni volni. Sicer kratki trend ekskluzivne uporabe predvsem umetnih vlaken je imel za posledico zaostanek pri selekciji, razvoju tehnologij in opreme pri reji drobnice. Kljub temu pa je danes tudi na področju prehrane, vzreje, zdravstvenega varstva in na drugih področjih, ki se ukvarjajo z ovcami, prišlo do novih spoznanj, ki so v pomoč pri vzreji. Vse te nove ugotovitve pa se poizkuša v čim večji meri uporabiti tudi v Sloveniji, kjer pomen ovčjereje v zadnjih letih narašča. Poseben pomen ima ovčjereja tudi pri negovanju prostora, ki postaja vedno bolj zaraščen (Kompan in sod., 1996; Zagožen, 1984).

2.5.1 Bovška ovca

Bovška ovca je dobila ime po kraju Bovec. Sam izvor ovce naj bi bil povezan s tako imenovano belo ovco, ki je bila razširjena tudi drugod v Alpah. Tudi bovška ovca je po večini bele barve, kakšnih 30 % pa je lahko tudi črnih ali rjavih. V dolini Trente je bovška ovca razširjena predvsem v ozkih dolinicah Koritnice in Lepene. Za to vrsto ovc je značilno, da imajo majhno glavo in majhna ušesa, majhen trup, noge pa so kratke in tanke. Sama konstitucija je prilagojena za hojo po strmih gorskih pašnikih in poteh. Bovško ovco uvrščajo med pramenke. Glavni del prireje pri tej pasmi je mleko, saj je mlečnost bovške ovce večja od povprečja pasme. Od junija do septembra poteka v planinah molža in sirjenje na tradicionalen način. Iz mleka bovške ovce izdelujejo poltrdi sir in skuto, včasih tudi kislo mleko (Kompan in sod., 1996).

2.5.2 Istrska pramenka

Ime je dobila po krajevnom imenu Istra. Izvirala naj bi iz evropskega muflona. Je prilagojena pogojem v katerih živi, kjer je potrebno zaradi paše opraviti daljše hoje, paša pa se izvaja po suhem kraškem terenu. Barva ovc je v večini bela s temnimi pikami po glavi in trupu, lahko pa so tudi temnejše. Ima močno glavo, z ošiljenim sprednjim delom, da lahko išče pašo med kamni. Goji se jo predvsem zaradi pridelave mleka, lahko pa tudi za prirejo jagnet. Ta pasma je danes zastopana predvsem na Krasu, Istri in Beli krajini (Kompan in sod., 1996).

2.6 GOVEDOREJA V SLOVENIJI

Prednik goveda je tur. Človek ga je udomačil pred približno 5000 leti. Za človeka je bilo pomembno predvsem njegovo meso, koža ter mleko. Med udomačevanjem so nastali različni tipi, ki so se razlikovali tako po velikosti, barvi kože ter obliki telesa. Na najdiščih iz časov rimskega cesarstva so na primer našli skupaj tako majhna kot velika goveda. Verjetno so bila manjša udomačena, delovna goveda, večja pa divja in namenjena za razplod. Še danes pa gojimo govedo za različne namene. Predvsem je pomembno pridobivanje mleka, mesa, kože, kakor tudi gojenje z namenom reje plemenskih govedi. Pri vzreji pa je za delovanje kmetije kot stranski produkt pomemben gnoj, s katerim se na naraven način vračajo zemlji vse snovi, ki jih s pridelavo ali košnjo odvezamo. To je še posebno pomembno pri uvajanju bio prehrane, kjer je večja uporaba umetnih gnojil precej omejena. Zaradi zmanjšane možnosti uporabe strojev je na hribovitih kmetijah reja govedi in seveda tudi drobnice pomembna, saj se le z rednim izvajanjem paše lahko ohrani travnate površine. Reja govedi je razširjena po celem svetu. Število govedi, ki jih goji posamezen kmet pa je odvisno od osnovnega namena vzreje. Na območjih, kjer goveda uporabljajo za delo, vleko in prenos tovora, je njihovo število po navadi majhno. V gospodarsko razvitih deželah pa redijo posamezne kmetije od 20 do 60 govedi (Ferčej in sod., 1989).

2.6.1 Sivo-rjava pasma krav

Sivorjava pasma ima v Sloveniji večstoletno tradicijo. Je kombinirana in izvira iz Švice. Pričetki reje te pasme pri nas so bili na območju južno od Ljubljane (Notranjska, Kočevska, Dolenjska, Brežice). V 70. letih 20. stoletja je bila oplemenitena z ameriško rjavo, kar je pri tej pasmi povečalo mlečnost. Danes je pasma v Sloveniji razširjena na Primorskem, Notranjskem, Dolenjskem in Gornje Savinjski dolini (Nastanek rjave pasme, 2009).

2.6.2 Bohinjska cika

Cikasto govedo oziroma cika je nastala iz avtohtonega enobarvnega svetlo rdečkastega bohinjskega goveda, ki je bilo prvotno majhno in nizke mlečnosti. Ker pa je bilo v tistem času v sosednjih avstrijskih deželah veliko bolj znano po konstrukciji večje in bolj produktivno pincgavsko govedo, se je začelo oplemenjevanje. Na območje reje bohinjskega goveda so začeli uvažati bike pincgavske pasme (Mölltalervieh-belanske pasme). To oplemenjeno govedo so poimenovali cikasto govedo (cika). Glede na geografsko področje reje cikastega goveda sta se oblikovala dva tipa: bohinjsko oziroma gorenjsko cikasto govedo in tolminsko cikasto govedo. Za to pasmo je značilna rdeča barva z belo liso. Lisa se začne na vihru in gre preko celotne hrbtna linije do repa, se nadaljuje na repu ter preko stegen in trebuha do prsnega koša. Meja, ki ločuje rdečo barvo in belo, je nazobčana. Pri tem govedu je glava rdeča in brez lis, prav tako tudi smrček (Ferčej in sod., 1989; Žan in Čepon, 2005; Žan in Čepon, 2004a, b, c).

2.7 LISTERIJA TER MLEKO IN MLEČNI IZDELKI

Mleko je proizvod mlečne žleze in je prva, popolna in lahko prebavljiva hrana novorojenega sesalca. Zaradi bogate sestave pa je tudi izvrsten rastni medij za različne mikroorganizme. Narava pridobivanja mleka je takšna, da okužbe mleka z mikroorganizmi ne moremo preprečiti, kar pomeni, da število mikroorganizmov v mleku vpliva na njegovo kakovost (Bem in sod., 2003; Bajt in Golc-Teger, 2002).

Mleko se lahko zelo hitro okuži s patogenimi mikroorganizmi, ki povzročajo številne bolezni. Okuži se lahko, če so molzne živali bolne in tudi preko ljudi ali opreme, ki niso dovolj čisti. Bolezni govedu, ki se prenašajo z mlekom, so poleg listerioze tudi tuberkuloza, bruceloza, parkljevka in slinavka. Mleko takoj po molži ni sterilno, ampak ima svojo naravno mikrofloro, ki je sestavljena iz različnih mikroorganizmov, v glavnem občutljivih za toplotno obdelavo – pasterizacijo (Kapun-Dolinar, 2001).

2.7.1 Priporočila o preverjanju prisotnosti listerij v živilih

Zaradi tveganja, ki ga lahko povzroči prisotnost listerije v živilih, imajo države po svetu pripravljena priporočila ali kriterije za dopustnost nivoja oz. prisotnosti listerije v pripravljenih živilih. Tako na primer ZDA in Italija zahtevata popolno odsotnost listerijskih celic v 25 g živila, medtem ko precej držav ugotavlja, da je tako priporočilo nerealno in dopuščajo določene tolerance o prisotnosti listerije v živilih. Toleranca do 100 ke listerij v g živila v času uživanja je bila sprejeta v Nemčiji, Franciji, Angliji ter na Nizozemskem (Mena in sod., 2004). V Sloveniji velja uredba o odsotnosti listerije v 25 g, dokler nosilec živilske dejavnosti živila, ki ga je proizvedel, še ni dal v promet (Uredba komisije (ES) št. 1441/2007). Analitska referenčna metoda za preverjanje tega priporočila je ISO 11290-1, ki smo jo uporabili tudi v našem poskusu, saj smo analizo izvajali prav tako na živilih, ki še niso bila dana v promet. Medtem ko naj bi za živila, ki so že dana v promet, do konca roka uporabe veljala dopustna mejna vrednost do 100 ke/g. Za preverjanje tega kriterija pa se uporablja referenčna analitska metoda ISO 11290-2 (Uredba komisije (ES) št. 1441/2007).

2.8 SLOVENSKI TRADICIONALNI SIRI

2.8.1 Nastanek sira

Kdaj je bil izdelan prvi sir, ni natančno znano, gotovo pa je, da je sir nastal po naključju. O nastanku sira obstajajo različne zgodbe. Pisna izročila pripovedujejo, da je bil sir kot živilo poznan že več tisoč let pred našim štetjem. O siru najdemo zapise v bibliji, v Homerjevi Odiseji, v Aristotelovih spisih. Priljubljeno živilo pa je bil tudi v rimskem imperiju. V srednjem veku so imeli pomembno vlogo za sirarstvo samostani, saj so bili menihi in nune v tistih časih redki ljudje, ki so znali pisati. V 19. in 20. stoletju so mikrobiološka in kemijska odkritja pripomogla k razjasnitvi procesov sirjenja (Šabec, 1964; Orešnik in sod., 2008; Slanovec, 1982).

2.8.2 Sirarstvo v Sloveniji

Na območju Slovenije je bilo sirarstvo v preteklosti zelo pomembno, saj so siri predstavljali ne le živilo ampak tudi plačilno sredstvo. Sire so izdelovali predvsem na območju Tolmina, Bovca, Bohinja in Krasa. Raznovrstnost sirov je glede na teritorij Slovenije primerljivo z avtohtonimi siri v Franciji in Italiji. Seveda pa je število avtohtonih sirov precej manjše kot v navedenih državah, ki veljata za sirarski velesili. Kljub temu, da je bilo izdelovanje sirov po vojni zanemarjeno, pa se je na nekaterih območjih kot so Tolmin, Bovec in Bohinj vendarle ohranilo do danes. Čeprav je odpiranje trgov k nam prineslo sire, ki so sicer značilni za druge države pa je razveseljivo, da narašča želja slovenskih porabnikov po uživanju avtohtonih slovenskih sirov. Z urejeno kmetijsko politiko bi se lahko v nekaj letih sloves domačih sirov »prijel« tudi pri slovenskih porabnikih. Slovenski avtohtoni siri spadajo med trde in poltrde sire (Orešnik in sod., 2008).

2.8.2.1 Tolminc

Geografsko območje izdelave sira tolminc je Zgornje posočje, ki ga na zahodu omejuje državna meja z Italijo, drugod pa mejna naselja, ki se raztezajo od naselja Kamno do naselja Log pod Mangartom. Nastanek sira tolminc, kakršnega poznamo danes, je povezan z razvojem skozi stoletja, k čemur so prispevali bližina Italije ter kulturni vplivi tega območja. Sir se izdeluje predvsem iz kravjega mleka, manjši delež tudi iz ovčjega in kozjega mleka. Specifična tehnologija izdelave, klimatski in geološki pogoji področja kakor tudi prehrana krav molznic in avtohtona mikroflora, pomembno vplivajo na oblikovanje značilnih lastnosti sira tolminc. Sir se izdeluje iz surovega mleka (Perko, 2003).



Slika 2: Sir tolminc (foto: A. Čanžek Majhenič)

2.8.2.2 Bovški ovčji sir

Nastanek bovškega sira je tesno povezan z načrtnim krčenjem gozdov na Bovškem. Posledično so nastali pašniki in senožeti, prišlo pa je tudi do razmaha reje ovc in koz. Skozi stoletja je bila reja koz in ovc na Bovškem zelo pomembna in razširjena, saj je sir kmetom poleg hrane predstavljal tudi plačilno sredstvo za poravnavanje davščin in drugih dajatev ter

zakupnine za ribolov na Soči. Bovški sir je praviloma izdelan iz ovčjega mleka ali iz mešanice ovčjega in kozjega mleka, kjer delež kozjega mleka ne sme preseči 30 %. Za pridelavo ovčjega mleka je pomembna tako imenovana bovška ovca, ki se je izoblikovala v Zgornje soški dolini in je izrazito mlečnega tipa, fine glave in kratkih uhljev. Ime je dobila po kraju Bovec. Bovška ovca je avtohtona pasma in zato pomemben izviren genetski material za ohranitev pasme z rejo na specializiranih kmetijah (Perko, 2003).



Slika 3: Bovški ovčji sir (Bovški sir, 2005)

2.8.2.3 Mohant

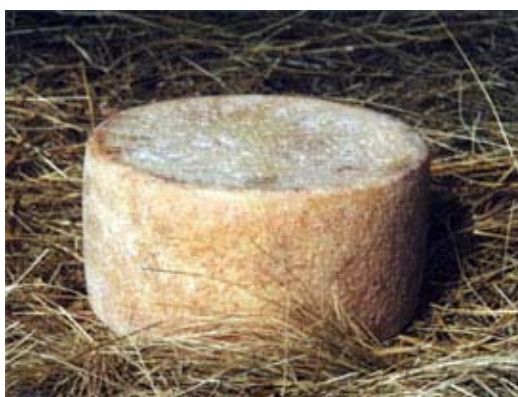
Izdelovanja sira mohant je značilno za širše območje Bohinja. Pričetek izdelovanja sega v 18. stoletje, ko so, po zgledu Bovčanov in Tolmincev, tudi Bohinjci prešli s proizvodnje kuhanega masla na izdelovanje sira in prodajo mleka. Koncem 18. stoletja so na območju Bohinja ustanovili več sirarn, znanje za izdelavo sirov pa so pridobili tudi iz tujine. Poleg skute so izdelovali več vrst sira, do danes pa se je ohranil predvsem mohant. Sir ima močan vonj in okus. Izdeluje se iz polnomastnega ali posnetega mleka, predvsem avtohtone pasme krave imenovane »bohinjska cika«. Mohant iz polnomastnega mleka dobi ostrejši okus, mohant iz posnetega pa običajno dalj časa zori. Mleko se posnema klasično, zato je tudi kemijska sestava končnega proizvoda izredno variabilna (Perko, 2003).



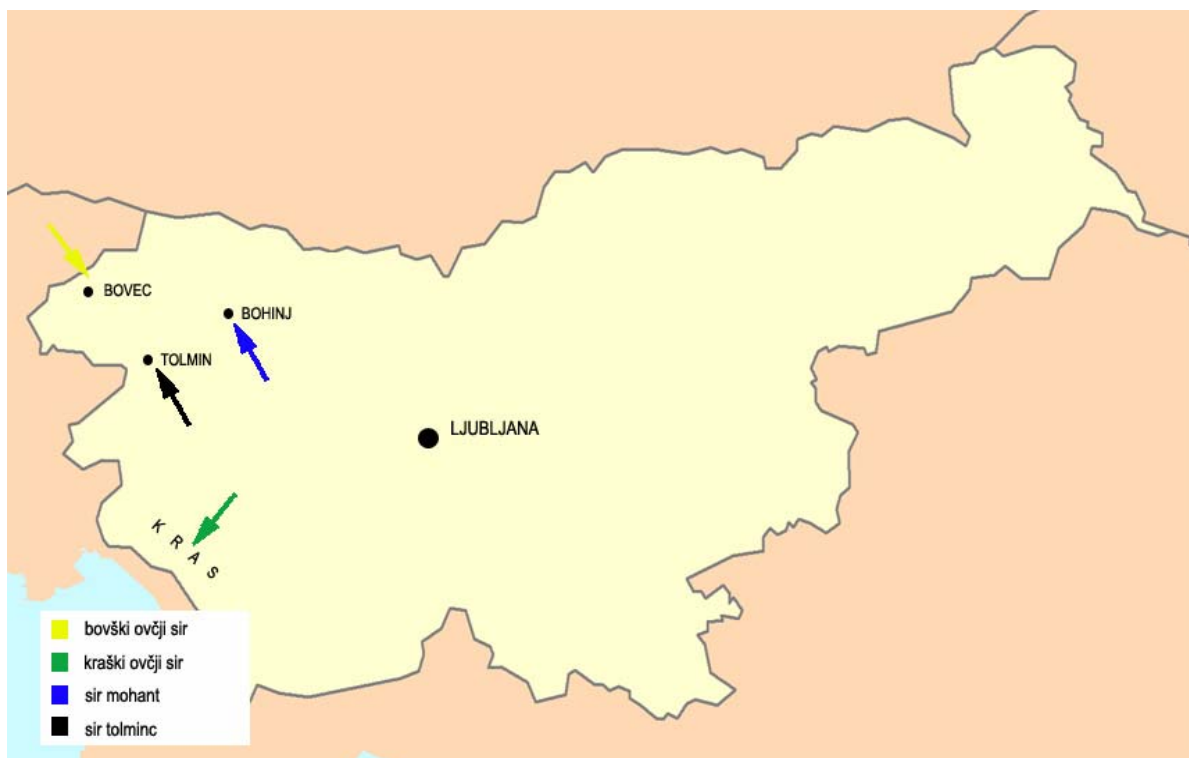
Slika 4: Mohant (A. Čanžek Majhenič)

2.8.2.4 Kraški ovčji sir

Začetki izdelovanja sira so povezani z specifičnimi pogoji življenja in bivanja ljudi na območju Krasa. Kraška ovca in predelava ovčjega mleka v trdi tip ovčjega sira sta bila glavna vira hrane, pomembna za preživetje prebivalstva. Ker je tradicija izdelovanja sira slonela na ustnem izročilu, je težko določiti čas pričetka izdelovanja tega sira. Izdeluje se iz mleka avtohtone kraške pasme ovc istrska pramenka, poznane tudi kot istrijanka, kraška ovca, primorska ovca ali ovca surove volne. Za območje izdelovanja kraškega ovčjega sira je značilno prepletanje mediteranskega in celinskega podnebja. Zorenje sira z značilnim okusom, aromo in teksturo je celosten proces mikrobioloških in fizikalnih sprememb sirnine. Te lastnosti sira so rezultat delovanja naravno prisotne mikroflore surovega mleka ter bakterijske kulture, ki jo dodajajo tako surovemu mleku, še posebej pa mleku kadar ga toplotno obdelajo (Perko, 2003).



Slika 5: Kraški ovčji sir (2009)



Slika 6: Geografska območja izdelave slovenskih tradicionalnih sirov (A. Komat)

2.9 DELOVNA HIPOTEZA

Ker so listerije razširjene v naravi in uspešno rastejo v širokem temperaturnem območju (1–45 °C), hkrati pa so toplotno precej odporne, je verjetnost njihove prisotnosti v vzorcih surovega mleka in izdelkih iz surovega mleka precejšnja. Vendar pa zaradi izvajanja dobre proizvodne prakse (GMP = Good Manufacture Practise) na farmah ter v skladu z mikrobiološkimi priporočili pričakujemo, da ne bomo ugotovili velikega števila okuženih vzorcev.

V nalogi smo ugotavljali stopnjo okuženosti surovega mleka in izdelkov iz surovega mleka na obratih, ki se ukvarjajo s prirajo mleka in izdelavo tradicionalnih fermentiranih izdelkov.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

V analizo so bili vključeni slovenski siri tolminc, mohant, kraški ovčji in bovški ovčji sir. Vzorčili smo mleko, sirnino in sir v konzumni zrelosti. Konzumno zrelost so siri dosegli po dveh mesecih, razen mohant, ki doseže konzumno zrelost že po enem mesecu. Vzorčenje je potekalo enkrat mesečno v času pašne sezone, od junija do oktobra 2005, kot je prikazano v Preglednici 1.

Preglednica 1: Potek vzorčenja

Sir vrsta vzorca	Junij	Julij	Avgust	September	Oktober
Tolminc					
Mleko	+	+	+		
Sirnina	+	+	+		
Sir		+ (maj)	+ (junij)	+ (julij)	+ (avgust)
Bovški ovčji					
Mleko	+	+	+		
Sirnina	+	+	+		
Sir		+ (maj)	+ (junij)	+ (julij)	+ (avgust)
Mohant					
Mleko	+	+	+		
Sirnina	+	+	+		
Sir		+ (junij)	+ (julij)	+ (avgust)	+ (septem)
Kraški ovčji					
Mleko	+	+	+		
Sirnina	+	+	+		
Sir		+ (maj)	+ (junij)	+ (julij)	+ (avgust)

3.2 MATERIAL IN OPREMA

3.2.1 Mikrobiološka gojišča

3.2.1.1 Tekoča gojišča in raztopine za razredčevanje

- Listeria Fraser broth base half concentration (HF), (Biolife, 401594, Italija): tekoče gojišče HF smo pripravili po navodilih proizvajalca. Pred uporabo smo v 500 ml pripravljenega gojišča dodali 5 ml selektivnega dodatka železo-amonijevega citrata. Tako pripravljeno mešanico smo uporabili kot predobogatitveno tekoče gojišče.
- Listeria Fraser broth base (F) (Biolife, 401596, Italija): tekoče gojišče F smo pripravili po navodilih proizvajalca. Pred uporabo smo v 500 ml pripravljenega gojišča dodali 5 ml selektivnega dodatka železo-amonijevega citrata. Tako pripravljeno mešanico smo v aseptičnih pogojih razdelili po 10 ml v sterilne epruvete in jo uporabili kot obogatitveno tekoče gojišče.
- $\frac{1}{4}$ Ringerjeva raztopina (Merck, 1.15525.0001, Nemčija): fiziološko raztopino smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Pripravljeno raztopino smo razdelili po 9,2 ml v epruvete in avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Uporabili smo jo za 10-kratno razredčevanje mikrobioloških vzorcev pri mikrobioloških analizah.

3.2.1.2 Trdna gojišča

- Listeria Palcam Agar Base (P) (Biolife, 401604, Italija): trdno gojišče P smo pripravili po navodilih proizvajalca. Pred uporabo smo raztopili 500 ml trdnega gojišča, ga ohladili na okoli 50 °C ter dodali 5 ml protimikrobnega dodatka

3.2.1.3 Selektivni in protimikrobni dodatki

- Selektivni dodatek za HF in F železo-amonijev citrat: Ferric Ammonium Citrate supplement (Biolife, 4240056, Italija)
- Selektivni protimikrobni dodatek za trdno gojišče Listeria Palcam Agar Base (Biolife, 401604, Italija): Listeria Palcam Antimicrobial supplement (Biolife, 4240042, Italija), kjer ena enota dodatka, za 500 ml gojišča, vsebuje:
 - Polimixin
 - Ceftazidimine
 - Acriflavine HCl

3.2.2 Reagenti

- Barvila za barvanje po Gramu
- Fiziološka raztopina
- Alkohol
- Destilirana voda

3.2.3 Laboratorijska oprema

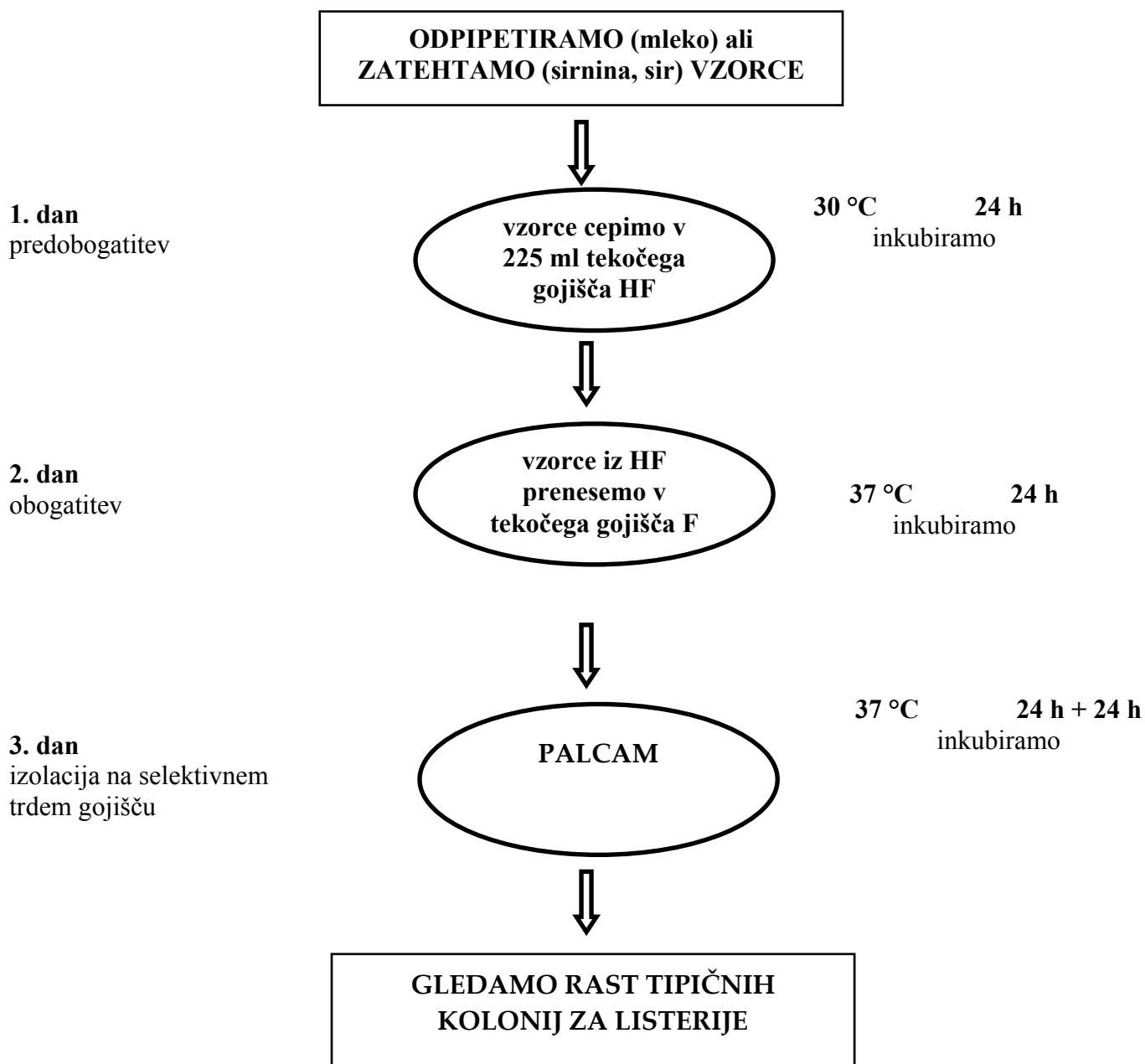
Pri laboratorijskem delu smo uporabljali naslednje aparature in opremo:

- avtoklav: A-21 CA (Kambič)
- avtomatske pipete: FinnpiPETTE
- centrifuga: mikro 22R (Hettichzentrifugen)
- tehtnica (Mettler P1200; EB – 300M, Železniki–Tehtnica)
- gnetilnik BagMixerR 400 (Interscience, St Nom, France)
- hladilnik: Gorenje
- svetlobni mikroskop (Reichert 64773)
- zaščitna mikrobiološka komora (laminar Iskra PIO M12)
- inkubator Krokter Marijan s.p. BT 150, Sutjeska
- cepilna zanka
- petrijevke Žikplast
- epruvete steklene
- gorilnik
- stojalo za epruvete
- rokavice
- kopel Kambič WB- 30
- mikrovalovna pečica Bosch
- sterilne vrečke za gnetilnik
- objektna stekelca Brand
- števec bakterioloških kolonij Eškol.
- nož
- žlice
- merilni valj

3.3 METODE DELA

- Aseptična priprava vzorcev surovega mleka, sirine in sirov, narejenih iz surovega mleka
- Osamitev listerij po predpisanih postopkih: standard ISO 11290 - 1
 - Nacepitev vzorcev mleka, sirine in sirov v predobogatitveno gojišče HF (Half Fraser), inkubacija
 - Precepitev v obogatitveno gojišče F (Fraser), inkubacija
 - Potrditveni test z nacepivjo na trdno gojišče PALCAM (ISO 11290-1), inkubacija
- Ugotavljanje števila kolonij, značilnih za listerije oz. *L. monocytogenes*
- Ugotavljanje morfoloških značilnosti kolonij (barvanje po gramu)

Potek eksperimentalnega dela je prikazan na Sliki 7.



Slika 7: Shematski prikaz poteka poskusov

3.3.1 Kratek opis poteka dela

Prvi dan:

Aseptična priprava vzorcev mleka, sirnine in sirov

mleko: aseptično smo odpipetirali 25 ml mleka in ga prenesli v 225 ml tekočega gojišča HF. Tako pripravljeno mešanico smo inkubirali v transfuzijskih steklenicah pri 30 °C/24 h.

siirnine: s sterilno vzorčevalno žlico smo v gnetilne vrečke zatehtali 25 g sirnine in dodali 225 ml tekočega gojišča HF. Vsebino smo homogenizirali z gnetenjem v gnetilniku in nato homogenat v gnetilnih vrečkah inkubirali pri 30 °C/24 h.

sir: v gnetilne vrečke smo aseptično zatehtali 25 g naribanega sira in dodali 225 ml tekočega gojišča HF. Vsebino smo homogenizirali z gnetenjem v gnetilniku in nato homogenat v gnetilnih vrečkah inkubirali pri 30 °C/24 h.



Slika 8: Aseptična priprava sira, gnetilnik BagMixerR 400.

Drugi dan:

po 100 µl vzorcev smo s pipeto prenesli iz tekočega gojišča HF v epruvete z 10 ml tekočega gojišča F in nadaljevali z inkubacijo pri 37°C/24 h .

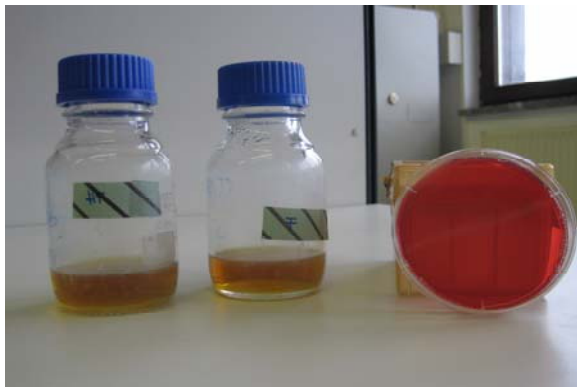
Tretji dan:

iz tekočega gojišča F smo pripravili zaporedne, 10-kratne razredčitve (10^{-1} , 10^{-2}) in nanesti po 100 µl nerazredčenega oziroma razredčenih vzorcev (10^{-1} , 10^{-2}) na predhodno pripravljene plošče s trdnim gojiščem Palcam. Razmaze vzorcev na ploščah smo inkubirali pri 37 °C/24 h +/24 h.

Četrti in peti dan:

Gledali smo rast za listerijo tipičnih kolonij.

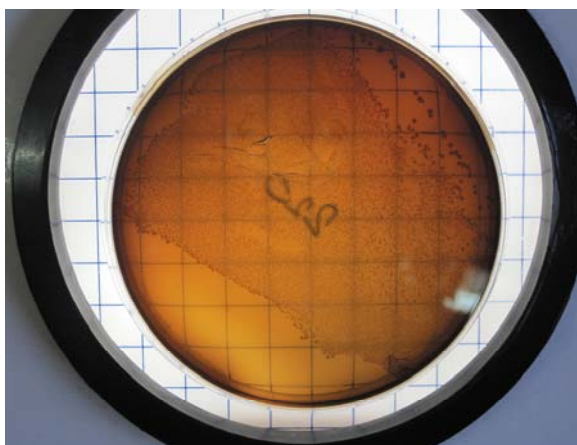
Ves čas pa smo za pozitivno kontrolo uporabljali referenčni tipski sev *Listeria monocytogenes* CCM 5576=ATCC 19111.
(CCM=Czech Collection of microorganisms; ATCC=American Type Culture Collection).



Slika 9: Mikrobiološka gojišča; HF, F, Palcam



Slika 10: Gojišče HF in F po inkubaciji



Slika 11: Gojiče Palcam po inkubaciji

4 REZULTATI

4.1 PREDELAVA MLEKA V SIR

Predelava svežega mleka v sir je eden izmed najstarejših načinov, kako podaljšati obstojnost mleka kot hitro pokvarljivega živila.

Bovški ovčji in kraški ovčji sir sta podobna, vendar ju izdelujejo na geografsko različnih koncih, kakor tudi iz mleka dveh različnih pasem ovc. Na bovškem je avtohtona bovška ovca, na Krasu pa istrska pramenka. Raznoliko rastlinje na pašniku vpliva na okus mleka in s tem posledično na okus sira.

Tolminc je izdelan iz kravjega mleka. Na planinah in kmetijah je narejen iz surovega mleka, v industrijskem obratu pa iz termiziranega. Prav tako je iz kravjega mleka izdelan mohant in sicer iz mleka avtohtone pasme bohinske cike. Je značilnega okusa in vonja, ker zori v plastičnih posodah (Orešnik in sod., 2008).

Pri predelavi mleka v sir potekajo ob samem tehnološkem procesu tudi mikrobiološki procesi, v teh procesih pa se lahko razvijejo tudi različni nezaželeni mikroorganizmi, katerih prisotnost smo ugotavljali v diplomski nalogi.

4.2 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI LISTERIJ V MLEKU, SIRNINI IN SIRIH

Za ugotavljanje prisotnosti listerij v surovem mleku in izdelkih iz surovega mleka smo se odločili, ker je tveganje za prisotnost teh patogenih bakterij v izdelkih iz surovega mleka veliko, potrošniki pa zaradi težnje po uživanju čimmanj predelanih oziroma čimbolj naravnih živil, vedno pogosteje posegajo po takšnih izdelkih.

Zato je bil glavni namen naše raziskave preveriti prisotnost listerij v vzorcih slovenskih tradicionalnih sirov tolminc, mohant, kraški ovčji in bovški ovčji. Zaradi njenih znanih zdravju škodljivih učinkov, pa smo v istih vzorcih preverjali tudi morebitno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*. Poleg sirov smo vzorčili tudi surovo mleko in sirnino, samo vzorčenje pa smo izvajali enkrat mesečno v času pašne sezone, od junija do oktobra 2005 (Preglednica 1).

Za izolacijo in identifikacijo smo uporabili predobogatitveno, obogatitveno in selektivno gojišče, ko jih predpisuje standard ISO 11290-1.

4.2.1 Primarna in sekundarna obogatitev

Primarna obogatitev oz. predobogatitev je potrebna, ker je število listerij oz. *L. monocytogenes* v živilih pogosto nizko, kar navadno oteži detekcijo listerij s klasičnim pristopom z uporabo selektivnih gojišč. Zato smo uporabili primarno selektivno predobogatitveno gojišče s polovično koncentracijo selektivnih sestavin (gojišče Half

Fraser; Slika 9). Po končani inkubaciji smo opazovali spremembe gojišča. Ob morebitni prisotnosti listerij gojišče počrni, kar je posledica reakcije med askuletinom, nastane s hidrolizo askulina, in železovimi ioni. Ker v našem poskusu v preiskovanih vzorcih mleka, sirnine in sirov nismo ugotovili prisotnosti listerij, gojišča niso počrnela (razen v primeru kontrolnega seva *L. monocytogenes* CCM 5576. Barva gojišča je le rahlo potemnela zaradi naravno prisotne mikroflore preiskovanih vzorcev (Slika 10).

Sekundarna obogatitev ali obogatitev je potekala tako, da smo del primarno obogatenega vzorca po inkubaciji prenesli v obogatitveno gojišče Fraser, ki ima celotno koncentracijo selektivnih sestavin. Zaradi istega razloga kot pri gojišču HF, tudi to gojišče ob morebitni prisotnosti listerij počrni (Slika 10). Podobno kot pri HF, je tudi v tem primeru gojišče F le rahlo potemnelo.

4.2.2 Izolacija na trdnem selektivnem gojišču

Uporabili smo selektivno trdno gojišče Palcam (Slika 9), na katerega smo cepili suspenzijo iz primarne in sekundarne obogatitve. Po 48 urni inkubaciji smo opazovali, če so se pojavile kolonije, tipične za listerijo.

Na omenjenem gojišču zrastejo listerije kot majhne, olivno-zelene kolonije, premera od 1,5 mm do 2 mm z vdrtim centrom in črnim obročem, vendar brez precipitacijske cone. V primeru prisotnosti *L. monocytogenes*, pa se pri teh kolonijah pojavi še precipitacijska cona (Slika 11). V našem poskusu smo z uporabljenimi metodami ugotovili, da pri nobenem od preiskovanih vzorcev mleka, sirnine in sira nismo potrdili prisotnosti tipičnih kolonij za listerije oz. celo *L. monocytogenes*.

Pri vzorcu mleka za kraški ovčji sir se je sicer po petih dneh razvila kolonija, ki je spominjala na listerijsko. Ker smo želeli naš sum preveriti, smo kolonijo osamili s trdnega gojišča Palcam in pobarvali po Gramu. Ker se je izkazalo, da je preiskovana kolonija Gram pozitivni kok, smo izključili možnost, da bi bila kolonija pripadnica rodu *Listeria*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Identifikacija bakterij vrste *L. monocytogenes*

Za izolacijo in identifikacijo smo uporabili selektivno trdno gojišče, predpisano s standardom ISO 11290-1. Vzorce mleka, sirine in sira smo najprej primarno obogatili s tekočim gojiščem Half Fraser. Po inkubaciji smo del te suspenzije prenesli v drugo, obogatitveno gojišče Fraser, kjer smo zopet vse skupaj inkubirali in po inkubaciji prenesli na trdno gojišče Palcam. Podoben poskus kot smo ga opravili mi, so izvedli tudi na Portugalskem (Mena in sod., 2004) in v Švici (Pak in sod., 2002), le da so Pak in sod. (2002) v koraku identifikacije listerij namesto trdnega gojišča Palcam, uporabili trdno gojišče Oxford. Tudi primarno in sekundarno gojišče je bilo drugo, prav tako sta bili različni količini vzorcev ter gojišč. Sam postopek predobogatitve in obogatitve, kakor na koncu izolacijo na trdnem gojišču pa so izvedli podobno kot mi v našem poskusu oz. podobno kot Mena in sod. (2004). V Turčiji pa so poskus zastavili tako, da so izvedli samo eno obogatitev in vzorce namesto en dan (24 ur) inkubirali dva dni (48 ur), nato pa so suspenzijo prenesli na trdno gojišče Oxford (Aygün in Pehlivanlar, 2006). Uyttendaele in sod. (2000) pa poročajo o direktnem določanju *L. monocytogenes* v belgijskih sirih tako, da so namesto obogatitvenih korakov priprave vzorcev, potrebnih za selektivno izrast listerij, uporabili metodo IMS (imunomagnetna separacija). Homogenate vzorcev sira so centrifugirali, odstranili usedlino, iz supernatantov pa bakterijske celice s pomočjo IMS koncentrirali in ločili od delcev sira ter maščobe. Pridobljeni bakterijski pelet so obdelali z encimi in nanесли na trdno gojišče Oxford (Uyttendaele in sod., 2000).

V naši analizi, ki je trajala pet mesecev, nismo našli nobene tipične listerije ali celo *L. monocytogenes*, kar ustreza priporočilu Uredbe Komisije (ES) št. 1441/2007 z dne 5. decembra 2007 o spremembi Uredbe (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. Uredba zahteva odsotnost *L. monocytogenes* v 25 g živila, ki ga proizvajalec še ni dal v promet. Uporablja se ista referenčna metoda, kot smo jo uporabljali v naši raziskavi.

Na primeru iz Turčije sta Aygün in Pehlivanlar (2006) ugotavljala prisotnost listerij v 157 proizvodih. Rezultati so pokazali, da sta med vsemi 157 preiskanimi vzorci surovega mleka, turškega belega sira, jogurta ter masla, le pri dveh vzorcih turškega belega sira potrdila prisotnost *L. monocytogenes*. Zaključila sta, da za okužbo z *L. monocytogenes* pri surovem mleku ni resnega tveganja, saj, podobno kot v našem primeru, niso našli nobenega pozitivnega vzorca. Le znatno večja je možna prisotnost listerije v sirih (Aygün in Pehlivanlar, 2006).

Švicarski raziskovalci (Pak in sod., 2002) pa so poskus izvedli v obdobju 10 let. V tem času je bilo odvzetih 76271 različnih vzorcev živil iz Švice, od katerih so pri 3722 potrdili prisotnost *L. monocytogenes*. Rezultati povedo, da je listerija prisotna v živilih (Pak in sod., 2002), zato je še posebej pomembna študija, ki so jo izvedli v Angliji. Ker so listerije psihrotrofni mikroorganizmi, se uspešno razmnožujejo tudi pri nizkih temperaturah, kar pomeni, da se lahko razmnožuje tudi pri temperaturah hlajenja. Zato so preverjali, kako nizke temperature vplivajo na hitrost razmnoževanja listerij. Ugotovili so, da se je po 5

dneh shranjevanja svežega sira pri temperaturi hladilnika (0–5°C) listerija namnožila od začetne koncentracije 10 ke/g sira do 10³ ke/g. Pri shranjevanju istega vzorca sira pri temperaturi 10 °C, pa je končna koncentracija listerij narasla tudi do 10⁷ ke/g. Zaužitje takega izdelka pa pomeni resno nevarnost okužbe z listerijo (Mena in sod., 2004).

Uporabljene metode ugotavljanja prisotnosti listerij v različnih živilih, tudi mleku in mlečnih izdelkih, so si med seboj podobne, razen metode z IMS, saj je bila v vseh naštetih primerih uporabljena vsaj ena obogatitev. Obogatitev se uporablja zato, ker je ponavadi število celic v vzorcu nizko. Na koncu pa so v vseh primerih vedno uporabili selektivno trdno gojišče Palcam ali Oxford. Pri primerjavi omenjenih primerov, kjer smo oz. so uporabili korake obogatitve se je na koncu izkazalo, da so metode med seboj popolnoma primerljive. Prednost metode koncentriranja in ločevanja celic iz vzorcev z metodo IMS je zgolj v prihranku časa, saj pridobimo bakterijske celice v nekaj urah, medtem ko za pridobitev bakterijskih celic z obogatitvenimi koraki potrebujemo 2 ali celo 3 dni. Končni rezultati identifikacije listerij oz. *L. monocytogenes* na trdnem gojišču pa so pri vseh metodah popolnoma enakovredni.

5.1.2 Primeri listerioze po svetu

Bolezen se v različnih deželah pojavlja različno. Pojavlja se posamično in epidemično. Čeprav je pogostnost okužbe pri človeku z listerio nizka (2–5 primerov na milijon prebivalcev), je stopnja umrljivosti glede na število primerov okužbe višja od 20 %. Na Danskem ocenjujejo, da letno oboli 2,3 osebe na milijon prebivalcev, v Združenih državah Amerike pa je po ocenah vsako leto 2500 novih primerov okužb z *L. monocytogenes*, od tega 500 smrtnih. V 80. letih prejšnjega stoletja je pogostnost okužbe z listerijo v Evropi in Severni Ameriki začela naraščati. Ni pa jasno, ali je povečano število zabeleženih okužb rezultat boljšega poznavanja bolezni in izboljšanih diagnostičnih metod ali pa je dejansko šlo za povečanje števila okužb (Marolt-Gomišček in Radšel-Medvešček, 2002; Mena in sod., 2004).

5.1.3 Primer s Portugalske

Prehranjevalne navade Portugalcev so precej podobne prehranjevalnim navadam prebivalcev ostalih južnoevropskih držav. Za razliko od standardne zahodnoevropske hrane, kot so mesni proizvodi ter kozji in ovčji sir, predstavljajo ribe glavni del portugalske prehrane. Dejanska pogostnost listerioz ni znana, ker je le malo podatkov o številu okužb s kontaminiranimi žvili. Po podatkih WHO (World Health Organization) med letom 1993 – 1998 ni bilo znanih primerov okužbe z *L. monocytogenes* (Mena in sod., 2004).

V obdobju od januarja 2000 do septembra 2001 so analizirali 1035 vzorcev različnih živilskih proizvodov portugalskih proizvajalcev in distributerjev hrane. Med 6 odvzetimi vzorci surovega mleka, so pri enem potrdili prisotnost *L. monocytogenes*, medtem ko je bilo 28 analiziranih vzorcev pasteriziranega mleka negativnih na prisotnost listerij. Med 371 vzorci sirov, izdelanih iz pasteriziranega mleka, je bilo 6 pozitivnih, ter med 50 vzorci svežega sira 2 pozitivna (Mena in sod., 2004). Podobno kot je bila opravljena omenjena raziskava ugotavljanja prisotnosti listerij v vzorcih mleka in mlečnih izdelkov, smo izvedli tudi našo raziskavo na vzorcih mleka, sirnine ter sira v Sloveniji.

Mena in sod. (2004) so mnenja, da prisotnost listerij pri živilih, ki jih pred zaužitjem termično obdelamo, ni tako nevarna, saj je dokazano, da normalen proces pasterizacije uniči listerijo, ravno tako običajno kuhanje. Pripravljena hrana se lahko sekundarno kontaminira z listerijo in drugimi bakterijami, in sicer direktno oz. preko površin, ki so bile kontaminirane z listerijo preko surove hrane, če te površine niso bile ustrezno razkužene. Predhodne študije so pokazale, da so možen vzrok kontaminacije hrane z listerijo okuženi hladilniki, v katerih se skladiščijo in prevažajo surova živila. Pasterizacija listerije ne uniči vselej, predvsem ni uspešna, če je surova hrana močno kontaminirana, kar je bilo v tej študiji dokazano na vzorcih surovega mesa (Mena in sod., 2004).

5.1.4 Primeri listerioz v Sloveniji

Preglednica 2: Primeri listerioz, zabeleženi v Sloveniji v letih 2001–2007 (Zdravstveni statistični letopis 2001–2007, 2009)

Leto	CE	NG	KP	KR	LJ	MB	MS	NM	RAVNE	SKUPAJ
2001	1	0	4	0	1	0	1	0	0	7
2002	NI ZABELEŽEN NOBEN PRIMER OKUŽBE									0
2003	0	1	1	2	0	0	2	0	0	6
2004	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2005	0	0	1	0	2	0	0	0	0	3
2006	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2
2007	0	0	0	1	0	2	1	0	0	4

Ker v našem primeru nismo potrdili prisotnosti listerij ali celo *L. monocytogenes*, smo preverili še podatke za Slovenijo. Ugotovili smo, da so bili v letu 2005 (v letu izvajanja našega poskusa) znani oz. odkriti samo trije primeri listerioze.

Zajeti so podatki od leta 2001–2007. V tem obdobju pa manjkajo podatki za leto 2002. Razberemo lahko, da je pogostnost pojavljanja listerioz v Sloveniji izredno nizka, saj je iz zbranih podatkov razvidno največ 7 odkritih primerov listerioze. Očitno je, da se je z uvedbo višjih standardov pri higieni živil in izboljšani kvaliteti krme za živali, tudi zmanjšala pogostost pojavljanja listerioz pri ljudeh.

5.2 SKLEPI

- V naši analizi, opravljeni na vzorcih mleka, sirine ter sira nismo ugotovili prisotnosti listerij. V Sloveniji je število prijavljenih in ugotovljenih primerov nizko.
- Iz rezultatov našega poskusa sklepamo, da se je z uvedbo višjih standardov pri higieni živil, z izboljšano kvaliteto krme za živali, z zdravstvenim nadzorom živali ter dobro proizvodno prakso, zelo zmanjšala prisotnost listerij v živilih/krmi in s tem možnost okužbe z listerijo.
- Slovenski tradicionalni siri, kljub temu, da so narejeni iz surovega mleka, predstavljajo majhno tveganje za okužbo z listerijami.

6 POVZETEK

Listerije naseljujejo različna okolja, saj jih najdemo v zemlji, prahu, živalski krmi, vodi, odplakah, pri različnih živalih, tako domačih kot divjih: ptice, ribe, klopi, muhe, kot tudi pri človeku. Z listerijami oz. celo z *L. monocytogenes* so lahko kontaminirana številna živila, kot so surova zelenjava, sadje, nepasterizirano mleko in mlečni izdelki, ribe, perutnina, meso ter hitro pripravljena živila.

Listerije kakor tudi *L. monocytogenes* so pogosto prisotne v človekovi prehranjevalni verigi. Pri človeku so glavni vir okužbe kontaminirana živila. Predvsem navzkrižne kontaminacije so glavni razlog za prisotnost listerij, in tudi *L. monocytogenes*, v končnih živilih. Posledično so lahko tudi mleko in mlečni izdelki pogosto okuženi z listerijami oz. *L. monocytogenes*.

Bolezen se pojavlja posamično. Pojav listerioze je majhen v primerjavi z drugimi prehranskimi infekcijami, vendar pa je smrtnost do 20 %, kar predstavlja najvišjo smrtnost med vsemi prehranskimi infekcijami.

Celoten poskus ugotavljanja prisotnosti listerije smo izvedli po predpisanih standardih ISO 11290-1, kar pomeni, da smo uporabili metodo dvostopenjske obogatitve. Listerije in celo morebiti prisotno *L. monocytogenes* pa smo na koncu izolirali s pomočjo selektivnega trdnega gojišča Palcam.

V analizo smo vzeli 4 sire iz geografsko različnih delov Slovenije. To so tolminc, mohant, kraški ovčji in bovški ovčji sir. Analizirali smo vzorce mleka, sirnine in sira v konzumni zrelosti.

Poskus smo izvedli leta 2005, vzorčenje pa je potekalo 5 mesecev, od junija do oktobra. Skozi celotno obdobje vzorčenja nismo pri nobenem od preiskovanih vzorcev zasledili prisotnosti bakterij, tipičnih za listerije oz. celo za *L. monocytogenes*.

Naši rezultati so zelo spodbudni, saj na podlagi dejstva, da v nobenem od preiskovanih vzorcev nismo ugotovili prisotnosti listerij lahko sklepamo, da v Sloveniji izvajamo dober zdravstveni nadzor živali in surovin, ki upošteva visoke higienske standarde in HACCP nadzor.

Iz preglednice 2, kakor tudi rezultatov naše študije lahko zaključimo, da je v Sloveniji število prijavljenih in ugotovljenih primerov listerioz zelo majhno. To pomeni, da je prisotnost listerij v živilih nizka, najverjetneje zaradi doslednega upoštevanja pravil (GMP/HACCP). S tem pa je tudi manjša verjetnost okužbe. Vendar pa menim, da so hude posledice kot so splav, mrtvorojeni otroci, meningitis, encefalitis, septikemija, duševna prizadetost ter smrt, ki jih lahko povzroči okužba z morebiti prisotnostjo *L. monocytogenes*, zadostni razlogi za previdnost.

7 VIRI

- Aygun O., Pehlivanlar S. 2006. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control*, 17: 676–679
- Bajt N., Golc-Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, Kmečki glas: 9–13
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986. Vol 2. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds.). Baltimore, Williams & Wilkins: 1234–1245
- Bem Z., Adamič J., Žlender B., Možina – Smole S., Gašperlin L. 2003. Mleko. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Rogelj I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 513–539
- Bovški sir. 2005. agrislove.net http://www.agrislove.net/search_pr.php?lang=slo&ID=29 (14. avg. 2009)
- Ferčej J., Šobar B., Skušek F. 1989. Govedoreja. Ljubljana, Kmečki glas: 196 str.
- ISO 11290-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *L. monocytogenes*. Part 1: Detection method: 85 str.
- Jeršek B. 2005. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Katedra za živilsko mikrobiologijo: 19–20
- Kapun-Dolinar A. 2001. Mikrobiologija. 1. natis. Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 145–147
- Kompan D., Erjavec E., Kastelic D., Kavčič S., Kermauner A., Rogelj I., Vidrih T. 1996. Reja drobnice, Ljubljana, Kmečki glas: 309str.
- Kraškiovčjisir. Formaggio.it Il Portalo del formaggio
<http://www.formaggio.it/Slovenia/KraskiOvcjiSir.jpg> (14.avg. 2009)
- Listerioza. 2007. Zavod za zdravstveno varstvo Celje.
<http://www.zzv-ce.si/unlimitpages.asp?id=250> (7. jun. 2009)
- Low J.C., Donachie W. 1997. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153: 9–29
- Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. 2002. Listerioza. V: Infekcijske bolezni. Radšel-Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 219–224
- Mena C., Almeida G., Carneiro L., Teixeira P., Hogg T., Gibbs P.A. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21: 213–216

- Müller-Premru M. 2002. Nesporogeni po Gramu pozitivni bacili. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 255–263
- Nastanek rjave pasme. Zveza rejcev govedi rjave pasme Slovenije. <http://www.rjavo.govedo.si/pls/rjavo/!rjavo.govedo?m=21> (9. jul. 2009)
- Orešnik I., Polak M., Visočnik M. 2008. Obožujem sir. Ljubljana, Kmečki glas: 160 str.
- Pak S. II, Spahr U., Jemmi T., Salman M.D. 2002. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990–1999. Preventive Veterinary Medicine, 53: 55–65
- Perko B. 2003. Slovenski avtohtoni siri – siri z geografskim poreklom: zgodovina, področje, tehnološki postopki. Delavnica za kmetijske svetovalce, Rodica, 18–19 nov. 2003. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 53 str.
- Pintado C.M.B.S., Oliveira A., Pampulha M.E., Ferreira M. A.S.S. 2005. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. Food Microbiology, 22: 79–85
- Rocourt J., Wehmeyer U., Stackenbrandt E. 1987. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. Nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 37, 3: 266–270
- Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. 2003. Encyclopedia of dairy sciences. Bodmin, Cornwall, UK, MPG Books: 1650–1655
- Schlech W. F. III. 2000. Foodborne Listeriosis. Clinical Infectious Diseases, 31: 770–775
- Slanovec T. 1982. Sirarstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 4–5
- Šabec S. 1964. Osnove sirarske tehnologije. Splošno sirarstvo. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 9–14
- Urbanija A. 1986. Mikrobiologija in epidemiologija. Ljubljana, Srednja šola za farmacijo, kozmetiko in zdravstvo: 92 str.
- Uredba Komisije (ES) št. 1441/2007 z dne 5. decembra 2007 o spremembi Uredbe (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. Uradni list Evropske unije, L 322/12, 7. 12. 2007.
- Uyttendaele M., Hoorde V., Debevere J. 2000. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese. International Journal of Food Microbiology, 54, 3: 205–212

Uzunović-Kamberović S. 2009. Listeria i Erysipelothrix. V: Medicinska mikrobiologija. Abram M., Bubonja M. (ur.). Fojnica, Štamparija: 307–315

Zagožen F. 1984. Ovčjereja. Ljubljana, Kmečki glas: 204 str.

Zdravstveni statistični letopis 2001-2007. Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije.
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=834> (28. jun. 2009)

Žan M., Čepon M. 2004a. Ohranjanje cikastega goveda. Kmetovalec, 72, 12: 13–16

Žan M., Čepon M. 2004b. Zgodovina in razvoj pasme. Kmetovalec, 72, 11: 13–15

Žan M., Čepon M. 2004c. Cikasto govedo nekoč in danes. Kmečki glas, 61, 44: 8

Žan M., Čepon M. 2005. Rejski program za cikasto govedo. Cikasti zvonček, 2: 12–13

ZAHVALA

Pri nastajanju diplomske naloge mi je ob strani stalo kar nekaj ljudi. Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič, za vsestransko pomoč, vodstvo in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala dr. Nataši Siard za tehnični pregled diplomske naloge in ga. Karmeli Malinger za pregled prevoda izvlečka.

Zahvaljujem se tudi mojemu fantu Klemenu za njegovo potrpežljivost v času nastajanja diplomske naloge in za pomoč pri oblikovanju naloge.

Zahvaljujem se družini za njeno pomoč in podporo v času mojega študija.

Zahvala velja tudi vsem neimenovanim, ki so mi pomagali pri izdelavi diplomske naloge.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Alenka KOMAT

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI LISTERIJ V
SUROVEM MLEKU IN SIRIH IZDELANIH IZ
SUROVEGA MLEKA**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2009