

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nina NOVAK

**MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST MLEKA IZ  
MLEKOMATOV**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Nina NOVAK

**MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST MLEKA IZ MLEKOMATOV**

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij

**MICROBIOLOGICAL QUALITY OF MILK FROM MILK VENDING  
MACHINES**

GRADUATION THESIS  
Higher professional studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega študija kmetijstvo - zootehnika. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mlekarstvo in v laboratorijih Inštituta za mlekarstvo in probiotike Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

Recenzent: viš. znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašić

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: viš. znan. sod. dr. Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIĆ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomska 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.

Nina NOVAK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Vs

DK UDK 637.1:579(043.2)=163.6

KG mleko/mlekomati/mikrobiologija/mikrobiološka kakovost/Slovenija

KK AGRIS Q03/9412

AK NOVAK, Nina

SA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)

KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

LI 2011

IN MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST MLEKA IZ MLEKOMATOV

TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)

OP IX, 48 str., 6 pregl., 18 sl., 46 vir.

IJ sl

JI sl/en

AL Mleko je kakovostno živilo in hkrati izvrsten medij za rast in razmnoževanje različnih mikroorganizmov. V nalogi smo določali morebitno prisotnost patogenih bakterij (*Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, koliformnih bakterij, enterobakterij in klostridijev) ter skupno število mikroorganizmov (SŠMO) v surovem mleku iz 29-ih naključno izbranih mlekomatov. Vzorce mleka smo analizirali s klasičnimi metodami štetja na petrijevih ploščah, ki smo jih izvedli po predpisanih standardih. Pri pregledanih vzorcih mleka nismo potrdili prisotnosti bakterij *B. cereus*, *L. monocytogenes* in sulfit reducirajočih klostridijev, medtem ko smo pri enem vzorcu potrdili prisotnost bakterije *Salmonella arizona*. Prisotnost koliformnih bakterij smo potrdili pri vseh testiranih vzorcih mleka, in sicer od 3 do  $9,0 \times 10^4$  KE/ml, medtem ko smo *E. coli* potrdili pri 16 vzorcih mleka, in sicer od 2 do  $1,8 \times 10^4$  KE/ml. Enterobakterije smo potrdili pri vseh vzorcih mleka (10 do  $3,2 \times 10^4$  KE/ml). SŠMO se je pri pregledanih vzorcih mleka gibalo med  $3,0 \times 10^3$  in  $2,1 \times 10^6$  KE/ml. Iz naših rezultatov lahko zaključimo, da mleko iz mlekomatov v glavnem ustreza mikrobiološkim priporočilom za surovo mleko, namenjeno za uživanje brez predhodne toplotne obdelave. V kolikor bi to mleko pili otroci, nosečnice ali starejši ljudje, je priporočeno, da ga prekuhajo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs

DC UDC 637.1:579(043.2)=163.6

CX milk/vending machines/microbiology/microbiological quality/Slovenia

CC AGRIS Q03/9412

AU NOVAK, Nina

AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Sience

PY 2011

TI MICROBIOLOGICAL QUALITY OF MILK FROM MILK VENDING MACHINES

DT Graduation thesis (Higher professional studies)

NO IX, 48 p., 6 tab., 18 fig., 46 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Milk is high quality food and also an excellent medium for growth and reproduction of various microorganisms. The aim of our study was to determine the microbiological quality of raw milk samples, randomly collected from 29 milk vending machines. Raw milk samples were tested for the presence of pathogenic microbes (*Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, coliforms, enterobacteria, clostridia) and for total number of microorganisms by the use of conventional colony count techniques on petri dishes, which were performed according to the valid standards. *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and clostridia were absent in all samples tested, but in one sample the presence of *Salmonella arizona* was detected. Coliforms and enterobacteria were present in all milk samples in numbers from 3 to  $9.0 \times 10^4$  CFU/ml and from 10 to  $3.21 \times 10^4$  CFU/ml, respectively. In 16 samples we confirmed the presence of *Escherichia coli* from 2 to  $1.8 \times 10^4$  CFU/ml. Total number of microorganisms was between  $3.0 \times 10^3$  in  $2.1 \times 10^6$  CFU/ml of milk. From our results it can be concluded that milk from milk vending machines generally meets the microbiological criteria for raw milk intended for consumption without prior heat treatment. But in case this raw milk is consumed by small children, pregnant women and elderly people, heat treatment is advised.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 SESTAVA KRAVJEGA MLEKA	2
<b>2.1.1 Voda</b>	2
<b>2.1.2 Maščoba</b>	2
<b>2.1.3 Beljakovine</b>	2
<b>2.1.4 Laktoza</b>	3
2.2 MIKROBIOLOGIJA SUROVEGA MLEKA	3
<b>2.2.1 Viri okužbe mleka</b>	3
<b>2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na razmnoževanje mikroorganizmov v mleku</b>	4
2.3 PATOGENE BAKTERIJE	6
<b>2.3.1 Rod <i>Salmonella</i></b>	6
2.3.1.1 Zgradba in fiziološke značilnosti	6
2.3.1.2 Patogeneza in razširjenost	7
2.3.1.3 Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih	7
<b>2.3.2 Vrsta <i>Listeria monocytogenes</i></b>	7
2.3.2.1 Zgradba in fiziološke značilnosti	7
2.3.2.2 Patogeneza in razširjenost	8
2.3.2.3 Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih	9
<b>2.3.3 Vrsta <i>Clostridium perfringens</i></b>	9
2.3.3.1 Zgradba in fiziološke značilnosti	9
2.3.3.2 Patogeneza	10

2.3.3.3	Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih	10
<b>2.3.4</b>	<b>Vrsta <i>Bacillus cereus</i></b>	11
2.3.4.1	Morfološke in fiziološke značilnosti	11
2.3.4.2	Patogeneza	11
2.3.4.3	Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih	12
<b>2.3.5</b>	<b>Enterobakterije</b>	12
2.3.5.1	Zgradba in fiziološke značilnosti	12
2.3.5.2	Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih	13
<b>2.3.6</b>	<b>Vrsta <i>Escherichia coli</i></b>	13
2.3.6.1	Zgradba in fiziološke značilnosti	13
2.3.6.2	Patogeneza in razširjenost	14
2.3.6.3	Pogostnost <i>E. coli</i> v mleku in mlečnih izdelkih	15
<b>2.3.7</b>	<b>Skupno število mikroorganizmov v mleku</b>	16
2.4	MLEKOMAT	17
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	18
3.1	NAČRT DELA	18
3.2	MATERIAL	19
<b>3.2.1</b>	<b>Laboratorijska oprema</b>	19
<b>3.2.2</b>	<b>Gojišča in raztopine za razredčevanje</b>	20
3.2.2.1	Ringrjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti	20
3.2.2.2	Gojišča za določanje prisotnosti <i>Salmonella</i> sp.	20
3.2.2.3	Gojišča za določanje prisotnosti <i>Listeria monocytogenes</i>	21
3.2.2.4	Gojišča za določanje prisotnosti sulfit reducirajočih klostridijev	22
3.2.2.5	Gojišča za določanje prisotnosti <i>Bacillus cereus</i>	22
3.2.2.6	Gojišča za določanje prisotnosti enterobakterij	22
3.2.2.7	Gojišča za določanje prisotnosti skupnih koliformnih bakterij in <i>Escherichia coli</i>	22
3.2.2.8	Gojišča za določanje skupnega števila mikroorganizmov	23
3.2.2.9	Reagenti za barvanje po Gramu	23
3.3	METODE	24
<b>3.3.1</b>	<b>Priprava zaporednih decimalnih razredčitev vzorcev mleka</b>	24
<b>3.3.2</b>	<b>Metode določanja prisotnosti <i>Salmonella</i> sp.</b>	25

<b>3.3.3</b>	<b>Metode določanja prisotnosti <i>Listeria monocytogenes</i></b>	27
<b>3.3.4</b>	<b>Metode določanja prisotnosti sulfit reducirajočih klostridijev</b>	29
<b>3.3.5</b>	<b>Metode določanja prisotnosti <i>Bacillus cereus</i></b>	29
<b>3.3.6</b>	<b>Metode določanja prisotnosti enterobakterij</b>	30
<b>3.3.7</b>	<b>Metode za določanje prisotnosti skupnih koliformnih bakterij in <i>Escherichia coli</i></b>	31
<b>3.3.8</b>	<b>Metoda določanja skupnega števila mikroorganizmov</b>	31
<b>3.3.9</b>	<b>Izračun števila kolonijskih enot</b>	31
<b>3.3.10</b>	<b>Oksidazni test</b>	32
<b>3.3.11</b>	<b>API 10 S test</b>	33
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	34
4.1	DOLOČANJE PRISOTNOSTI <i>Salmonella</i> sp.	34
4.2	DOLOČANJE PRISOTNOSTI <i>Listeria monocytogenes</i>	35
4.3	DOLOČANJE PRISOTNOSTI SULFIT REDUCIRajočIH KLOSTRIDIJEV	36
4.4	DOLOČANJE PRISOTNOSTI <i>Bacillus cereus</i>	36
4.5	DOLOČANJE PRISOTNOSTI ENTEROBAKTERIJ	37
4.6	DOLOČANJE PRISOTNOSTI SKUPNIH KOLIFORMNIH BAKTERIJ IN <i>Escherichia coli</i>	37
4.7	DOLOČANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV	38
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	40
5.1	RAZPRAVA	40
5.2	SKLEPI	42
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	43
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	44
	<b>ZAHVALA</b>	

**KAZALO PREGLEDNIC**

Str.

Preglednica 1: Število prijavljenih primerov salmoneloze v RS (VURS, 2011: 63)	7
Preglednica 2: Prijavljeni primeri bolezni pri ljudeh v letih 2004 do 2008 (VURS, 2011: 52)	9
Preglednica 3: Število prijavljenih okužb z <i>E. coli</i> in verotoksinom VTEC v Sloveniji (VURS, 2011)	15
Preglednica 4: Razredi mikrobiološke kakovosti mleka (Čanžek Majhenič in sod., 2008: 10)	16
Preglednica 5: Skupno število mikroorganizmov v mililitru mleka	39
Preglednica 6: Največja in najmanjša vrednost ter povprečna vrednost skupnega števila mikroorganizmov v mililitru vzorca	39

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Viri okužbe mleka na farmi (Rogelj, 2003: 524)	4
Slika 2: Mikroskopski preparat salmonel (barvano po Gramu, 1000x povečava) (Jeršek in Avbelj, 2003: 699)	6
Slika 3: Mikroskopski preparat bakterij <i>Listeria monocytogenes</i> (barvano po Gramu, 1000x povečava) (Jeršek in Avbelj, 2003: 699)	8
Slika 4: Toksini bakterijske vrste <i>Clostridium perfringens</i> (Gubina, 2002a: 243)	10
Slika 5: Mikroskopski preparat bakterij <i>Escherichia coli</i> (barvano po Gramu, 1000x povečava) (Jeršek in Avbelj, 2003: 699)	14
Slika 6: Antagenska zgradba <i>Escherichia coli</i> (Andlovic, 2002a: 182)	14
Slika 7: Shema dela	18
Slika 8: Decimalna razredčitev (Cappuccino in Sherman, 2005: 508)	24
Slika 9: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti <i>Salmonella</i> sp.	26
Slika 10: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti <i>Listeria monocytogenes</i>	28
Slika 11: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti sulfit reducirajočih klostridijev	29
Slika 12: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti <i>Bacillus cereus</i>	30
Slika 13: Primer inkubacijske posode (foto: N. Novak, 2011)	33
Slika 14: Api 10 S test, ki je negativen za <i>Salmonella</i> sp. (foto: N. Novak, 2011)	34
Slika 15: Api 10 S test, ki je pozitiven na <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizona</i> (foto: N. Novak, 2011)	35
Slika 16: Značilne kolonije za <i>Bacillus cereus</i> , izrasle na trdnem gojišču MYP (Microbiology Manual, 2005)	36
Slika 17: Prisotnost enterobakterij na trdnem gojišču VRBD agarju (foto: N. Novak, 2011)	37
Slika 18: Prisotnost skupnih koliformnih bakterij (obarvane rdeče in modro) in samo <i>E. coli</i> (obarvano temno modro) na Chromocult® coliform agar (foto: N. Novak, 2011)	38

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	odstotek
ALOA	trdno selektivno gojišče Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti
$a_w$	vodna aktivnost
B.	<i>Bacillus</i>
BPLS	trdno selektivno gojišče Brilliant green Phenol-red Lactose Sucrose agar
BPW	tekoče predobogatitveno gojišče Buffered peptone water
Cl.	<i>Clostridium</i>
E.	<i>Escherichia</i>
F	tekoče obogatitveno gojišče Fraser broth
HF	tekoče predobogatitveno gojišče Half-concentrated Fraser broth
ISO	International Organization for Standardization = mednarodna zveza pristojnih nacionalnih standardizacijskih organov za določanje skupnih standardov
KE	kolonijske enote
L.	<i>Listeria</i>
ml	mililiter
mm	milimeter
MYP	trdno selektivno gojišče Cereus Selective agar
Oxford	trdno selektivno gojišče Oxford Listeria Selective agar
PCA	trdno gojišče Plate count agar
RVS	tekoče obogatitveno gojišče Rappaport-Vassiliadis Broth
S.	<i>Salmonella</i>
sel/cys	tekoče obogatitveno gojišče Selenite cystine enrichment broth
SPS	trdno selektivno gojišče Perfringens Selective agar
SŠMO	skupno število mikroorganizmov
subsp.	subspecies (podvrsta)
VRBD	trdno selektivno gojišče Violet red bile dextrose agar
VURS	Veterinarska uprava Republike Slovenije
XLD	trdno selektivno gojišče (Xylose lysine deoxycholate agar )
ZZV	Zavod za zdravstveno varstvo
$\mu\text{l}$	mikroliter

## 1 UVOD

Po Pravilniku o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv (1993) je mleko čist, nespremenjen, svež proizvod mlečne žleze v času laktacije, dobljen s popolno in redno molžo zdravih in pravilno krmljenih krav, ovac ali koz, ki mu ni nič dodano oziroma odvzeto.

Mleko je zaradi svoje sestave izvrsten medij za rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Narava pridobivanja mleka je takšna, da se okužbi mleka z mikroorganizmi ne moremo izogniti. Spremembe v sestavi in lastnostih mleka navadno opazimo šele takrat, ko število mikroorganizmov v 1 ml presega vrednost  $10^6$  bakterijskih celic, ki so sposobne tvoriti kolonijske enote. Spremembe niso odvisne samo od števila bakterij, temveč tudi od vrst bakterij ter od časa njihovega delovanja in okoliških pogojev (Rogelj, 2003).

V mleku od mikroorganizmov prevladujejo bakterije, lahko pa so prisotne tudi druge vrste mikroorganizmov, predvsem kvasovke in plesni. V mlekarstvu lahko govorimo o tehnološko koristnih mikroorganizmih (mlečnokislinske bakterije, propionske bakterije), tehnološko škodljivih mikroorganizmih, ki povzročajo kvarjenje mleka (proteolitični in lipolitični mikroorganizmi) in patogenih (zdravju škodljivih) mikroorganizmih, ki ogrožajo zdravje potrošnika – na primer salmonelle, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* itd. (Mavrin in Oštir, 2002).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SESTAVA KRAVJEGA MLEKA

Kravje mleko vsebuje v povprečju 87 % vode ter 13 % suhe snovi (Bajt in Golc Teger, 2002). Glavne sestavine mleka so voda, maščoba, beljakovine in laktoza. V manjši meri pa vsebuje tudi vitamine, minerale, encime in zaščitne snovi (Rogelj, 2003).

#### 2.1.1 Voda

Voda predstavlja največji delež mleka. V mleku se nahaja v dveh oblikah, kot prosta voda in kot vezana (hidratacijska) voda. Večji del je proste vode - v njej so raztopljene sestavine mleka. Manjša količina vode pa je vezana - del v kazeinu ter albuminu in globulinu, del pa v laktozi in v ovojnicih maščobnih kroglic (Mavrin in Oštir, 2002; Bajt in Golc Teger, 2002).

#### 2.1.2 Maščoba

Mlečna maščoba pomembno vpliva na okus in vonj mlečnih izdelkov. V svežem mleku je povprečno 3,8 % maščobe, njen delež pa niha od 2,5 do 6 %. Glavna sestavina mlečne maščobe so trigliceridi, ki predstavljajo 98 % vseh maščob. Ostala 2 % predstavljajo di- in mono-gliceridi, holesterol, fosfolipidi, proste maščobne kisline in glikolipidi. Maščoba je v mleku porazdeljena v obliki kapljic, ki jih imenujemo maščobne kroglice. Le-ta je sestavljena iz tanke ovojnice, ki jo imenujemo membrana maščobne kroglice. Tvorijo jo proteini, fosfolipidi, steroli, karoteni in vitamini, topni v maščobah. V notranjosti jo napolnjujejo gliceridi (prava maščoba). Zunanja opna preprečuje, da bi se maščobne kroglice zlepile v enotno maščobno snov, istočasno pa ima sposobnost povezovati oziroma zlepiti maščobne kroglice v grozdasto strukturo ali aglomerat, ki je osnova za nastajanje maslenih zrnč in posledično surovega masla (Mavrin in Oštir, 2002; Singh in Bennett, 2002).

#### 2.1.3 Beljakovine

Beljakovine so najpomembnejša sestavina mleka. So visoko-molekularne spojine, ki so občutljive na kemijske in fizikalne vplive, zaradi česar hitro spremenijo svojo zgradbo in lastnosti (Mavrin in Oštir, 2002). Povprečna vsebnost beljakovin v kravjem mleku je 3,3 %, njihovi osnovni gradniki pa so aminokisline. Zelo pomembne so esencialne aminokisline, ki jih naš organizem nujno potrebuje, a jih ne more sintetizirati sam (Bajt in Golc Teger, 2002). S prehranskega vidika so beljakovine mleka zelo kakovostne, saj vsebujejo veliko esencialnih aminokislín. V mleku najdemo dva tipa proteinov: kazeine (80 %) in serumske ali sirotkine proteine (20 %). Kazeini so sestavljeni iz  $\alpha$ -kazeinov ( $\alpha_{s1}$ -

kazein,  $\alpha_{s2}$ -kazein),  $\beta$ -kazeinov in  $\kappa$ -kazeinov, medtem ko ostali kazeini nastanejo s spremembami osnovnih kazeinov. Tako na primer s proteolizo  $\beta$ -kazeina nastanejo  $\gamma$ -kazeini. Kazeini so v mleku povezani s koloidnim kalcijevim fosfatom ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) v večje ali manjše kroglaste strukture, ki jih imenujemo kazeinske podmicele. Kazein poleg beljakovin vsebuje tudi fosfor, na katerega se veže kalcij, zato predstavlja vir nepogrešljivih mineralnih snovi v prehrani ter igra pomembno vlogo pri usirjanju mleka. Med serumske ali sirotkine proteine uvrščamo  $\alpha$ -laktalbumine,  $\beta$ -laktoglobuline, v manjši meri pa še proteaze in peptone, ki nastanejo ob hidrolizi  $\beta$ -kazeina in beljakovine krvnega seruma. Med slednje sodijo albumini in imunoglobulini (Mavrin in Oštir, 2002).

#### 2.1.4 Laktoza

Laktoza ali mlečni sladkor je ogljikov hidrat, ki je sestavljen iz dveh enostavnih sladkorjev – glukoze in galaktoze, ki sta med seboj povezani z  $\beta$ -glikozidno vezjo. Količina laktoze se v mleku giblje med 4,5 do 5 %. Po okusu je manj sladka kot drugi sladkorji (saharoza, glukoza). Laktoza je hrana za mikroorganizme, ki jo izkoriščajo na različne načine, kar ima za posledico raznolike metabolne produkte. Pri tem nastajajo organske kisline, alkoholi in plini, kot sta ogljikov dioksid in vodik (Mavrin in Oštir, 2002; Singh in Bennett, 2002).

### 2.2 MIKROBIOLOGIJA SUROVEGA MLEKA

V mleku, ki ga namolzemo iz zdravega vimena, je malo mikroorganizmov. Kadar je splošno higienско stanje molzišča, opreme in živali dobro, vsebuje mleko po molži do 10.000 mikroorganizmov v ml vzorca (Rogelj, 2003).

#### 2.2.1 Viri okužbe mleka

Glavni viri okužbe mleka z mikroorganizmi so notranja mlečna žleza in seski, zunanjost vimena in seskov, molzni stroj oz. roke molznika ter mlekarska oprema. Poleg navedenih virov okužbe, s katerimi pride v mleko največje število mikroorganizmov, so lahko vir okužbe tudi insekti, krma, voda in zrak (Rogelj, 2003).

Mleko, ki ga izločajo mlekotvorni mehurčki v mlečni žlezi, ne vsebuje mikroorganizmov. Kljub temu pa lahko v zdravi mlečni žlezi najdemo mikrobe, ki tja prispejo iz okolja preko seskovega kanalčka, njihovo število pa je zelo majhno. Če pride do vnetja mlečne žleze (mastitis), pa je slika povsem drugačna. Število mikroorganizmov se znatno poveča. Najpogosteje se okužba začne z vdorom patogenih mikrobov v seskov kanal med molžo, vzrok za vnetje pa je lahko tudi poškodba mlečne žleze (Rogelj, 2003).

Število mikroorganizmov v mleku se lahko poveča zaradi neustrezne higiene pred in med samo molžo. Seski in vime se lahko hitro umažejo z gnojem ali steljo, zato je potrebno pred vsako molžo seske in vime dobro očistiti. Če tega ne storimo, se mikroorganizmi izpirajo v mleko (Rogelj, 2003).

Velik vpliv na okužbo mleka imajo tudi molznik, molzni stroj in mlekarska oprema. Lastnik živali mora poskrbeti za redno čiščenje in razkuževanje molznega stroja. Opremo za molžo očistimo po vsaki uporabi, saj se v ostankih mleka mikrobi hitro razmnožujejo. Molznik je le redko neposredni vir okužbe mleka. Pomemben dejavnik tveganja pa postane, kadar je prenašalec kužnih bolezni (Rogelj, 2003; Mavrin in Oštir, 2002).

mikroorganizmi	možni vir okužbe mleka								
	vime (N)	vime (Z)	mlek. opr.	krma	blato	stelja/ zemlja	voda	zrak	človek
<i>Streptococcus</i>	×		×						×
<i>Micrococcus</i>	×	×	×						×
<i>Corynebacterium</i>	×								×
<i>Staphylococcus</i>		×			×				×
<i>Enterococcus</i>		×			×				×
<i>Bacillus</i>		×	×	×		×		×	
koliformne bakterije			×		×		×		×
<i>Clostridium</i>				×		×			
<i>Listeria</i>					×				
MKB			×						
<i>Escherichia coli</i>					×				
<i>Salmonella</i>					×				×
<i>Mycobacterium</i>					×	×			
<i>Klebsiella</i>						×			
<i>Pseudomonas</i>						×	×		
kvasovke, plesni						×			×
<i>Alcaligenes</i>							×		

Legenda: N = notranjost, Z = zunanjost, mlek. opr. = mlekarska oprema, MKB = mlečnokislinske bakterije

Slika 1: Viri okužbe mleka na farmi (Rogelj, 2003: 524)

### 2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na razmnoževanje mikroorganizmov v mleku

Na razmnoževanje mikroorganizmov v mleku vplivajo notranji in zunanji dejavniki. Med notranje dejavnike prištevamo hranljive snovi in rastne faktorje, vodno aktivnost, vrednost pH, količino razpoložljivega kisika ali redoks potencial in protimikrobn sistem. Mleko ima vrednost pH med 6,5 in 6,7, vodna aktivnost pa znaša 0,995. Za večino bakterij je optimalna vrednost pH med 6,8 in 7,2. Obstajajo tudi izjeme, ki imajo raje rahlo kislo okolje in si ga, s tvorbo kisline iz ogljikovih hidratov, ustvarijo kar same (Rogelj, 2003).

Glede na potrebe po kisiku delimo bakterije v štiri skupine: obligatno aerobni, mikraerofilni, fakultativno anaerobni in anaerobni mikroorganizmi (Godič Torkar, 2006).

- Obligatno aerobni mikroorganizmi nujno potrebujejo kisik za svoj metabolizem.
- Mikraerofilni mikroorganizmi so tisti, ki nujno potrebujejo kisik zaradi oksidativnega metabolizma, vendar je zanje večja koncentracija toksična. Najbolje uspevajo pri 5-10 % koncentraciji kisika.
- Fakultativni anaerobni mikroorganizmi lahko rastejo v anaerobnem ali aerobnem okolju. Energijo pridobijo z aerobnim dihanjem, če je kisik na razpolago. Če kisika ni na razpolago, pa lahko kot sprejemnike vodikovih elektronov v oksidativni obliki uporabijo nekatere druge molekule (na primer  $\text{NO}_3^-$  ali  $\text{SO}_4^{2-}$ ), v t.i. anaerobnem dihanju.
- Anaerobni mikroorganizmi pridobivajo energijo brez kisika, večinoma s fermentacijo. Glede na količino kisika, ki ga lahko prenesejo, so oligatno anaerobni (kisik jih ubije) ali aerotolerantni anaerobni mikroorganizmi (niso občutljivi za kisik, vendar vedno presnavljajo fermentativno).

Najpomembnejši zunanji dejavnik je temperatura. Temperatura sveže namolzenega mleka se giblje med 33 in 36 °C, odvisna pa je predvsem od sistema molže (Rogelj, 2003). Glede na temperaturno območje rasti delimo bakterije na (Godič Torkar, 2006):

- psihrofilne mikroorganizme: ne rastejo nad 20 °C
- psihrotrofne mikroorganizme: razmnožujejo se pri temperaturi 5 do 40 °C; optimalna temperatura za rast in razmnoževanje je pri 25 – 30 °C
- mezofilne mikroorganizme: minimalna temperatura rasti je pri temperaturi 5 °C, najvišja pa okoli 45 °C; optimalna temperatura za njihovo rast pa je med 30 in 37 °C
- termofilne mikroorganizme: minimalna temperatura rasti je v območju med 30 in 40 °C

## 2.3 PATOGENE BAKTERIJE

### 2.3.1 Rod *Salmonella*

Salmonele predstavljajo najštevilnejši rod enterobakterij. Danes je znanih že 2.400 serotipov, ki jih uvrščamo le v dve vrsti in sicer *Salmonella enterica* in *Salmonella bongori*. Vrsta *Salmonella enterica* se deli na 6 podvrst, znotraj katerih so zajeti skoraj vsi danes poznani serotipi. Obolenja pri človeku in živalih povzročajo predvsem serotipi iz podvrste *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Andlovic, 2002b).

#### 2.3.1.1 Zgradba in fiziološke značilnosti

Bakterije iz rodu *Salmonella* so po Gramu negativne, gibljive, citrokrom oksidaza negativne, katalaza pozitivne in fakultativno anaerobne paličice. Razmnožujejo se pri temperaturi med 7 in 47 °C, optimalna temperatura pa je 37 °C. Vrednost pH za rast se giblje med 4,5 do 9, pri čemer najnižjo vrednost pH, ki še omogoča razmnoževanje, določa vrsta prisotne kisline. Najugodnejši pogoj za razmnoževanje je v okolju z nevtralno vrednostjo pH. Minimalna vrednost vodne aktivnosti ( $a_w$ ) za rast je 0,94 (Adamič in sod., 2003).



Slika 2: Mikroskopski preparat salmonel (barvano po Gramu, 1000x povečava) (Jeršek in Avbelj, 2003: 699)

Salmonele rastejo na enostavnih in selektivnih gojiščih. Po inkubaciji zrastejo sivkaste kolonije, premera 2 do 3 mm. Barva kolonij je odvisna od substrata, ki je dodan gojišču. Na gojiščih, ki vsebujejo železov citrat, imajo zrasle kolonije črno cono (Sušić in Tomić-Paradžik, 2009). Z redkimi izjemami ne fermentirajo laktoze in saharoze, fermentirajo pa glukozo do kisline in plina ter razgrajujejo nitrate in tvorijo H<sub>2</sub>S. Nimajo encima ureaze ter ne tvorijo indola (Andlovic, 2002b).

### 2.3.1.2 Patogeneza in razširjenost

S salmonelami se lahko okužijo hladnokrvne in toplokrvne živali ter človek. Serotipa *Salmonella typhi* in *Salmonella paratyphi* sta patogena le za ljudi, medtem ko so živali za omenjena serotipa imune. Ostali serotipi salmonel pa lahko okužijo tako človeka kot žival – povzročajo zoonoze. Viri okužbe so bolne živali in ljudje, klicenosci, živila živalskega izvora (meso, mleko, jajca), voda, ... Infektivna doza, ki je potrebna, da se okužimo s salmonelo in obolimo za salmonelozo, je  $10^6$  do  $10^8$  kolonijskih enot (KE) salmonel v gramu živila. Pri serotipu *S. typhi* pa je ta odmerek manjši, in sicer  $10^3$  KE v gramu živila (Sušić in Tomić-Paradžik, 2009).

Kot je razvidno iz preglednice 1, je bilo v Sloveniji največ obolelih za salmonelozo leta 2003, ko je število prijavljenih primerov znašalo 4005. Po letu 2003 je število prijavljenih primerov upadal in leta 2009 je bilo zabeleženih 626 prijav.

Preglednica 1: Število prijavljenih primerov salmoneloze v RS (VURS, 2011: 63)

Leto	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Število prijav	4005	3307	1519	1519	1345	1090	626

### 2.3.1.3 Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih

Zelo učinkovit način za uničenje salmonel je pasterizacija mleka ( $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  / 15 sekund). Občasno se lahko v pasteriziranem mleku ponovno pojavijo salmonele, kar je posledica pomanjkljivih postopkov predelave mleka. Salmonelo lahko najdemo tudi v mlečnih izdelkih, če so narejeni iz nepasteriziranega mleka ali če je bila pasterizacija nepravilna (prenizka temperatura) (Poppe, 2011).

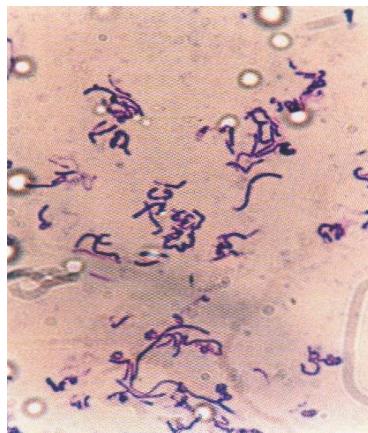
## 2.3.2 Vrsta *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* sestavlja šest vrst, med katerimi je za človeka patogena samo *L. monocytogenes*. Vrsti *L. ivanovii* in *L. seeligeri* povzročata obolenje pri prežvekovalcih, medtem ko so vrste *L. welshimeri*, *L. grayi* in *L. innocua* saprofiti. Prvič je bila bakterija izolirana pri laboratorijskih kuncih. Šele kasneje so ugotovili, da je bakterija patogena tudi za človeka (Abram in Bubonja, 2009).

### 2.3.2.1 Zgradba in fiziološke značilnosti

Bakterije rodu *Listeria* so kratke, po Gramu pozitivne, od  $0,5$  do  $2\text{ }\mu\text{m}$  dolge in  $0,4$  do  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  široke kokoidne, gibljive paličice, ki ne tvorijo spor in so brez kapsul. Gibljivost, ki jo omogočajo peritrihijalne flagele, je najizrazitejša pri temperaturi med  $20$  in  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , medtem

ko so pri 37 °C negibljive. Pod mikroskopom lahko opazimo posamezne bakterije ali kratke verižice, v obliki črke V. V starejših kulturah pa lahko nastopajo v nitasti obliki (Abram in Bubonja, 2009; Adamič in sod., 2003; Müller-Premru, 2002).



Slika 3: Mikroskopski preparat bakterij *Listeria monocytogenes* (barvano po Gramu, 1000x povečava) (Jeršek in Avbelj, 2003: 699)

Razmnožuje se v temperaturnem območju med 1 °C do 45 °C, pri vrednosti pH med 4,4 in 9,6 in  $a_w$  do 0,92, uspešno pa rastejo tudi v prisotnosti visokih koncentracij NaCl (do 12 %). So aerobne do mikroaerofilne, katalaza pozitivne in oksidaza negativne. Fermentirajo glukozo in nekatere druge sladkorje, kjer sladkor razgradijo do kisline brez plina. Za *L. monocytogenes* so značilni  $\beta$ -hemolitična aktivnost na krvnem agarju, izkoriščanje ramnoze in ne ksiloze, ter pozitiven test CAMP (Abram in Bubonja, 2009; Adamič in sod., 2003).

### 2.3.2.2 Patogeneza in razširjenost

V naravi so listerije zelo razširjene. Najdemo jih v vodi, odplakah, na rastlinah ter v živalskem in človeškem blatu, lahko pa okužijo tudi živila kot so sir, surovo mleko, meso in zelenjava (Abram in Bubonja, 2009; Müller-Premru, 2002).

Obolenje, ki ga povzroča *L. monocytogenes*, imenujemo listerioza. Je zoonoza, vendar je prenos bakterij z okužene živali na človeka v večini primerov posreden. Človek se lahko okuži na več načinov. Običajno gre za peroralno okužbo (vstopno mesto je ustna votlina), redkeje pa z neposrednim stikom s kontaminirano živaljo (vstopno mesto je koža) ali aerogeno (vstopno mesto je očesna veznica). Možen je tudi transplacentarni prenos z matere na plod, redkeje pa ob porodu skozi porodno pot (Müller-Premru, 2002).

Listerioza je redka bolezen, ki se v glavnem pojavlja sporadično, nevarna pa je predvsem trem rizičnim skupinam ljudi in sicer nosečnicam, novorojenčkom in majhnim otrokom ter ljudem z oslabljenim imunskim sistemom (starejši ljudje, sladkorni bolniki, ljudje s presajenimi organi, bolniki z levkemijo, HIV/AIDS-om). Opisane so tudi epidemije, ki so se pojavile po zaužitju okuženih živil. Letno v razvitem svetu zboli 0,5 do 0,8 oseb na

100.000 prebivalcev. Strokovnjaki ocenjujejo, da je 5 do 10 % ljudi okuženih z *L. monocytogenes*, vendar ne kažejo kliničnih znakov – so klicenosci (Abram in Bubonja, 2009; Müller-Premru, 2002).

Po navedbah Veterinarske uprave Republike Slovenije (2011) (preglednica 2) je bilo med leti 2004 in 2008 zabeleženih 1 do 7 primerov listerioz pri ljudeh. Prijavljeni primeri listerioze so potekali kot meningitis in sepse.

Preglednica 2: Prijavljeni primeri bolezni pri ljudeh v letih 2004 do 2008 (VURS, 2011: 52)

Leto	2004	2005	2006	2007	2008
Število prijav	1	3	7	5	4

### 2.3.2.3 Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih

Če žival zboli za listeriozo, se količina listerij v surovem mleku lahko poveča do  $10^4$  KE/ml mleka. Da bi tako okuženo mleko prišlo do končnega potrošnika, je malo verjetno, saj žival kaže različne vidne simptome bolezni, ki se kažejo kot slinjenje, nezmožnost žretja in pitja, motnje v gibanju... V mleku zdravih živali je vsebnost *L. monocytogenes* manj kot 10 KE/ml mleka. Pri tem je pomemben pravilen način skladiščenja, saj se vsebnost listerij v 4 do 10 dneh lahko poveča do 1000-krat (Ryser, 2011).

## 2.3.3 Vrsta *Clostridium perfringens*

### 2.3.3.1 Zgradba in fiziološke značilnosti

Bakterije iz rodu *Clostridium*, med katerimi so najpogosteje omenjane predstavnice vrst *Cl. sporogenes*, *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. botulinum* in *Cl. perfringens*, so po Gramu pozitivne, negibljive, sporogene paličice, velike od 3 do 4 µm (Gubina, 2002a). So katalaza-negativne, razmnožujejo se pri vrednosti pH 4,5. Glede odnosa do temperature veljajo klostridiji za mezofilne mikroorganizme z optimalnim območjem razmnoževanja med 30 in 37 °C, do kisika pa ima večina klostridijev striktno anaeroben odnos. Ena od izjem je na primer vrsta *Cl. perfringens*, ki je aerotolerantna in se lahko razmnožuje ob majhni prisotnosti kisika (Adamič in sod., 2003). Vegetativne celice *Cl. perfringens* so občutljive za temperature pasterizacije, medtem ko so spore izredno odporne proti visokim temperaturam in lahko preživijo tudi več ur v vreli vodi (Ray in Bhunia, 2008).

Sevi bakterijske vrste *Cl. perfringens* lahko tvorijo toksine, ki povzročajo zastrupitve. Glede na tvorbo toksinov ločimo pet serotipov, in sicer A, B, C, D in E. Med 12 znanimi vrstami toksinov, ki jih označujemo s črkami grške abecede, so najpomembnejši toksin alfa

(α) oz. lecitinaza C, toksin beta (β), toksin epsilon (ε) in toksin jota (ι) (slika 4). Glavni povzročitelj infekcij pri ljudeh je *Cl. perfringens* tipa A, ki povzroča okužbe ran, bakteriemijo in sepso ter zastrupitve s hrano (Gubina, 2002a).

Tip	Bolezenski znaki	Glavni patogeni toksini					Drugo toksini							
		α	β	ε	ι	γ	δ	η	θ	κ	λ	μ	ν	
A	Plinska gangrena, sepsa, zastrupitev s hrano, enteritis pri ovcah, teletih, konjih, psih, perutnini	+++	-	-	-	-	-	(+)	++	(+)	-	(+)	(+)	
B	Driska pri ovcah in kozah	+	+++	+	-	+	(+)	-	+	-	+	+	+	
C	Enteritis pri ovcah, prašičih	+	+++	-	-	?	+	-	+	+	-	-	(+)	
	Enteritis pri ljudeh	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	
D	Enteritis pri teletih, ovcah	+	-	+++	-	-	-	-	+	-	+	(+)	(+)	
E	Patogen za ovce, teleta	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	(+)	-	

+++ prisoten pri vseh sevih; ++ prisoten pri 80 % sevih; + prisoten pri 50 % sevih; (+) prisoten pri 30 % sevih; - praviloma ni prisoten; ? podatki niso znani

Slika 4: Toksini bakterijske vrste *Clostridium perfringens* (Gubina, 2002a: 243)

### 2.3.3.2 Patogeneza

Spore klostridijev najdemo v zemlji, gnojeni s hlevskim gnojem, v živilih (meso, mleko), v človeškem in živalskem črevesju (do 100 spor/g blata), lahko pa so prisotne tudi v normalni mikrobioti nožnice žensk. S hrano se zastrupimo, če se v gramu živila nahaja več kot  $10^6$  vegetativnih celic *Cl. perfringens*. Po zaužitju okužene hrane prično celice, ki uspešno preživijo kisle pogoje želodca in pridejo do tankega črevesa, sporulirati, kjer ob sočasnem prehodu iz vegetativne oblike v obliko spor nastajajo enterotoksi. Enterotoksin je protein, ki se veže na membranske receptorje na črevesnih resicah in povzroči prepustnost sluznice. Posledica tega je izguba nizkomolekularnih metabolitov in ionov (Gubina, 2002a; Radšel-Medvešček, 2002b). Tipični klinični znaki zastrupitve s *Cl. perfringens* se kažejo v obliki driske in trebušnih krčev, redkeje pa kot slabost, bruhanje in vročina.

### 2.3.3.3 Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih

V surovem mleku se količina klostridijev giblje med 10 in  $10^2$  spor v mililitru mleka. Ta koncentracija se lahko poveča na  $>10^3$  spor na mililiter mleka, če živali hranimo z močno onesnaženo hrano. Zastopanost posameznih vrst klostridijev je različna, prevladujejo pa

predvsem *Cl. perfringens*, *Cl. sporogenes*, *Cl. butyricum* in *Cl. tyrobutyricum*. Klostridiji, ki jih najdemo v mlečnih izdelkih (jogurt, sir, sladoled...), izvirajo predvsem iz surovine, torej mleka, ki ga uporablajo za predelavo v omenjene izdelke, vendar pa navadno ne presegajo  $10 - 10^2$  spor na gram izdelka (Aureli in sod., 2011).

#### **2.3.4 Vrsta *Bacillus cereus***

Rod *Bacillus*, kamor sodi tudi vrsta *Bacillus (B.) cereus*, sestavlja aerobni, po Gramu pozitivni, večinoma gibljivi, ubikvitarni paličasti bacili, ki tvorijo spore. So katalaza in oksidaza pozitivni. Imajo različne fiziološke lastnosti: nekateri so acidofilni, halotolerantni (lahko preživijo pri koncentracijah soli, ki so nižje od 10 %) ali halofilni (rastejo pri višjih koncentracijah soli). Večinoma ne povzročajo bolezni pri ljudeh in živalih. Medicinsko pomembne so le nekatere vrste, med njimi *B. cereus* (Gubina, 2002b; Adamič in sod., 2003). V živilski industriji se rod *Bacillus* pojavlja predvsem kot kontaminat, ki povzroča kvar živil in lahko pri ljudeh povzroči toksikoinfekcije.

##### **2.3.4.1 Morfološke in fiziološke značilnosti**

Vrsto *B. cereus* opisujemo kot mezofilne mikroorganizme s temperaturnim območjem razmnoževanja med 4 in 50 °C, a optimalno temperaturo med 35 in 40 °C. Vegetativne celice so občutljive za temperature pasterizacije, medtem ko spore lahko preživijo višje temperature. Za uspešno rast so pomembne tudi vrednost pH, ki naj ne bi bila nižja od 4,3 - 4,9 in višja od 9,3, vodna aktivnost z minimalno vrednostjo med 0,92 - 0,95 ter koncentracija natrijevega klorida, ki naj bi bila nižja od 10 % (Ray in Bhunia, 2008).

##### **2.3.4.2 Patogeneza**

Na splošno so bakterije rodu *Bacillus* v naravi zelo razširjene, saj jih najdemo v zemlji, vodi, rastlinah, v človeških in živalskih iztrebkih ter v surovinah živilih. Tako je vrsta *B. cereus* naravni kontaminant najrazličnejših živil, tudi mleka. V normalnih okoliščinah je *B. cereus* v živilih in surovinah, namenjenih za predelavo, prisoten v koncentracijah, nižjih od  $10^3$  KE na gram živila, kar se obravnava kot nepatogena oz. nezadostna količina za ogrožanje zdravja porabnika. Minimalna koncentracija *B. cereus* v živilu, ki povzroča zastrupitev, je od  $10^5 - 10^8$  KE na gram živila (Christiansson, 2011; ZZV Ljubljana, 2011).

*B. cereus* tvori različne enterotoksinne, od katerih je večina termolabilnih in jih inaktivira že 5-minutno segrevanje s temperaturami nad 60 °C, poleg tega pa so občutljivi tudi na delovanje proteaz in nizke vrednosti pH. Precej bolj nevaren pa je emetični toksin, ki je odporen na delovanje proteaz ter je termostabilen, saj je za njegovo uničenje potrebno segrevanje 90 minut pri temperaturi 126 °C. Prav zaradi tega je emetični toksin najpogostejši povzročitelj zastrupitev s hrano. Poleg enterotoksinov, proizvajajo bakterije vrste *B. cereus* tudi izvencelične encime, ki povzročajo kvar živil. Ti encimi so

proteolitični, saharolitični in lipolitični ter dodatno prispevajo k patogenezi vrste *B. cereus* (Christiansson, 2002; Radšel-Medvešček, 2002a).

Termolabilni toksini navadno povzročajo blažje in kratkotrajne zastrupitve, ki se navadno izražajo s prebavnimi motnjami (vodena driska, trebušni krči), saj večino zaužitega toksina inaktivirajo pogoji prebavnega trakta (nizka vrednost pH, delovanje proteaz). Nasprotno pa je zastrupitev z emetičnim toksinom precej bolj nevarna, saj po izredno kratki inkubacijski dobi (1/2 do 5 ur) pride do izdatnega bruhanja in slabosti, v redkih primerih celo do smrti. Emetični toksin deluje toksično na mitohondrije, kjer zavira presnovo maščob, medtem ko termolabilni enterotoksin deluje na celico v smislu biokemičnih sprememb v resorpciji vode in elektrolitov (Christiansson, 2002; Radšel-Medvešček, 2002a). Običajno do okužbe pride zaradi nezadostne toplotne obdelave hrane, zato se spore ne uničijo in se iz njih razvijejo vegetativni bacili, ki proizvajajo toksine (Gubina, 2002b). Infekcijska doza, ki izzove bolezen, je  $10^6$  do  $10^8$  celic na gram živila (Ray in Bhunia, 2008).

#### 2.3.4.3 Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih

V mililitru surovega mleka lahko najdemo od manj kot 10 pa do nekaj 100 vegetativnih celic *B. cereus*, ki pa jih uniči pasterizacija. Število spor pa je v surovem mleku precej nižje, od manj kot 10 pa do nekaj 1000 na liter (Christiansson, 2002).

### 2.3.5 Enterobakterije

#### 2.3.5.1 Zgradba in fiziološke značilnosti

Družina *Enterobacteriaceae* združuje številne morfološko in fiziološko sorodne bakterije. Med enterobakterijami najdemo najpogosteje kvarljivce hrane, patogene mikroorganizme ter indikatorje fekalnega okuženja živil. Čeprav so predstavniki rodov iz družine enterobakterij pogosti povzročitelji črevesnih infekcij, pa jih med naravnimi prebivalci najdemo v skoraj vseh ekoloških nišah. Med rodove enterobakterij, najpogosteje omenjane v povezavi z mlekom in mlečnimi izdelki, zagotovo sodijo *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Edwardsiella*, *Erwinia*, *Morganella* in *Providencia* (Anand in Griffiths, 2011).

Enterobakterije so po Gramu negativne, nesporotvorne, fakultativno anaerobne, gibljive paličice, med katerimi nekatere oblikujejo kapsulo. Ker nimajo citokrom oksidaze, jih označujemo kot oksidaza negativne, so pa katalaza pozitivne. Delujejo proteolitično in tvorijo žveplovodik. Razmnožujejo se v temperaturnem območju med 0 in 43 °C. Najnižja vrednost pH za razmnoževanje znaša 4,7, vrednost  $a_w$  pa 0,95 (Adamič in sod., 2003).

Enterobakterije najdemo v zemlji, zraku, na rastlinah, v človeških in živalskih iztrebkih, živilih, kosih svežega mesa... Povzročijo lahko okužbe dihal, ran, sečil in krvi (Adamič in sod., 2003).

### 2.3.5.2 Pogostnost v mleku in mlečnih izdelkih

Mleko se lahko s patogenimi bakterijami okuži na veliko načinov. Najpogosteji vir okužbe z enterobakterijami so fekalije. Na splošno je v živilih, tudi mleku in mlečnih izdelkih, prisotnost *Escherichia coli* in drugih enterobakterij pogosto kaže na fekalno onesnaženje, medtem ko ob njihovi odsotnosti govorimo o dobri higieni praksi (Anand in Griffiths, 2011).

### 2.3.6 Vrsta *Escherichia coli*

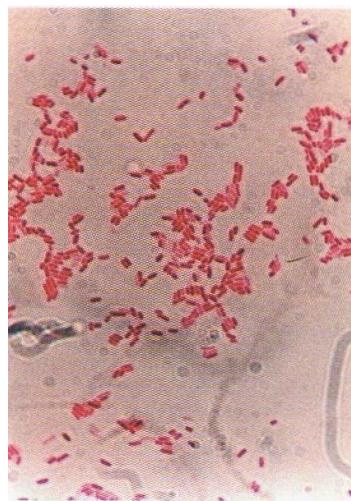
*E. coli* je predstavnica rodu enterobakterij. Rod *Escherichia* je dobil ime po nemškem znanstveniku Theodorju Escherichu, ki je leta 1885 prvi osamil bakterije, in jih je poimenoval *Bacterium coli commune*, ker so bile naravno prisotne v blatu vseh zdravih pacientov (Todar, 2011).

#### 2.3.6.1 Zgradba in fiziološke značilnosti

Predstavnice *E. coli* so po Gramu negativne in fakultativno anaerobne bakterije, ki ne tvorijo spor. V dolžino merijo 2 do 6  $\mu\text{m}$ , v širino pa 1 - 3  $\mu\text{m}$ , lahko so gibljive ali negibljive. V primeru gibljivosti se premikajo s pomočjo peritrahijalnih flagel. Bakterije so lahko obdane s kapsulo (Sušić in Tomić-Paradžik, 2009). Rastejo v temperaturnem območju med 10 °C in 46 °C, čeprav številni sevi rastejo tudi pri 4 °C. Optimalna vrednost pH za njihovo rast je 4,3, minimalna vrednost  $a_w$  pa znaša 0,96 do 0,93. (Adamič in sod., 2003).

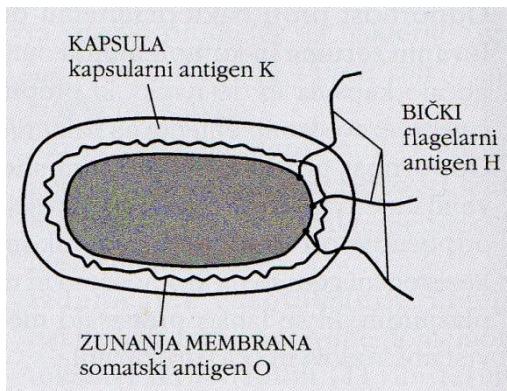
Fermentacija ogljikovih hidratov je glavni način, s katerim *E. coli* pride do potrebne energije. Bakterije te vrste vsebujejo številne encime za fermentacijo sladkorjev, ob tem pa se tvorijo organske kisline in CO<sub>2</sub>, kar zelo zakisa in znižuje vrednost pH gojišča. Ima encim katalazo, nima pa oksidaze. Večina serotipov razgrajuje laktozo, proizvaja indol iz triptofana, dekarboksira aminokislino lizin, ne izkorišča citrata kot izvor ogljika in nima encima ureaze (Sušić in Tomić-Paradžik, 2009).

Bakterije *E. coli* rastejo na običajnih ali selektivnih hraničnih gojiščih. Po inkubaciji zrastejo kolonije velike 2 do 3 milimetra v premeru, ki so okrogle, rahlo izbočene ter gladke in sijoče. Če imajo bakterije tudi kapsulo, so kolonije sluzaste (Sušić in Tomić-Paradžik, 2009).



Slika 5: Mikroskopski preparat bakterij *Escherichia coli* (barvano po Gramu, 1000x povečava) (Jeršek in Avbelj, 2003: 699)

Da bi lahko ločili nevirulentne seve od virulentnih, je Kauffman razvil shemo za serotipizacijo *E. coli*. Posamezne tipe lahko med seboj ločimo na osnovi antigenov O, K in H (Andlovic, 2002a). Antigen O je polisaharid na zunanjih ovojnici celic, antigen K so polisaharidi na kapsuli, antigen H pa so flagelarni polisaharidi, ki se nahajajo v bičkih (slika 4) (Adamič in sod., 2003).



Slika 6: Antagenska zgradba *Escherichia coli* (Andlovic, 2002a: 182)

### 2.3.6.2 Patogeneza in razširjenost

Bakterije *E. coli* so normalne prebivalke debelega črevesja pri ljudeh in živalih. Pomagajo pri prebavi, v črevesju ovirajo gnitje in igrajo pomembno vlogo pri nastajanju vitaminov K in B kompleksa. *E. coli* se v črevesju prekomerno namnožijo in postanejo za organizem patogene, kadar organizmu pade odpornost. Patogene seve *E. coli*, ki povzročajo okužbe prebavil, delimo v skupine na osnovi virulentnih lastnosti in izraženih kliničnih znakov. Tako na primer enteropatogene *E. coli* (EPEC) povzročajo akutni ali kronični enteritis pri otrocih v deželah v razvoju, ki se kaže z nastankom razjed na črevesni sluznici in izgubo elektrolitov. Skupina enterotoksigenih *E. coli* (ETEC) tvori toksine, ki najpogosteje

povzročajo drisko pri otrocih v deželah v razvoju in potovalne driske. Navadno gre za zmerno in kratko trajajočo vodeno drisko, ki včasih spominja na kolero. Enterohemoragična *E. coli* (EHEC) tvori toksine, ki so nevarni tako ljudem kot živalim. Pri ljudeh so infekcije lahko asimptomatske ali simptomatske, od blagih drisk, hemoragičnega kolitisa, do življenjsko nevarnega hemolitično uremičnega sindroma. Skupina enteroinvazivnih *E. coli* (EIEC) napadejo epitelne črevesne celice gostitelja, se tam razmnožujejo in povzročijo uničenje celic. Pojavnost bolezni, ki jo povzročajo enteroinvazivne *E. coli*, je na splošno nizka v razvitih državah (Desmarchelier in Fegan, 2011). Verotoksične *E. coli* (VTEC) povzročajo hude driske, verotoksin, ki ga ta skupina *E. coli* proizvaja, pa lahko povzroči odpoved ledvic, zmanjšanje izločanja urina, anemijo in nevrološke spremembe (VURS, 2010). Veterinarska uprava RS spremišča število okuženih primerov pri ljudeh, ki se okužijo z verotoksičnimi *E. coli*, število prijavljenih okužb je prikazano v preglednici 3.

*E. coli* se lahko prenaša posredno ali neposredno. Najpogosteje se okužimo z onesnaženimi živili in vodo. Možen je tudi neposredni prenos preko predmetov ali z dotiki okužene osebe. Živila, ki so največkrat izvor okužbe, so: nezadostno termično obdelani meso in mesni izdelki, surovo mleko in nepasterizirani mlečni izdelki, nepasterizirani sadni sokovi, surova zelenjava in onesnažena voda (ZZV Ravne, 2011).

Po navedbah VURS-a (2011) (preglednica 3) je bilo med leti 2005 in 2009 prijavljenih med 113 in 157 primerov okužb z bakterijo *Escherichia coli*, med katerimi je bilo od 3 do 12 primerov okužb s serotipom VTEC.

Preglednica 3: Število prijavljenih okužb z *E. coli* in verotoksinom VTEC v Sloveniji (VURS, 2011)

	2005	2006	2007	2008	2009
Okuženih z <i>E. coli</i>	117	121	117	113	157
Okužba s serotipom VTEC	3	3	4	7	12

### 2.3.6.3 Pogostnost *E. coli* v mleku in mlečnih izdelkih

Mleko se lahko okuži z omenjeno bakterijsko vrsto med molžo (če seski niso dobro očiščeni ali če ima žival mastitis), z okuženo vodo, krmo, steljo in molzno opremo. Prav tako so vir okužbe ljudje, ki s fekalijami izločajo *E. coli* in s slabo osebno higieno lahko okužijo mleko. Mlečni izdelki se najpogosteje kontaminirajo z že okuženim surovim mlekom, ki ga uporabljajo za predelavo v izdelke. Bakterije te vrste učinkovito uničimo s pasterizacijo (72 °C za 15 sekund) (Desmarchelier in Fegan, 2011).

### 2.3.7 Skupno število mikroorganizmov v mleku

Skupno število mikroorganizmov (SŠMO) v surovem mleku, med katerimi prevladujejo bakterije, se lahko giblje med  $<10^3$  KE/ml pri minimalni okužbi in  $>10^6$  KE/ml mleka ob močni okužbi. Rezultat SŠMO podamo kot število kolonijskih enot (KE) na mililiter mleka, ker standardna metoda ugotavljanja SŠMO (IDF standard 100B:1991) temelji na cepljenju mleka na hranilno podlago in štetje izraslih enot. Nizko število SŠMO v surovem mleku je znak dobre proizvodne prakse, medtem ko je visoko število mikroorganizmov (več kot  $10^5$  KE v mililitru mleka) znak slabe higiene pri proizvodnji mleka (Rogelj, 2003).

Odkupna cena kravjega mleka se oblikuje glede na vsebnost maščob, beljakovin, skupnega števila mikroorganizmov in števila somatskih celic. Mleko razdelimo glede na vsebnost SŠMO v štiri kakovostne razrede: E, 1., 2. in 3. kakovostni razred. Glede na kakovostni razred se izhodiščna odkupna cena mleka poveča oziroma zmanjša (preglednica 4) (Čanžek Majhenič in sod., 2008).

Preglednica 4: Razredi mikrobiološke kakovosti mleka (Čanžek Majhenič in sod., 2008: 10)

Kakovostni razred	SŠMO/ml	Izhodiščna cena
E (ekstra)	Do 50.000	+ 5 %
1	Od 50.001 do 100.000	0 %
2	Od 100.001 do 400.000	- 5 %
3	Od 400.001 di 800.000	- 15 %

SŠMO – skupno število mikroorganizmov

## 2.4 MLEKOMAT

Mlekomat je naprava, ki nam omogoča, da vsak dan kupimo sveže, surovo mleko. Prvi mlekomat so izdelali v Švici leta 1994, danes pa jih najdemo že v večini evropskih držav (Mlekomat, 2011).

Programska oprema in nadzorni sistem onemogočata, da bi iz mlekomata točili mleko, ki je starejše od 24 ur. V primeru, da lastnik mlekomata ne zamenja starega mleka s svežim, se delovanje mlekomata avtomatično ustavi. Na monitorju mlekomata lahko potrošnik preveri, kdaj je bilo pripeljano sveže mleko (Vsak dan sveže mleko, 2011).

Ko kmetovalec pripelje mleko, ga shrani v posodi za shranjevanje mleka, kjer mora biti konstantna temperatura 4 °C. Temperatura mleka v rezervoarju je vidna na monitorju, ki je nameščen na mlekomatu. Če pride do nenadzorovanega dviga temperature v komori, točenje mleka ni več mogoče. Lastnik mlekomata je o dogodku obveščen preko sporočila, ki ga prejme na svoj telefon (Mlekomat, 2011).

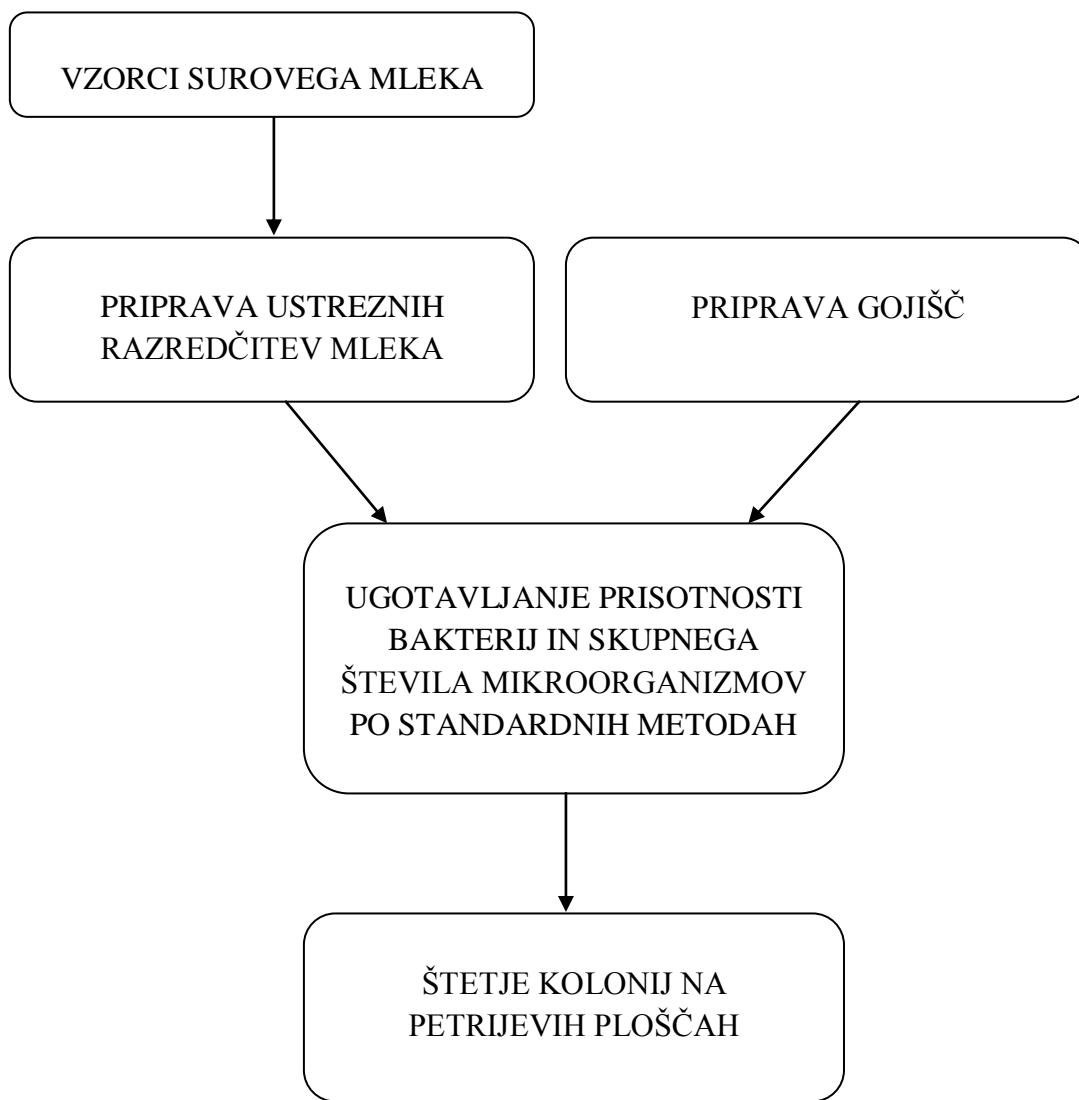
Mleko iz mlekomata lahko natočimo v svojo steklenico/plastenko ali pa v embalažo, ki jo kupimo na avtomatu za steklenice, ki se nahaja tik ob mlekomatu (Mlekomat, 2011). Na vsakem mlekomatu so zapisana navodila za rokovanje z napravo, ki nas vodijo skozi celoten postopek točenja (Vsak dan sveže mleko, 2011). Po končanem polnjenju odmaknemo steklenico iz točilne komore – le ta se nato samodejno zapre. Točilna komora se nato očisti in razkuži s pomočjo vodne pare ali UV svetilke, odvisno od vrste mlekomata. Lastnik je dolžan redno čistiti vse dele mlekomata, ki pridejo v stik z mlekom. Prav tako je lastnik odgovoren za zagotavljanje zdravstvene ustreznosti mleka in za vzdrževanje mlekomata (Mleko in mlekomati, 2011).

Nadzor nad mlekomati opravlja Veterinarska uprava Republike Slovenije. Pri nadzoru se preverja izpolnjevanje zahtev glede temperature mleka in higiene (čiščenje in nadzorovanje mlekomata), označevanje surovega mleka in mikrobiološka ustreznost živila. Inšpektorji nadzorujejo in preverjajo tudi kmetije, ki prodajajo mleko v mlekomatih. Kontrolirajo higieno pri molži, zbiranje in prevoz mleka, zdravstveno stanje živali, izpolnjevanje meril za surovo mleko ter skladnost z mikrobiološkimi predpisi (Mleko in mlekomati, 2011).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 NAČRT DELA

Načrt dela diplomske naloge je prikazan na sliki 7.



Slika 7: Shema dela

V diplomski nalogi smo analizirali 29 vzorcev surovega mleka, ki smo jih naključno vzorčili iz 29-ih mlekomatov po Sloveniji. Vzorčenje mleka je potekalo od novembra 2010 do februarja 2011.

V laboratoriju Inštituta za mlekarstvo in probiotike smo nato pri odvzetih vzorcih mleka opravili mikrobiološke analize, kjer smo poleg določanja skupnega števila mikroorganizmov, določali še morebitno prisotnost *Salmonella* sp., *Listeria*

*monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* ter skupno število koliformnih bakterij, enterobakterij in klostridijev.

Za mikrobiološke analize smo uporabili klasične metode štetja na petrijevih ploščah, ki smo jih izvedli po predpisanih standardnih protokolih.

### 3.2 MATERIAL

Mleko z mlekomatov smo vzorčili v obdobju od novembra 2010 do februarja 2011. Iz posameznega mlekomata smo vzorčili po 500 ml mleka, ki smo ga natočili neposredno v plastenko, kupljeno na avtomatu ob mlekomatu. Zaradi obvladljivega obsega dela smo naenkrat analizirali le od 3 do 5 vzorcev, pri čemer smo mleko iz mlekomata odvzeli ali zvečer in ga čez noč hranili pri temperaturi hladilnika, ali pa smo mleko odvzeli zjutraj, neposredno pred izvedbo analiz.

#### 3.2.1 Laboratorijska oprema

- čaše
- epruvete in pokrovčki za epruvete
- erlenmajerica
- eza
- hokejke
- magnetno mešalo
- merilni valj
- petrijeve plošče
- pinceta
- transfuzijske stekleničke s pokrovčki, različnih velikosti
- avtoklav
- gorilnik
- inkubatorji s temperaturo 30 °C, 37 °C in 47,5 °C
- mikrobiološka komora
- mehansko mešalo
- mikrovalovna pečica
- pH meter
- pipete
- plinski gorilnik
- števec kolonij
- tehtnica
- vodna kopel

### 3.2.2 Gojišča in raztopine za razredčevanje

#### 3.2.2.1 Ringerjeva raztopina ¼ jakosti

Za razredčevanje vzorcev mleka pri mikrobioloških analizah (metoda po Kochu) smo uporabljali ¼ Ringerjeve raztopine, ki smo jo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) s pomočjo Ringerjevih tablet (Merck, kat. št. 1.5525.0001). V 1000 ml destilirane vode smo raztopili 2 tabletki Ringer. Z magnetnim mešalom smo premešali, da sta se tabletki raztopili ter s pH metrom uravnali pH raztopine na vrednost 7,0. Po 9 ml Ringerjeve raztopine smo prelili v epruvete ter avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

#### 3.2.2.2 Gojišča za določanje prisotnosti *Salmonella* sp.

- Buffered peptone water (BWP) (Merck, 1.07228.0500)

Tekoče predobogatitveno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 38,25 g gojišča in dodali 1,5 litra destilirane vode. Gojišče smo zmešali s pomočjo magnetnega mešala, mu umerili vrednost pH na  $7,0 \pm 0,2$  in avtoklavirali 15 minut pri 121°C. V 250 ml velike sterilne stekleničke smo prelili po 225 ml gojišča.

- Selenite cystine enrichment broth (sel/cys) (Merck, 1.07709.500)

Tekoče obogatitveno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 11,5 g gojišča, ga raztopili v 500 ml destilirane vode, premešali z magnetnim mešalom in ga po 100 ml prelili v sterilne stekleničke. Gojišča ne avtoklaviramo in ga lahko tako pripravljenega takoj uporabimo. V primeru, da smo ga pripravili vnaprej, smo ga sterilizirali preko filtra.

- Rappaport-Vassiliadis Broth (RVS) (Merck, 1.07700.0500)

Obogatitveno tekoče gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. 27,0 g gojišča smo raztopili v 500 ml destilirane vode, mu uravnali vrednost pH na  $5,2 \pm 0,2$  ter ga prelili v epruvete po 10 ml. Tako pripravljeno gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

- Brilliant green Phenol-red Lactose Sucrose agar, modified (BPLS) (Merck, 1.10747.0500)

Trdno selektivno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 10,3 g gojišča, dodali 200 ml destilirane vode ter ga do popolne raztopitve segrevali v mikrovalovni pečici. Primerno ohlajenemu smo nato uravnali vrednost pH na  $6,9 \pm 0,2$  ter ga razlili v petrijeve plošče.

- Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (Merck, 1.05287.0500)

Diferencialno trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 11,0 g gojišča in dodali 200 ml destilirane vode. Zmes smo segrevali v mikrovalovni pečici do

popolne raztopitve agarja. Raztopljenemu gojišču smo uravnali vrednost pH na  $7,4 \pm 0,2$  ter ga razlili v pretijeve plošče.

- Rambach agar (Merck, 1.07500.0002)

Diferencialno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 7,62 g gojišča, mu dodali 2,5 ml Rambach agar suplementa (Merck, 1.07500.0002) in mešanici dodali 250 ml destilirane vode. Gojišče smo raztopljalili v mikrovalovni pečici in še vročega prelili v petrijeve plošče.

### 3.2.2.3 Gojišča za določanje prisotnosti *Listeria monocytogenes*

- Frasher listeria selective enrichment broth (base) (Merck, 1.10398.0500)
  - half-concentrated Fraser broth (HF)

Tekoče predobogatitveno gojišče HF smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 27,5 g osnovnega gojišča, mu dodali 500 ml destilirane vode, premešali z magnetnim mešalom, uravnali vrednost pH na  $7,2 \pm 0,2$  ter avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 °C. Pred uporabo smo v 500 ml tako pripravljenega gojišča dodali v 1 ml destilirane vode raztopljeno vsebino 1 stekleničke Fraser ammonium iron (III) supplement (Merck, 1.00092.0010) ter v 1 ml destilirane vode raztopljeno vsebino stekleničke Frasher Listeria selective supplement (Merck, 1.00093.0010). Po 225 ml tako pripravljenega gojišča HF smo prelili v 250 ml sterilne stekleničke.

- Fraser broth (F)

Tekoče obogatitveno gojišče F smo pripravili po navodilih proizvajalca in sicer tako, da smo odtehtali 27,4 g gojišča, ga raztopili v 500 ml destilirane vode, uravnali pH na vrednost  $7,2 \pm 0,2$  ter avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Pred uporabo smo v gojišče dodali vsebino 1 stekleničke Fraser ammonium iron (III) supplement (Merck, 1.00092.0010) ter vsebino 2 stekleničk Frasher Listeria selective supplement (Merck, 1.00093.0010). Po 10 ml tako pripravljenega gojišča F smo v aseptičnih pogojih prelili v sterilne epruvete.

- Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti (ALOA) (Biolife, 401605, Italija)

Trdno selektivno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. V 250 ml destilirane vode smo raztopili 17,68 g gojišča in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. V primerno ohlajeno gojišče (okoli 47,5 °C) smo dodali polovico (10 ml) vsebine stekleničke ALOA Enrichment supplement (Biolife, 423501) ter 2,5 ml ALOA Selective supplement (Biolife, 423501), ki smo ga pripravili tako, da smo vsebino 1 stekleničke selektivnega suplementa raztopili s 5 ml mešanice etanola in sterilne destilirane vode v razmerju 1:1. Gojišče smo premešali in prelili v petrijeve plošče.

- Oxford Listeria Selective agar (Oxford) (Merck, 1.07004.0500)

Selektivno trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. 14,63 g gojišča smo raztopili v 250 ml destilirane vode in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. V tako pripravljeno gojišče smo pred uporabo dodali 2,5 ml Oxford Listeria Selective supplement (Merck 1.07006.0001), ki smo ga pripravili tako, da smo vsebino 1 stekleničke suplementa raztopili v 5 ml mešanice etanola in sterilne destilirane vode v razmerju 1:1. Gojišče smo premešali in prelili v petrijeve plošče.

#### 3.2.2.4 Gojišča za določanje prisotnosti sulfit reducirajočih klostridijev

- Perfringens Selective agar acc. to Angelotti (SPS agar) ( Merck, 1.10235.0500)

Selektivno trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 8 g gojišča in ga raztopili v 200 ml destilirane vode. Gojišče smo premešali in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C).

#### 3.2.2.5 Gojišča za določanje prisotnosti *Bacillus cereus*

- Cereus Selective agar base acc. to Mossel (MYP agar), (Merck, 1.05267.0500)

Selektivno trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. V 225 ml destilirane vode smo raztopili 10,75 g gojišča in ga avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Primerno ohljenemu smo dodali 25 ml Egg Yolk Emulsion 50 % (Biolife, 42111601) in polovico vsebine stekleničke (0,5 ml) *Bacillus Cereus* Selective Supplement (Merck, 1.09875.0001), premešali ter prelili v petrijeve plošče.

#### 3.2.2.6 Gojišča za določanje prisotnosti enterobakterij

- Violet red bile dextrose agar acc. to Mossel (VRBD) (Merck, 1.10275.0500)

Selektivno trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. 7,9 g gojišča smo raztopili v 200 ml destilirane vode. Gojišče smo v mikrovalovni pečici segrevali do popolne raztopitve, ga ohladili in ga prelili v petrijeve plošče.

#### 3.2.2.7 Gojišča za določanje prisotnosti skupnih koliformnih bakterij in *Escherichia coli*

- Chromocult® coliform Agar (Merck, 1.10426.0500)

Selektivno trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. 5,3 g gojišča smo raztopili v 200 ml destilirane vode. Gojišče smo v mikrovalovni pečici segrevali do popolne raztopitve, ga ohladili in prelili v petrijeve plošče.

### 3.2.2.8 Gojišča za določanje skupnega števila mikroorganizmov

- Plate count agar (PCA), (Merck, 1.05463.0500)

Trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Odtehtali smo 4,5 g gojišča in 0,2 g mleka v prahu ter zmes raztopili v 200 ml destilirane vode. Nato smo gojišče avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 °C.

### 3.2.2.9 Reagenti za barvanje po Gramu

Za barvanje po Gramu smo uporabili komplet Color Gram 2 (BioMerieux, Francija), ki vsebuje naslednje reagente:

- Barvilo kristal vijolično,
- Lugol,
- Mešanica etanola in acetona (1:1),
- Barvilo safranin.

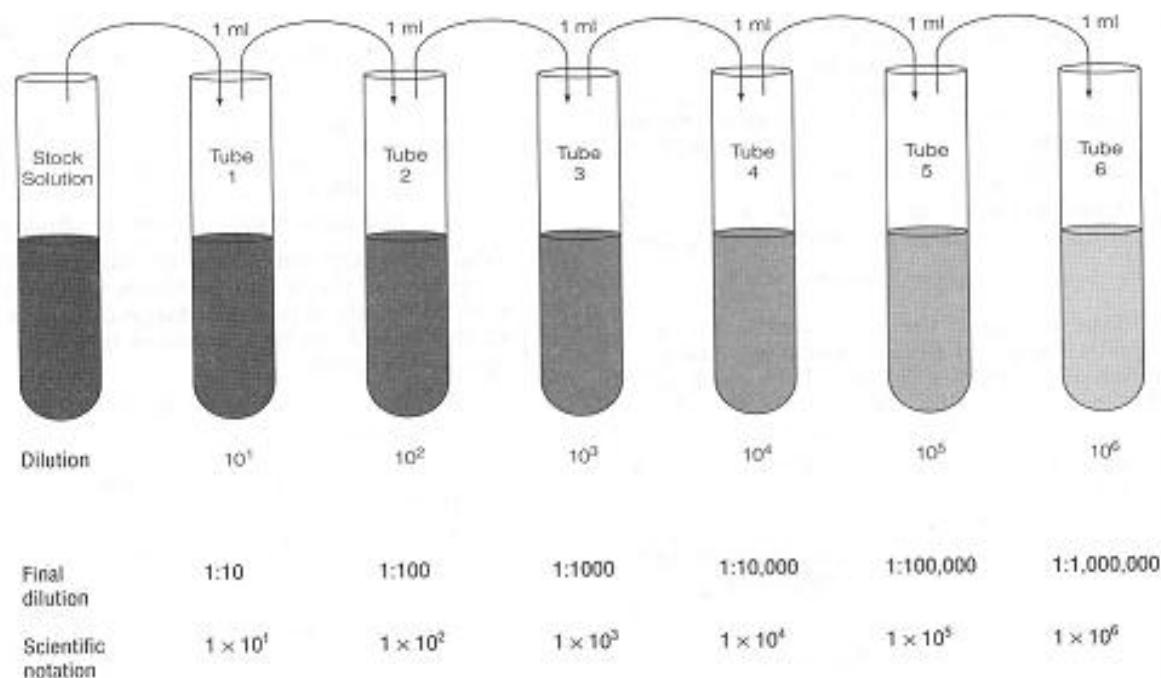
### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Priprava zaporednih decimalnih razredčitev vzorcev mleka

Vse mikrobiološke analize vzorcev mleka iz mlekomatov smo izvajali v aseptičnih pogojih, zaporedne decimalne razredčitve vzorcev mleka po Kochu pa smo pripravili skladno s standardom IDF Standard 122B (1992).

Vzorce mleka smo najprej dobro, a previdno premešali, da ni prišlo do penjenja. S sterilno pipeto smo odpipetirali 1 ml mleka in ga prenesli v epruveto z 9 ml  $\frac{1}{4}$  Ringerjeve raztopine. Dobljeno razredčitev  $10^{-1}$  smo nato mešali na mehanskem mešalniku približno 10 sekund ter nato iz nje z novo sterilno pipeto odpipetirali 1 ml vzorca in ga prenesli v novo epruveto z 9 ml  $\frac{1}{4}$  Ringerjeve raztopine. Dobili smo razredčitev  $10^{-2}$ . Postopek smo ponavljali do želene razredčitve  $10^{-4}$  (Cappuccino in Sherman, 2005).

Na sliki 8 je predstavljen shematski prikaz priprave zaporednih decimalnih razredčitev vzorcev mleka.



Slika 8: Decimalna razredčitev (Cappuccino in Sherman, 2005: 508)

### 3.3.2 Metode določanja prisotnosti *Salmonella* sp.

Določanje prisotnosti *Salmonella* sp. v surovih vzorcih mleka iz mlekomatov smo izvedli skladno z navodili standarda ISO 6785 (2001). Shema poteka dela je prikazana na sliki 9.

Prvi dan:

Vzorec mleka smo najprej premešali, ga aseptično odpipetirali 25 ml in prenesli v 225 ml predhodno pripravljenega predobogatitvenega tekočega gojišče BPW. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali pri 37 °C / 16-20 h.

Drugi dan:

Po inkubaciji smo iz predobogatitvenega gojišča BPW s pipeto prenesli po 100 µl vzorcev v epruvete z 10 ml obogatitvenega gojišča RVS oz. po 10 ml vzorcev v stekleničke s 100 ml obogatitvenega gojišča sel/cys. Cepljeni gojišči smo inkubirali 18-24 h, in sicer RVS pri 41,5 °C in sel/cys pri 37 °C.

Tretji dan:

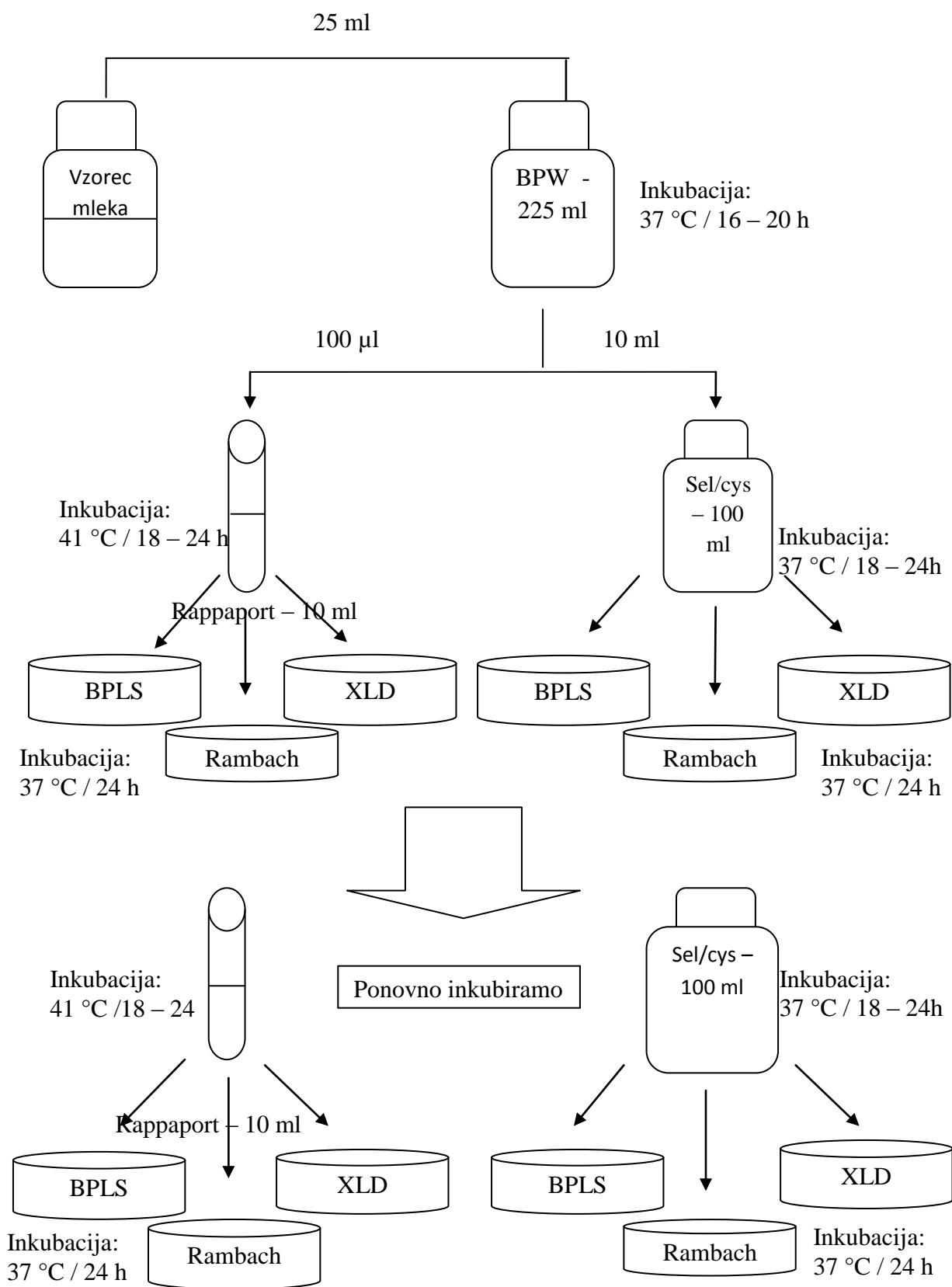
Iz obogatitvenih gojišč RVS in sel/cys smo odpipetirali po 100 µl vzorcev in jih s pomočjo sterilnih hokejk razmazali na selektivna trdna gojišča BPLS, XLD in Rambach. Tako cepljena gojišča smo inkubirali 24 h pri temperaturi 37 °C. Poleg tega smo nadaljevali z inkubacijo že cepljenih tekočih gojišč RVS in sel/cys pri pogojih, opisanih pod drugi dan.

Četrти dan:

Po nadaljnji inkubaciji smo iz obogatitvenih gojišč RVS in sel/cys ponovno odpipetirali po 100 µl in jih s pomočjo sterilnih hokejk ponovno razmazali na selektivna trdna gojišča BPLS, XLD in Rambach ter jih inkubirali 24 h pri temperaturi 37 °C. Presteli pa smo tudi vse, za *Salmonella* sp. značilne kolonije, ki so po inkubaciji zrasle na gojiščih BPLS, XLD in Rambach, ki smo jih cepili tretji dan.

Peti dan:

Po končani inkubaciji smo presteli vse, za *Salmonella* sp. značilne kolonije, ki so po cepljenju četrti dan in inkubaciji zrasle na gojiščih BPLS, XLD in Rambach,,

Slika 9: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti *Salmonella* sp.

- Opis za *Salmonella* sp. značilnih kolonij, izraslih na trdnem gojišču:

BPLS: kolonije so rdeče do roza barve, obkrožene s svetlo rdečo cono

XLD: kolonije so rdeče barve, prosojne in črne v sredini

Rambach: kolonije so rdeče barve

### **3.3.3 Metode določanja prisotnosti *Listeria monocytogenes***

Določanje prisotnosti *Listeria monocytogenes* v surovih vzorcih mleka iz mlekomatov smo izvedli skladno z navodili standarda ISO 11290-1 (1996). Shema poteka dela je prikazana na sliki 10.

Prvi dan:

25 ml premešanega in aseptično odpipetiranega mleka smo prenesli v 225 ml predhodno pripravljenega predobogatitvenega tekočega gojišča HF. Cepljeno gojišče smo inkubirali pri 30 °C / 24 h.

Drugi dan:

Po inkubaciji smo iz predobogatitvenega gojišča HF s sterilno pipeto prenesli po 100 µl vzorcev v epruvete z 10 ml obogatitvenega tekočega gojišča F in inkubirali 48 h pri 37 °C. Prav tako smo iz gojišča HF s sterilnimi plastičnimi ezami naredili razmaz na selektivni trdi gojišči Oxford in ALOA ter inkubirali pri 37 °C / 24 h.

Tretji dan:

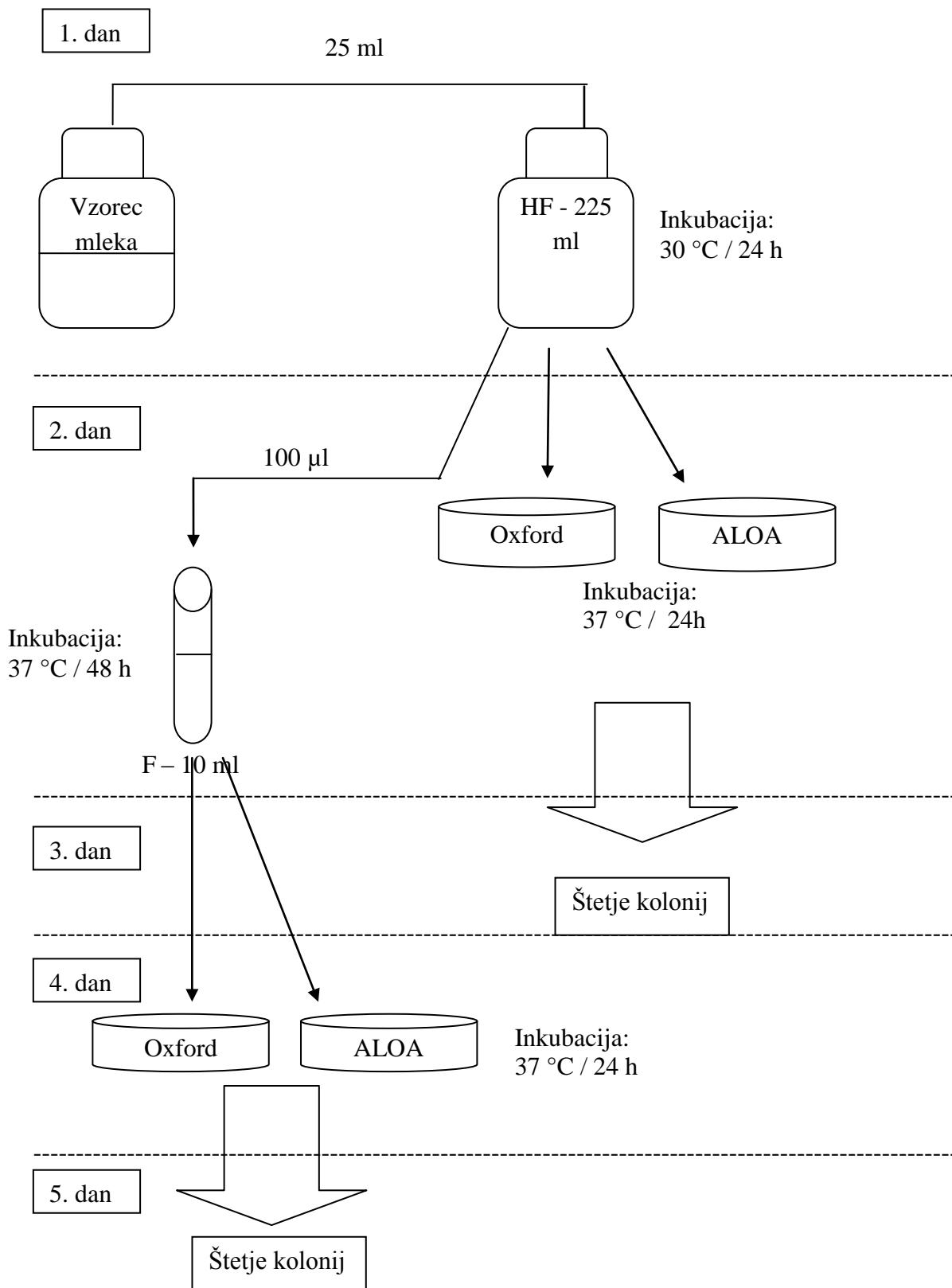
Štetje za *L. monocytogenes* značilnih kolonij, ki so po inkubaciji zrasle na gojiščih Oxford in ALOA, cepljenih iz tekočega gojišča HF.

Četrти dan:

Po inkubaciji smo iz obogatitvenega tekočega gojišča F s sterilnimi ezami prenesli vzorec na selektivni trdni gojišči Oxford in ALOA. Cepljene plošče smo inkubirali pri 37 °C / 24 h.

Peti dan:

Štetje za *L. monocytogenes* značilnih kolonij, ki so po inkubaciji zrasle na gojiščih Oxford in ALOA, cepljenih iz tekočega gojišča F.

Slika 10: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti *Listeria monocytogenes*

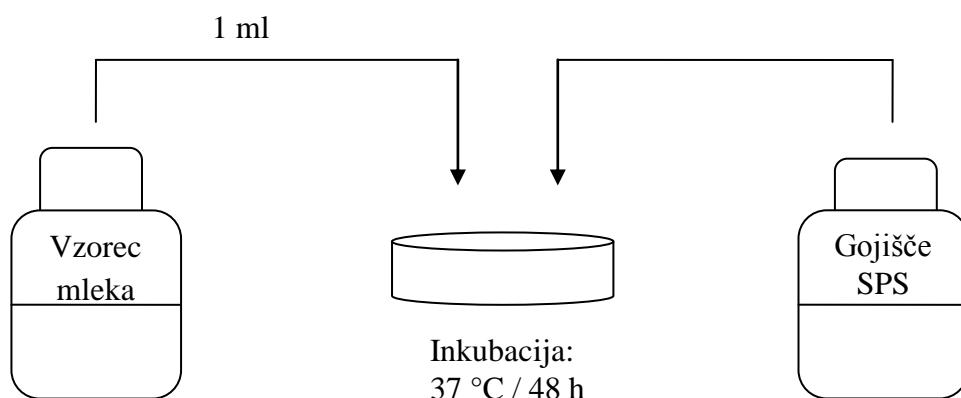
- Opis za *L. monocytogenes* značilnih kolonij, izraslih na trdnem gojišču:

Oxford: kolonije so rjavo zelene barve, obdane s črno cono

ALOA: kolonije so zeleno modre barve, obdane z neprosojno cono

### 3.3.4 Metode določanja prisotnosti sulfit reducirajočih klostridiiev

Vzorec mleka smo premešali, prenesli 1 ml vzorca v petrijeve plošče in prelili z raztopljenim in primerno ohlajenim (okoli 45 °C) trdnim gojiščem SPS. Z nežnimi krožnimi gibi smo vzorec mleka vmešali v gojišče, počakali da se strdi in plošče inkubirali v anaerobnih pogojih 48 h pri temperaturi 37 °C (slika 11). Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle črne kolonije, značilne za sulfit reducirajoče klostridije.

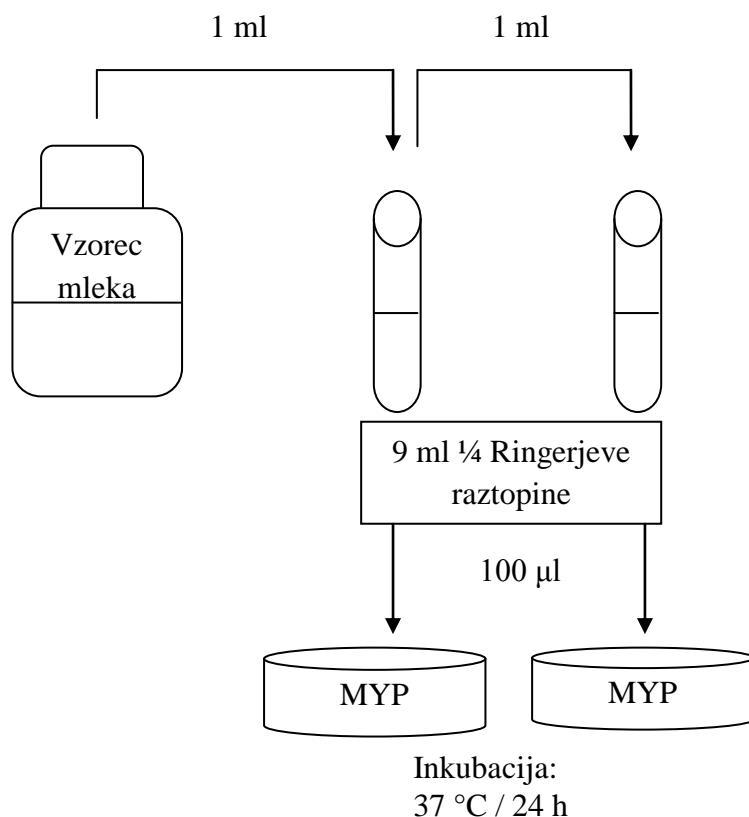


Slika 11: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti sulfit reducirajočih klostridiiev

### 3.3.5 Metode določanja prisotnosti *Bacillus cereus*

Določanje prisotnosti *Bacillus cereus* v surovih vzorcih mleka iz mlekomatov smo izvedli skladno z navodili standarda ISO 7932 (2004). Shema poteka dela je prikazana na sliki 12.

Vzorec mleka smo premešali in pripravili zaporedne decimalne razredčitve (3.3.1). Po 100 µl primernih razredčitev smo prenesli in s sterilnimi hokejkami razmazali po selektivnem trdnem gojišču MYP. Cepljeno gojišče smo inkubirali 24 h pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli za *B. cereus* značilne kolonije, ki so nepravilne oblike, suhe površine, roza do škrlatne barve, obdane z gosto precipitacijsko cono.



Slika 12: Shematski prikaz dela za določanje prisotnosti *Bacillus cereus*

### 3.3.6 Metode določanja prisotnosti enterobakterij

Določanje prisotnosti enterobakterij v surovih vzorcih mleka iz mlekomatov smo izvedli skladno z navodili standarda ISO 21528-2 (2004).

Za ugotavljanje prisotnosti enterobakterij smo uporabili trdno gojišče VRBD. Vzorec mleka smo najprej decimalno razredčili (3.3.1), prenesli po 1 ml primernih razredčitev na petrijevo ploščo in prelili z raztopljenim in primerno ohlajenim (okoli 45 °C) trdnim gojiščem VRBD. Z nežnimi krožnimi gibi smo vzorec mleka vmešali v gojišče in počakali, da se strdi. Že strjeno gojišče smo še dodatno prelili z gojiščem VRBD, da smo ustvarili anaerobne pogoje. Petrijeve plošče smo dali v inkubator za 24 h na temperaturo 37 °C. Po končani inkubaciji smo prešteli kolonije, značilne za enterobakterije, ki so rdeče barve in obdane s rdečkasto precipitacijsko cono.

### **3.3.7 Metode za določanje prisotnosti skupnih koliformnih bakterij in *Escherichia coli***

Za določanje skupnih koliformnih bakterij in *Escherichia coli*, smo uporabili trdno gojišče Chromocult® coliform Agar. Vzorce mleka smo premešali in pripravili zaporedne decimalne razredčitve (3.3.1). Po 1 ml ustreznih razredčitev smo prenesli na petrijeve plošče, prelimi z raztopljenim in primerno ohlajenim (okoli 45 °C) trdnim gojiščem Chromocult® coliform agar in inkubirali 24 h pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo prešteli vse kolonije, izrasle na gojišču Chromocult® coliform Agar, kjer se skupne koliformne bakterije obarvajo rožnato do rdeče in *E.coli* temno modro do vijolično barve.

### **3.3.8 Metoda določanja skupnega števila mikroorganizmov**

Določanje skupnega števila mikroorganizmov v surovih vzorcih mleka iz mlekomatov smo izvedli skladno z navodili standarda ISO 4833 (2003).

Vzorec mleka smo premešali in pripravili zaporedne decimalne razredčitve (3.3.1). Iz primernih razredčitev smo odpipetirali po 1 ml vzorca, ga prenesli v petrijevo ploščo in prelimi z raztopljenim in primerno ohlajenim (okoli 45 °C) trdnim gojiščem PCA. Z nežnimi krožnimi gibi smo vzorec mleka vmešali v gojišče, počakali da se strdi in plošče inkubirali 72 h pri temperaturi 30 °C. Po 72 urah smo prešteli vse kolonije, ki so zrasle na gojišču.

### **3.3.9 Izračun števila kolonijskih enot**

Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo naprave za štetje kolonij. Število kolonij smo ugotavljali po postopku, opisanemu v standardu IDF 100B (1991). Števne so tiste petrijeve plošče, na katerih je zraslo med 10 in 300 kolonij. Število kolonijskih enot v ml mleka smo izračunamo po enačbi:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1 * n_2) d} \quad \dots(1)$$

$\Sigma C$  – seštevek vseh kolonij na vseh petrijevih ploščah

$n_1$  – število kolonij pri prvi razredčitvi

$n_2$  – število kolonij druge razredčitve

$d$  – faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi

$N$  – število mikroorganizmov v KE/ml

Na petrijevkah, kjer je zraslo manj kot 10 kolonij, smo v rezultat napisali manj kot 10 kolonijskih enot na mililiter mleka.

### 3.3.10 Morfološka analiza z barvanjem po Gramu

Z metodo barvanja po Gramu smo pod mikroskopom preverjali morfološke lastnosti bakterij, osamljenih s selektivnih gojišč.

Potek fiksacije in barvanje po Gramu:

- Na objektno stekelce smo nanesli kapljico fiziološke raztopine za pripravo mokrega preparata.
- Ob gorilniku smo na objektno stekelce s cepilno zanko v fiziološko raztopino vmešali bakterijsko kolonijo izraslo na gojišču s tehniko razmaza.
- Razmaz smo posušili na zraku ob gorilniku.
- Preparat smo fiksirali tako, da smo objektno stekelce petkrat hitro potegnili skozi plamen na gorilniku.
- Barvanje po Gramu smo izvedli po navodilih proizvajalca BioMerieux (Francija):
  - Na fiksiran preparat smo nanesli barvilo kristal vijolično, ki smo ga po 1 minuti pazljivo sprali pod tekočo vodo.
  - Na preparat smo nato nanesli lugol, ki smo ga prav tako sprali po 1 minuti.
  - Preparat smo razbarvali z mešanico alkohola in acetona (1:1).
  - Preparat smo sprali pod tekočo vodo.
  - Na preparat smo nanesli še safranin, ki smo ga po 1 minuti sprali pod tekočo vodo.
  - Preparat smo pazljivo osušili s papirnato brisačko.
  - Na preparat smo pred mikroskopiranjem nanesli kapljico imerzijskega olja.

Pri po Gramu pozitivnih bakterijah, se ob dodatku alkohola celična stena skrči in barvilo se ne mora sprati s celice (celice soobarvane). Na preparatu vidimo modro-vijolično obarvane bakterije. Pri po Gramu negativnih bakterijah pa celična stena postane porozna in v alkoholu topno barvilo se spere iz celice, bakterije se obarvajo rdeče (celice so razbarvane) (Godič Torkar, 2006).

### 3.3.11 Oksidazni test

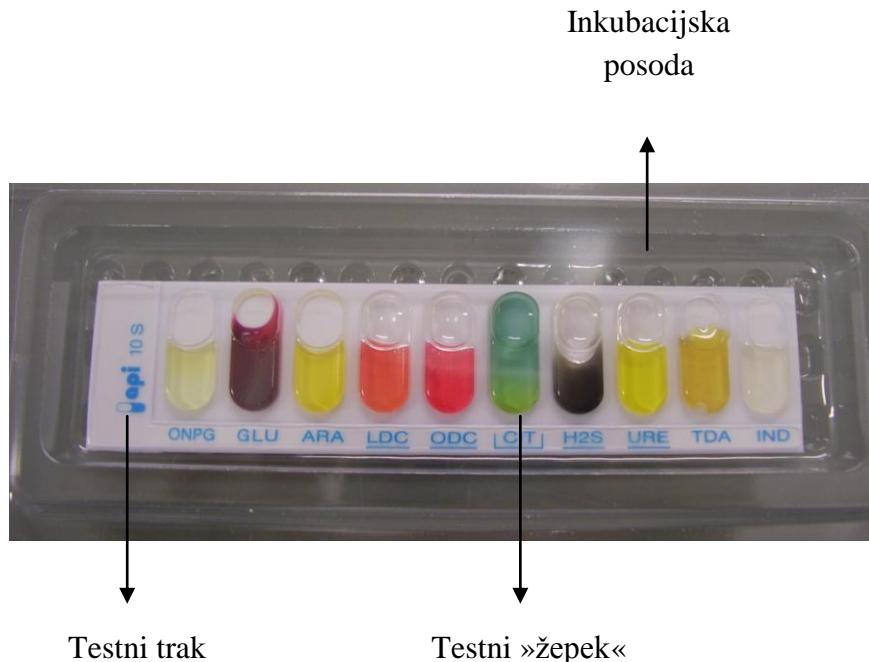
Z oksidaznim testom (Merck, 1.13300.0001) ugotavljamo prisotnost okidaznega encima. Na filter papir smo kapnili nekaj kapljic oksidaznega reagenta ter s sterilno plastično ezo prenesli bakterijsko kolonijo na testni filter papir. Po približno eni minuti se trak obarva modro do modro-vijolično, če je bakterija oksidaza pozitivna ozziroma rumeno, če je bakterija oksidaza negativna.

### 3.3.12 API 10 S test

API 10 S je standardni identifikacijski sistem za določitev vrst bakterij iz družine *Enterobacteriaceae* in drugih po Gramu negativnih bakterij. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca (BioMerieux, 10.100, Francija).

Za izvedbo testa smo uporabili posebno inkubacijsko posodo (slika 13), v katero smo odpipetirali 3 ml destilirane vode, da smo ustvarili vlažne pogoje, nato pa smo vanjo vložili testni trak. S sterilno plastično ezo smo prenesli zraslo kolonijo v predhodno pripravljeno epruveto s 5 ml destilirane vode in premešali z električnim mešalnikom. S pripravljeno mešanico smo s pipeto previdno napolnili testne »žepeke« na traku, pri tem pa pazili, da vmes ni prišel zrak. V testni »žepek«, kjer je pisalo LDC, ODC, H<sub>2</sub>S in URE, smo kanili kapljico mineralnega olja, da smo ustvarili anaerobne pogoje. Inkubacijsko posodico smo pokrili in inkubirali 18 – 24 h pri 37 °C.

Po končani inkubaciji smo v »žepek« z oznako TDA dodali kapljico TDA reagenta, v »žepek« z oznako IND smo dodali reagent James, v »žepek« z oznako GLU pa smo uporabili reagenta NIT 1 in NIT 2. Za vsak posamezni test smo odčitali rezultat (pozitiven oziroma negativen) in jih vnesli v računalniški program, ki nam je nato podal rezultate testa.



Slika 13: Primer inkubacijske posode (foto: N. Novak, 2011)

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE PRISOTNOSTI *Salmonella* sp.

Vzorec mleka (25 ml) smo prenesli v predobogatitveno tekoče gojišče BPW in ga inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C. Po 24 urah smo iz predobogatitvenega gojišča odpipetirali 100 µl oz. 10 ml mleka in ga prenesli v tekoči obogatitveni gojišči RVS oz. sel/cys.

Določanje bakterij iz rodu *Salmonella* smo nadaljevali z uporabo selektivnih trdnih gojišč BPLS, XLD in Rambach, na katere smo, po predpisanih pogojih inkubacije, prenesli vzorce iz obeh tekočih obogatitvenih gojišč.

Na trdnem gojišču BPLS smo poiskali za *Salmonella* sp. značilne kolonije, ki se obarvajo roza, okoli njih pa je rahla rdeča cona. Na trdnem gojišču XLD so značilne kolonije rdeče barve, pri katerih je center pogosto obarvan črno, medtem ko so značilne kolonije, ki se razvijejo na selektivnem trdnem gojišču Rambach, svetlo rdeče barve.

Ugotovili smo, da na selektivnih trdnih gojiščih BPLS in XLD pri nobenem od analiziranih vzorcev mleka ni zrasla nobena, za rod *Salmonella* značilna kolonija. Na selektivnem trdnem gojišču Rambach pa smo pri dveh vzorcih mleka ugotovili izrast kolonij, ki bi po izgledu lahko pripadale bakterijam rodu *Salmonella*. Sumljive kolonije iz obeh vzorcev smo podvrgli oksidaznemu testu, rezultati so bili negativni, kar bi lahko pomenilo, da bakterije pripadajo rodu *Salmonella*. Ko smo za nadaljnjo identifikacijo sumljivih bakterij naredili še test API 10 S, smo ugotovili, da pri enem vzorcu mleka izrasle bakterije ne pripadajo rodu *Salmonella* (slika 14), medtem ko lahko pri drugem vzorcu mleka (slika 15) s 95 % verjetnostjo zaključili, da so na gojišču izrasle bakterije, ki pripadajo vrsti *Salmonella enterica* subsp. *arizona*. Ta vzorec bi bilo potrebno poslati še na nadaljnje serološke teste, s katerimi bi dokončno potrdili ali ovrgli naš sum.



Slika 14: Api 10 S test, ki je negativen za *Salmonella* sp. (foto: N. Novak, 2011)



Slika 15: Api 10 S test, ki je pozitiven na *Salmonella enterica* subsp. *arizona* (foto: N. Novak, 2011)

Inštitut za varovanje zdravja je v sodelovanju z Zvezo potrošnikov Slovenije pripravil mikrobiološke smernice (Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku, 2009) po katerih velja, da v 25 ml surovega mleka, ki je namenjeno za uživanje brez predhodne topotne, ne sme biti prisotna bakterija *Salmonella sp.*

#### 4.2 DOLOČANJE PRISOTNOSTI *Listeria monocytogenes*

Za določanje prisotnosti *Listeria monocytogenes* smo uporabili selektivni trdnji gojišči ALOA in Oxford, na kateri smo po predpisanih postopkih ustreznega standarda cepili vzorce mleka, ki smo jih predhodno inkubirali v predobogativem HF oz. obogativem F tekočem gojišču. Po 24 in 48 h inkubacije smo na gojiščih opazovali prisotnost kolonij, značilnih za *L. monocytogenes*.

Na selektivnem trdnjem gojišču ALOA so za *L. monocytogenes* značilne kolonije zeleno modre barve, obdane z motno cono, medtem ko so kolonije, značilne za *L. monocytogenes*, na gojišču Oxford rjavo zelene barve, obdane s črno cono.

Izkazalo se je, da na selektivnem trdnjem gojišču ALOA pri nobenem od 29-ih analiziranih vzorcev mleka ni zrasla nobena, za vrsto *L. monocytogenes* značilna kolonija. Na trdnjem gojišču Oxford pa smo pri štirih vzorcih mleka določili prisotnost bakterij, ki so po izgledu spominjale na *L. monocytogenes*. Rezultate smo preverili tako, da smo sumljive kolonije osamili s trdnega gojišča Oxford in jih pobarvali po Gramu. Bakterije so se obarvale modro, kar pomeni, da gre za po Gramu pozitivne bakterije, zato smo kolonije pogledali še pod mikroskopom. Pri tem smo ugotovili, da so sumljive bakterije po obliki koki, zato smo izključili možnost, da bi sumljive kolonije pripadale *L. monocytogenes*.

Tudi za *L. monocytogenes* velja popolna odsotnost v 25 ml vzorca surovega mleka, ki je namenjeno za uživanje brez predhodne toplotne obdelave (Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku, 2009).

#### 4.3 DOLOČANJE PRISOTNOSTI SULFIT REDUCIRajočIH KLOSTRIDIJEV

Za določanje prisotnosti sulfit reducirajočih klostridijev smo uporabili selektivno trdno gojišče SPS. Vzorce mleka smo vmešali v gojišče in jih v anaerobnih pogojih inkubirali 48 h pri 37 °C.

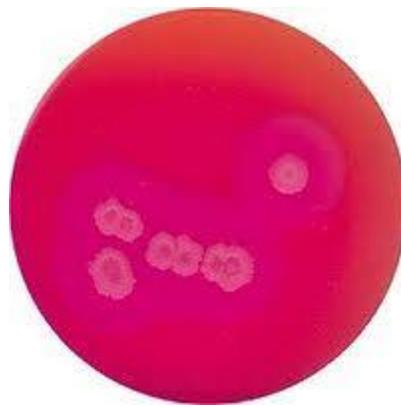
Gojišče SPS vsebuje veliko količino hranil, med drugim tudi sulfit, katerega večina klostridijev reducira do sulfata. Ta reagira z železovim citratom, ki izrasle kolonije sulfit reducirajočih klostridijevobarva značilno črno (Nahberger Marčič, 2007).

V nobenem od preiskovanih vzorcev mleka z omenjeno metodo nismo potrdili prisotnosti sulfit reducirajočih klostridijev.

Po priporočilih Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije, naj bi bilo v 1 ml surovega mleka, ki je namenjeno za uživanje brez predhodne toplotne obdelave,  $\leq 10$  KE sulfit reducirajočih klostridijev (Smernice za mikrobiološko..., 2009).

#### 4.4 DOLOČANJE PRISOTNOSTI *Bacillus cereus*

Prisotnost bakterij vrste *Bacillus cereus* smo določali na trdnem gojišču MYP. Zaporedno decimalno razredčene vzorce mleka smo razmazali na trdno gojišče in inkubirali. Po končani inkubaciji smo odčitali rezultate. Kolonije, značilne za *Bacillus cereus*, ki zrastejo na omenjenem gojišču, so roza do vijolične barve in obdane s cono (slika 16).



Slika 16: Značilne kolonije za *Bacillus cereus*, izrasle na trdnem gojišču MYP (Microbiology Manual, 2005)

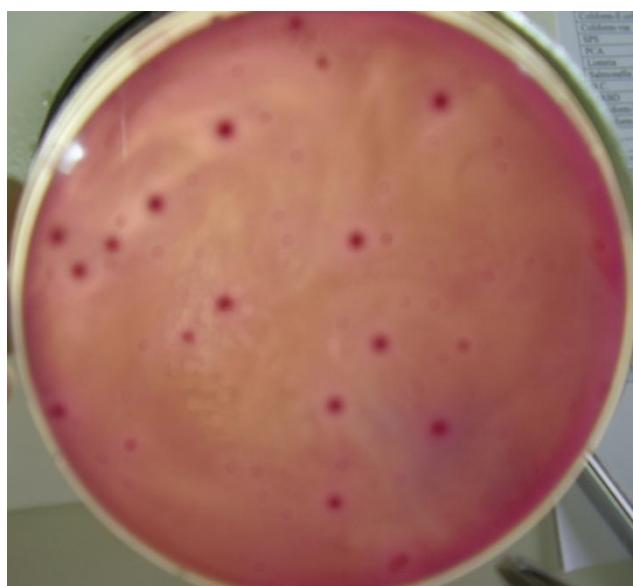
Pri vseh analiziranih vzorcih mleka so bili rezultati na prisotnost za *Bacillus cereus* značilnih kolonij negativni. Po smernicah za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjena

končnemu potrošniku (2009) je lahko v 1 ml surovega mleka, ki je namenjeno za uživanje brez predhodne toplotne obdelave  $\leq 10^3$  KE *Bacillus cereus*.

#### 4.5 DOLOČANJE PRISOTNOSTI ENTEROBAKTERIJ

V mleku smo določali prisotnost enterobakterij na trdnem gojišču VRBD. Primerne decimalne razredčitve vzorcev mleka smo vmešali v gojišče in inkubirali 24 h pri 37 °C. Za enterobakterije značilne kolonije so rdeče barve obdane z rdečkasto precipitacijsko cono.

Pri vseh 29-ih analiziranih vzorcih mleka smo potrdili prisotnost enterobakterij in sicer od 10 KE/ml do  $3,21 \times 10^4$  KE/ml mleka. Dobljeni rezultati precej presegajo vrednosti, podane v Smernicah za mikrobiološko... (2009), po katerih naj bi bila vsebnost enterobakterij v mililitru surovega mleka, namenjenega za uživanje brez predhodne toplotne obdelave  $\leq 10$  KE.



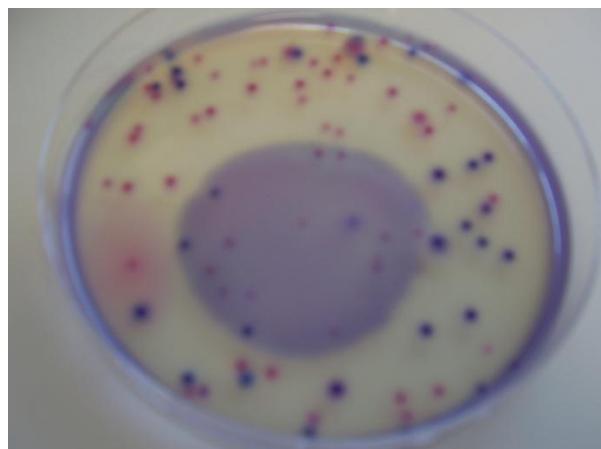
Slika 17: Prisotnost enterobakterij na trdnem gojišču VRBD agarju (foto: N. Novak, 2011)

#### 4.6 DOLOČANJE PRISOTNOSTI SKUPNIH KOLIFORMNIH BAKTERIJ IN *Escherichia coli*

Primerne razredčitve vzorcev mleka smo prenesli na petrijeve plošče, prilili Chromocult® coliform agar ter plošče 24 h inkubirali pri 37 °C.

Gojišče vsebuje dve kromogeni komponenti, in sicer Salmon-GAL ter X-glukoronid, ki prispevata k značilnemu izgledu izraslih kolonij (Jeršek, 2009). Koliformne bakterije vsebujejo β-D-galaktozidazo, ki cepi substrat Salmon-GAL. To povzroči, da se kolonije

koliformnih bakterij obarvajo rdeče. Encim  $\beta$ -D-glukoronidaza (GUD), ki je značilen za večino bakterij vrste *E. coli*, pa razgradi tako substrat X-glukoronid kot tudi Salmon-GAL, kar povzroči značilno obarvanje kolonij vrste *E. coli* temno modro do vijolično (Microbiology Manual, 2005).



Slika 18: Prisotnost skupnih koliformnih bakterij (obarvane rdeče in modro) in samo *E. coli* (obarvano temno modro) na Chromocult® coliform agar (foto: N. Novak, 2011)

Število kolonijskih enot v vzorcu smo ugotavljali z metodo štetja na petrijevih ploščah. Pri vseh analiziranih vzorcih mleka smo potrdili prisotnost skupnih koliformnih bakterij, in sicer od 3 KE/ml do  $9,0 \times 10^4$  KE/ml.

Ob dobrih higieniskih pogojih pridobivanja in skladiščenja mleka ter hlajenju na temperaturo  $< 5$  °C, vsebuje surovo mleko manj kot 100 KE koliformnih bakterij na ml mleka.

Prisotnosti *E. coli* nismo potrdili pri 13 vzorcih (44,8 %) analiziranega mleka, pri 11 vzorcih (37,9 %) je zraslo manj kot  $< 10$  KE/ml mleka, v ostalih analiziranih vzorcih pa je zraslo več kot 10 KE/ml mleka (od  $2,6 \times 10$  do  $1,8 \times 10^4$ ).

Po priporočilih Inštituta za varovanje zdravja RS (Smernice za mikrobiološko..., 2009) v 25 ml mleka ne sme biti prisotne bakterije *E. coli*, ki izloča verotoksin (VTEC). Ker nismo naredili nadaljnjih analiz, ki bi nam pokazale kateremu serotipu pripadajo najdene *E. coli*, ne moremo trditi, da analizirano mleko ustrezza priporočilom.

#### 4.7 DOLOČANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV

Skupno število mikroorganizmov v mleku smo ugotavljali na trdnem gojišču PCA z dodatkom mleka v prahu. Po 1 ml razredčitev  $10^{-3}$  in  $10^{-4}$  smo odpipetirali v petrijeve plošče, dodali gojišče in inkubirali 72 h pri 30 °C. Rezultati so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Skupno število mikroorganizmov v mililitru mleka

SŠMO (KE/ml)	Število vzorcev	Število vzorcev (%)
< 50.000	10	34,5 %
50.000 - 100.000	5	17,2 %
100.000 - 150.000	5	17,2 %
> 150.000	8	27,6 %
neštevno	1	3,5 %

SŠMO – skupno število mikroorganizmov, KE – kolonijske enote

Pravilnik o veterinarskih pogojih za proizvodnjo in dajanje na trg surovega mleka, topotno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov (2004) določa, da skupno število mikroorganizmov v surovem kravjem mleku za pitje ne sme presegati 50.000 KE/ml. Iz preglednice 5 lahko razberemo, da samo 34,5 % vzorcev ustreza kriteriju o skupnem številu mikroorganizmov, ki je naveden v pravilniku. 17,2 % vzorcev je vsebovalo med 50.000 in 100.000 KE/ml, kar 48,3 % vzorcev pa je preseglo 100.000 KE/ml mleka.

Preglednica 6: Največja in najmanjša vrednost ter povprečna vrednost skupnega števila mikroorganizmov v mililitru vzorca

	Najmanj (KE/ml)	Največ (KE/ml)	Povprečje (KE/ml)
SŠMO	3.000	2.120.000	204.000

SŠMO – skupno število mikroorganizmov, KE – kolonijske enote

Povprečno število mikroorganizmov v mililitru mleka je znašalo  $2,0 \times 10^5$ . Najmanjše število kolonijskih enot v vzorcih je bilo  $3,0 \times 10^3$ , najvišje pa  $2,1 \times 10^6$  KE/ml.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V raziskavo smo vključili 29 vzorcev surovega mleka, ki smo jih pridobili iz mlekomatov med novembrom 2010 in februarjem 2011. Vzorce smo testirali na morebitno prisotnost *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, klostridijev, *Bacillus cereus*, enterobakterij skupnih koliformnih bakterij in *Escherichia coli*, ter ugotavliali SŠMO.

Vzorce mleka smo analizirali po standardnih metodah, predpisanih za posamezno bakterijsko skupino, prav tako smo število kolonij ugotavliali po postopku, opisanemu v standardu IDF 100B (1991).

Po Smernicah... (2009) Inštituta za varovanje zdravja Republike Slovenije velja, da v surovem mleku, ki je namenjeno za uživanje brez predhodne topotne obdelave, v 25 ml surovega mleka ne smejo biti prisotne bakterije *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* in *Escherichia coli*, ki izloča verotoksin (VTEC). V mililitru mleka ne sme biti več kot  $10^3$  KE bakterije *Bacillus cereus*. Količina enterobakterij in sulfit reducirajočih klostridijev v mililitru surovega mleka ne sme biti višja od 10 KE.

Glede na zgoraj navedena priporočila o mikrobiološki kakovosti surovega mleka lahko zaključimo, da je testirano mleko zadostilo kriterijem naslednjih bakterijskih vrst: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* in sulfit reducirajoče klostridije. Vsi vzorci, razen enega, so bili ustrezni glede vsebnosti bakterijskih vrst *Salmonella* sp.

Glede bakterije *E. coli* ne moremo trditi, da vzorci ustrezajo kriterijem, ker ne vemo, kateremu serotipu pripadajo najdene *E. coli*. Za določitev koliformnih bakterij ni predpisanega standarda oz. priporočil, vendar je zaželeno, da je njihovo število čim manjše. Visoka vsebnost *E. coli* in koliformnih bakterij v surovem mleku ne pomeni vedno fekalne okužbe. Bakterije se hitro razmnožujejo v ostankih mleka v molznem stroju ter na mlekarski opremi, ki postane tako glavni vir okužbe (Rogelj, 2003).

Pravilnik o veterinarskih pogojih za proizvodnjo in dajanje na trg surovega mleka, topotno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov (2004) določa, da skupno število mikroorganizmov v surovem kravjem mleku, ki je namenjeno za uživanje brez predhodne topotne obdelave, ne sme vsebovati več kot 50.000 KE/ml mleka. Tem kriterijem je zadoščalo 34,5 % testiranih vzorcev. Vzrok za povečano število SŠMO je lahko neustrezna higiena cistern za prevažanje mleka, premalo očiščeni oziroma razkuženi deli mlekomata, ki pridejo v stik z mlekom, ali nepravilna obdelava mleka po molži.

Do povečane okužbe lahko pride tudi, če uporabljamo steklenice/plastenke, ki niso dovolj očiščene oz. razkužene. Po nakupu mleka iz mlekomatov je pomembno, da mleko čim hitreje postavimo na hladno, da preprečimo nadaljnje razmnoževanje mikroorganizmov.

Mleko iz mlekomata je slovenskega porekla in ni izpostavljeno nobenemu industrijskemu postopku, kar pomeni, da mu ni bilo ničesar odvzetega, in zato vsebuje večje količine nekaterih hranljivih snovi, vitaminov in mineralov in je tudi bolj polnega okusa kot predelano mleko, ki mu je odvzeta maščoba in je toplotno obdelano.

Starejše generacije ljudi še pomnijo čase, ko mleka niso kupovali v trgovini, ampak pri kmetu. V sodobnem času, ko kmetije propadajo ena za drugo, je industrija tista, ki doavlja mleko v trgovino, le to pa je podvrženo industrijski predelavi. Z mlekomati lahko zagotovimo, da starejšim ljudem vrnemo kanček zgodovine, mlajšim pa omogočimo izbiro med industrijskim in pravim kmečkim mlekom.

Mlekomat je lahko tudi ena od rešitev za kmetije, ki so na robu preživetja, saj jim omogoča dodaten zaslužek in dodatno širjenje dobrega imena kmetije. S tem bi omogočili, da ljudje začnejo razmišljati, da najboljša kvaliteta izvira iz domačega kraja.

Za redno kontrolo mleka in mlekomatov so zadolžene pooblaščene inštitucije oz. inšpektorji, ki v primeru ugotovitve neustrezne kvalitete mleka in s tem neskladja z zakonodajo ustrezno ukrepajo. Pri nas od 15. aprila 2010 opravlja uradni nadzor nad mlekomati Veterinarska uprava RS, pred njimi pa je nadzor opravljal zdravstveni inšpektorat. Ker Veterinarska uprava RS še ni podala uradnih rezultatov, ostaja presoja o uživanju mleka iz mlekomatov (bodisi neposredno surovega ali prekuhanega) porabnikom samim, pri čemer previdnost vsekakor ni odveč. Poleg tega bi bila uporabnikom mleka iz mlekomatov, kakor tudi širši javnosti, verjetno dobrodošla objava rezultatov rednih mikrobioloških analiz mleka, ki bi bili dostopni bodisi na mlekomatu, za katerega se je izvedla analiza, oz. na internetnih straneh VURS-a. S posredovanjem čim večjega števila informacij bi prispevali k splošni osveščenosti porabnikov surovega mleka kakor tudi k njihovi zaščiti pred morebitno nevarnostjo okužbe.

Na podlagi analiz, ki smo jih izvedli v naši nalogi, smo ugotovili, da je večina vzorcev surovega mleka, točenega iz mlekomatov, primerna za uživanje. Zavedati pa se moramo, da surovo mleko ni sterilen proizvod, in kljub odlični oskrbi mlekomata bodo v mleku še vedno prisotne različne bakterije in drugi mikroorganizmi. Zato je za rizične skupine ljudi (otroci, nosečnice, starejši ljudje ter ljudje z oslabljenim imunskim sistemom) bolj primerno, da surovo mleko prekuhajo.

## 5.2 SKLEPI

Glede na dobljene rezultate smo ugotovili sledeče:

- pri nobenem vzorcu mleka nismo zasledili prisotnosti bakterij vrst *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* in sulfit reducirajočih klostridijev,
- pri enem vzorcu mleka smo zasledili prisotnost bakterij vrste *Salmonella enterica* subsp. *arizona*e, vendar pa bi bilo potrebno vzorec poslati še na nadaljnje serološke teste, da bi lahko z gotovostjo potrdili prisotnost omenjene vrste,
- enterobakterije smo potrdili v vseh testiranih vzorcih, njihovo število se je gibalo med 10 KE/ml in  $3,21 \times 10^4$  KE/ml mleka,
- pri vseh testiranih vzorcih smo potrdili prisotnost koliformnih bakterij, in sicer med 3 KE/ml in  $9,0 \times 10^4$  KE/ml,
- pri 13 vzorcih mleka nismo potrdili prisotnosti bakterij *Escherichia coli*, 11 vzorcev je vsebovalo manj kot 10 KE/ml mleka, pri petih vzorcih pa je zraslo med  $2,6 \times 10$  in 1,8 do  $10^4$  KE/ml mleka,
- SŠMO se je gibalo med  $3,0 \times 10^3$  in  $2,1 \times 10^6$  KE/ml mleka. Manj kot 50.000 KE/ml mleka je vsebovalo 10 vzorcev (34,5 %), 5 vzorcev (17,2 %) je vsebovalo od 50.000 do 100.000 KE/ml mleka, 14 vzorcev (48,3 %) pa je vsebovalo več kot 100.000 KE/ml mleka.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je večina vzorcev mleka ustrezala mikrobiološkim priporočilom.

## 6 POVZETEK

Mleko je pomemben vir hranljivih snovi, ki jih človek potrebuje za rast in razvoj, obenem pa je tudi izvrsten medij za rast mikroorganizmov. Kljub najnovejšim tehnologijam je narava pridobivanja mleka takšna, da ne moremo preprečiti okužbe mleka z mikroorganizmi, lahko pa, s pravilno higieno in tehnologijo, preprečimo prekomerno razmnoževanje le-teh.

Mleko se s patogenimi bakterijami lahko okuži zaradi neustrezne higiene pri molži, slabo vzdrževanih molznih naprav, pri transportu, preko krme in vode... Na razmnoževanje bakterij vplivajo predvsem hranljive snovi, rastni faktorji, vodna aktivnost, vrednost pH, količina kisika in protimikrobni sistem mleka (Rogelj, 2003). Prisotnost patogenih mikroorganizmov lahko povzroči različna obolenja pri vseh starostnih skupinah, najbolj dovetni pa so otroci in nosečnice ter starejši ljudje.

Vzorčenje mleka je potekalo od novembra 2010 do februarja 2011. Skupno smo analizirali 29 vzorcev mleka, ki smo jih zbrali iz mlekomatov po Sloveniji. Vzorce smo pobrali na dan testiranja ali pa predhodni večer in jih čez noč hranili v hladilniku. Vzorčenje je potekalo v zimskem času. V laboratoriju Inštituta za mlekarstvo in probiotike smo določali morebitno prisotnost patogenih bakterij (*Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, sulfit reducirajoče klostridije, *Bacillus cereus*, enterobakterije, skupne koliformne bakterije in *Escherichia coli*) ter skupno število mikroorganizmov. Vzorce mleka smo analizirali po standardnih metodah s štetjem na petrijevih ploščah, ki so predpisane za posamezno bakterijsko skupino.

Pri preiskavi smo ugotovili, da noben vzorec ni vseboval bakterij vrste *Bacillus cereus*, sulfit reducirajočih klostridijev in *Listeria monocytogenes*. Pri enem vzorcu mleka lahko s 95 % verjetnostjo trdimo, da je vseboval bakterije vrste *Salmonella enterica* subsp. *arizona*. Tak vzorec bi bilo potrebno poslati še na serološke teste, da bi naš sum potrdili ali ovrgli. Prisotnosti *Escherichia coli* nismo potrdili pri 13 vzorcih, pri 11 vzorcih je bilo zraslih kolonij manj kot 10 KE/ml mleka, pri petih vzorcih pa je zraslo med  $2,6 \times 10$  in  $1,8 \times 10^4$  KE/ml mleka. Število koliformnih bakterij se je gibalo med 3 KE/ml in  $9,0 \times 10^4$  KE/ml. Skupno število mikroorganizmov v vzorcu je bilo med  $3,0 \times 10^3$  in  $2,1 \times 10^6$ . Pravilnik o veterinarskih pogojih za proizvodnjo in dajanje na trg surovega mleka, toplotno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov (2004) določa, da skupno število mikroorganizmov v surovem kravjem mleku, ki je namenjeno za uživanje brez predhodne toplotne obdelave, ne sme vsebovati več kot 50.000 KE/ml mleka. Temu merilu je zadostilo 10 testiranih vzorcev.

Rezultati naših analiz, glede na smernice za mikrobiološko varnost živil, vsekakor uvrščajo mleko slovenskih mlekomatov med živila z nizko stopnjo tveganja.

## 7 VIRI

- Abram M., Bubonja M. 2009. *Listeria i Erysipelothrix*. V: Medicinska mikrobiologija. Uzunović-Kamberović S. (ur.). Fojnica, Štamparija: 307-315
- 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
- Anand S. K., Griffiths M. W. 2011. *Enterobacteriaceae*. V: Encyclopedia of dairy sciences. Volume 4. 2nd edition. Fuquay W. J., Fox F. P., McSweeney L. H. P. (eds.). London, Academic Press: 67-71
- Andlovic A. 2002a. *Escherichia coli*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185-188
- Andlovic A. 2002b. Salmonele in šigele. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 189-200
- Aureli P., Franciosa G., Scalfaro C. 2011. *Clostridium* spp. V: Encyclopedia of dairy sciences. Volume 4. 2nd edition. Fuquay W. J., Fox F. P., McSweeney L. H. P. (eds.). London, Academic Press: 47-53
- Bajt N., Golc Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 14-21
- Cappuccino G., Sherman N. 2005. Microbiology: a laboratory manual. 7th ed. San Francisco, Cummings: 507-508
- Christiansson A. 2011. *Bacillus cereus*. V: Encyclopedia of dairy sciences. Volume 4, 2ed edition. Fuquay W. J., Fox F. P., McSweeney L. H. P. (eds.). London, Academic Press: 24-30
- Čanžek Majhenič A., Perko B., Rogelj I. 2008. Praktikum pri predmetu Mlekarstvo. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za mlekarstvo
- Desmarchelier P. in Fegan N. 2011. *Escherichia coli*. V: Encyclopedia of dairy sciences. Volume 4. 2nd edition. Fuquay W. J., Fox F. P., McSweeney L. H. P. (eds.). London, Academic Press: 60-66
- Godič Torkar K. 2006. Mikrobiologija z biotehnologijo: študijsko gradivo. Ljubljana, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana: 14, 39-68

Gubina M. 2002a. Klostridiji. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo.

Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 242-245

Gubina M. 2002b. Rod *Bacillus*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in

mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 229-232

IDF Standard 122B. 1992. Milk and milk products. Preparation of samples and dilutions for microbiological examination. 4 str.

IDF Standard, 100B. 1991. Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C. 3 str.

ISO 11290-1. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: 16 str.

ISO 21528-2. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. 10 str.

ISO 4833. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C.

ISO 6785. 2001. Milk and milk products – Detection of *Salmonella spp.* 23 str.

ISO 7932. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* – Colony count technique at 30 °C. 13 str.

Jeršek B. 2009. Higiena živil: laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane.

Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 16

Jeršek B., Avbelj J. 2003. Fotografije mikrobioloških kultur. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 693-702

Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 31-51

Microbiology manual. 2005. 12th ed. Darmstadt, Merck (CD ROM)

Mleko in mlekomati. Zavod za zdravstveno zavarovanje Celje.

<http://www.zzzv-ce.si/unlimitpages.asp?id=625> (14. apr. 2011)

Mlekomat. Mlekomat Slovenije. <http://mleko-mat.si/mlekomat/> (14. apr. 2011)

Müller-Premur M. 2002. Nesporogeni po Gramu pozitivni bacili. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 255-263

Nahberger Marčič V. 2007. Mikrobiologija in biotehnologija. Mikrobiologija: študijsko gradivo. Maribor, Živilska šola, Višja strokovna šola: 23-26

Pravilnik o kakovosti mleka, mlečnih izdelkov, siril in čistih cepiv. 1993. Ur.l. RS, št. 21-991/93

Pravilnik o veterinarskih pogojih za proizvodnjo in dajanje na trg surovega mleka, topotno obdelanega mleka in mlečnih izdelkov. 2004. Ur.l. RS, št. 28-1227/04

Poppe C. 2011. *Salmonella spp.* V: Encyclopedia of dairy sciences. Volume 4, 2ed edition. Fuquay W. J., Fox F. P., McSweeney L. H. P. (eds.). London, Academic Press: 93-98

Radšel-Medvešček A. 2002a. Zastrupitev s hrano, ki jo povzroča *Bacillus cereus*. V: Infekcijske bolezni. Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 136-137

Radšel-Medvešček A. 2002b. Zastrupitev s hrano, ki jo povzroča *Clostridium perfringens*. V: Infekcijske bolezni. Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 138-139

Ray B., Bhunia A. 2008. Fundamental food microbiology. 4th ed. New York, Taylor & Francis Group: 315-320

Rogelj I. 2003. Mleko. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 513–540

Ryser E. T. 2011. *Listeria monocytogenes*. V: Encyclopedia of dairy sciences. Volume 4. 2nd edition. Fuquay W. J., Fox F. P., McSweeney L. H. P. (eds.). London, Academic Press: 81- 86

Singh H., Bennett R. 2002. Milk and milk processing. V: Dairy microbiology handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Robisson R. K. (ed). New York, Wiley Interscience: 1-11

Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku. 2009. IVZ Republike Slovenije v sodelovanju z Zvezo potrošnikov Slovenije: 16. [www.zzv-go.si/fileadmin/pdfdoc/SmerniceZ.pdf](http://www.zzv-go.si/fileadmin/pdfdoc/SmerniceZ.pdf) (5. avg. 2011)

Sušić E., Tomić-Paradžik M. 2009. *Enterobacteriaceae*. V: Medicinska mikrobiologija. Uzunović-Kamberović S. (ur.). Fojnica, Štamparija: 363-388

Mlekomat. Sveže.si. Spletna tržnica. <http://www.sveze.si/mlekomati.htm> (14. apr. 2011)

Todar K. 2011. Pathogenic E. coli. Madison, University of Wisconsin:. <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html> (9. jul. 2011)

Vsak dan sveže mleko. O mlekomatih.

<http://www.mlekomati.com/mlekomati.html> (14. apr. 2011)

VURS (Veterinarska uprava Republike Slovenije). 2010. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2009.  
[www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Letno\\_porocilo\\_o\\_zoonozah\\_Slovenija\\_2009.pdf](http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Letno_porocilo_o_zoonozah_Slovenija_2009.pdf) (2. mar. 2011)

VURS (Veterinarska uprava Republike Slovenije). 2011. Program monitorinega zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010.  
[www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/PROGRAMZOONOZ2011.pdf](http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/PROGRAMZOONOZ2011.pdf) (2. mar. 2011)

ZZV Ljubljana. *Bacillus cereus*.

<http://www.zzv-lj.si/strokovna-priporocila/mikrobiologija/bacillus-cereus> (17. mar. 2011)

ZZV Ravne. Ešerihija koli (*Escherichia coli* – *E.coli*) v živilih.

[http://www.zzv-ravne.si/PDF/e\\_coli.pdf](http://www.zzv-ravne.si/PDF/e_coli.pdf) (26. feb. 2011)

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič, za vso pomoč, nasvete in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge. Za pomoč in številne nasvete pri praktičnemu delu v laboratoriju, bi se zahvalila dr. Petri Mohar Lorbeg.

Zahvaljujem se tudi ge. Sabini Knehtl za vso pomoč tekom študija.

Posebna zahvala gre mojemu fantu Bernardu za vse vzpodbude, podporo in pomoč. Hvala tudi mojima staršema, ki sta mi ves čas stala ob strani.