

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Janja RUČNA

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KVASOVK, PLESNI IN  
AFLATOKSINA M<sub>1</sub> V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH**

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski študij

**THE PRESENCE OF YEASTS, MOULDS AND AFLATOXIN M<sub>1</sub> IN  
MILK AND MILK PRODUCTS**

GRADUATION THESIS  
Higher professional studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo - zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo in v Laboratoriju za mlekarstvo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Vzorci surovega mleka so bili odvzeti pri posameznih proizvajalcih v ljubljanski regiji, vzorci mlečnih izdelkov pa na eni izmed ljubljanskih tržnic. Mikrobiološke preiskave so bile opravljene v Laboratoriju za mlekarstvo.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Karmen Godič Torkar in za somentorico doc. dr. Stanislavo Golc Teger.

Recenzent: prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Karmen GODIČ TORKAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko

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

Član: doc. dr. Stanislava GOLC TEGER  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko

Datum zagovora:

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

Janja Ručna

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
- DK UDK 637.1(043.2)=163.6
- KG mleko/mlečni izdelki/kvasovke/plesni/mikotoksini/aflatoksini
- KK AGRIS Q04/9412
- AV RUČNA, Janja
- SA GODIČ TORKAR, Karmen (mentorica)/GOLC TEGER, Stanislava (somentorica)
- KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2008
- IN UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KVASOVK, PLESNI IN AFLATOKSINA M<sub>1</sub>  
V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH
- TD Diplomsko delo (visokošolski študij)
- OP IX, 46 str., 6 pregl., 5 sl., 43 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V poskus smo vključili 60 vzorcev surovega mleka in 40 vzorcev mlečnih izdelkov. Vzorci mleka so bili odvzeti pri nekaterih proizvajalcih mleka v ljubljanski regiji, vzorci mlečnih izdelkov, proizvedenih na malih živilskih obratih za predelavo mleka, pa na eni izmed ljubljanskih tržnic. V vzorcih surovega mleka in mlečnih izdelkov smo ugotavljali število kvasovk in plesni. Prisotnost aflatoksina M<sub>1</sub> v mlečnih izdelkih smo določali z encimsko - imunološko metodo Ridascreen<sup>®</sup>. Vzorci surovega mleka so vsebovali povprečno 1,7 log<sub>10</sub>/ml kvasovk in 0,7 log<sub>10</sub>/ml plesni, vzorci mlečnih izdelkov pa 2,5 log<sub>10</sub>/g kvasovk in 2,1 log<sub>10</sub>/g plesni. Iz surovega mleka smo izolirali plesni rodov: *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* in *Penicilium*, iz mlečnih izdelkov pa: *Geotrichum*, *Moniliella* in *Aspergillus*. Z metodo Ridascreen<sup>®</sup> smo ugotovili prisotnost aflatoksina M<sub>1</sub> v 10 % vzorcev mlečnih izdelkov.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Vs
- DC UDC 637.1(043.2)=163.6
- CX milk/milk products/yeasts/moulds/mycotoxins/aflatoxins
- CC AGRIS Q04/9412
- AU RUČNA, Janja
- AA GODIČ TORCAR, Karmen (supervisor)/GOLC TEGER, Stanislava (co-supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
- PY 2008
- TI THE PRESENCE OF YEASTS, MOULDS AND AFLATOKSIN M<sub>1</sub> IN MILK AND MILK PRODUCTS
- DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
- NO IX, 46 p., 6 tab., 5 fig., 43 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB 60 samples of raw milk and 40 samples of milk products were included in this research project. Test samples of raw milk were obtained on some farms within Ljubljana region whereas those of milk products, which derived from small dairy processing plants, were taken at an open market in Ljubljana. The number of the yeasts and moulds in the samples of raw milk and milk products was investigated. The presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk products was determined by enzyme-immunoassay method Ridascreen<sup>®</sup>. The samples of raw milk contained on average 1.7 log<sub>10</sub>/ml of the yeasts and 0.7 log<sub>10</sub>/ml of the moulds, while the samples of milk products contained 2.5 log<sub>10</sub>/g of the yeasts and 2.1 log<sub>10</sub>/g of the moulds. The genera of the moulds such as: *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* and *Penicilium*, were isolated from raw milk; *Geotrichum*, *Moniliella* and *Aspergillus* were isolated from milk products. The presence of aflatoxin M<sub>1</sub> was confirmed by the Ridascreen<sup>®</sup> method in 10 % of all the milk product samples.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ NALOGE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 MLEKO	3
2.2 MLEČNI IZDELKI	4
2.3 MIKROBIOLŠKA KAKOVOST MLEKA IN MLEČNIH IZDELKOV	6
<b>2.3.1 Kvasovke</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 Plesni</b>	<b>8</b>
2.3.2.1 Plesni rodu <i>Aspergillus</i>	9
2.3.2.2 Plesni rodu <i>Geotrichum</i>	9
2.3.2.3 Plesni rodu <i>Mucor</i>	9
2.3.2.4 Plesni rodu <i>Penicillium</i>	10
2.3.2.5 Plesni rodu <i>Moniliella</i>	10
<b>2.3.3 Mikotoksini</b>	<b>10</b>
2.3.3.1 Aflatoksini v mleku in mlečnih izdelkih	11
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>13</b>
3.1 POTEK PREISKAVE IN SHEMA DELA	13
3.2 VZORČENJE	15
3.3 MATERIAL	15
<b>3.3.1 Razredčevala</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 Gojišča</b>	<b>17</b>
<b>3.3.3 Reagenti za uravnavanje vrednosti pH gojišč in razredčeval</b>	<b>19</b>
<b>3.3.4 Referenčni sevi</b>	<b>19</b>
<b>3.3.5 Encimsko - imunološki test Ridascreen®</b>	<b>20</b>
<b>3.3.6 Oprema</b>	<b>21</b>

<b>3.3.7</b>	<b>Potrošni material</b>	22
3.4	METODE DELA	22
<b>3.4.1</b>	<b>Izvajanje mikrobioloških preiskav</b>	22
<b>3.4.2</b>	<b>Priprava vzorcev</b>	22
<b>3.4.3</b>	<b>Ugotavljanje števila kvasovk in plesni v vzorcih mleka in mlečnih izdelkov</b>	23
<b>3.4.4</b>	<b>Štetje kolonij kvasovk in plesni na gojišču</b>	24
<b>3.4.5</b>	<b>Priprava izolatov plesni za identifikacijo</b>	25
<b>3.4.6</b>	<b>Priprava nativnega preparata</b>	25
<b>3.4.7</b>	<b>Ugotavljanje prisotnosti plesni vrst <i>A. flavus</i> in <i>A. parasiticus</i> na gojišču AFPA</b>	25
<b>3.4.8</b>	<b>Ugotavljanje tvorbe aflatoksinov pri izolatih plesni</b>	26
<b>3.4.9</b>	<b>Ugotavljanje aflatoksina M<sub>1</sub> v vzorcih mlečnih izdelkov z encimsko - imunološko metodo Ridascreen®</b>	26
<b>3.4.10</b>	<b>Statistična obdelava podatkov</b>	27
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	28
4.1	SUROVO MLEKO	28
4.2	MLEČNI IZDELKI	28
4.3	IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH SEVOV PLESNI	32
<b>4.3.1</b>	<b>Identifikacija plesni <i>A. flavus</i> / <i>parasiticus</i> na gojišču AFPA</b>	35
4.4	REAKCIJA TVORBE TOKSINOV NA GOJIŠČU YGC Z METIL β-CIKLODEKSTRINOM	35
4.5	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI AFM <sub>1</sub> V MLEČNIH IZDELKIH Z METODO RIDASCREEN®	35
<b>4.5.1</b>	<b>Rezultati merjenja AFM<sub>1</sub></b>	37
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	38
5.1	RAZPRAVA	38
5.2	SKLEPI	41
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	42
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	44
	<b>ZAHVALA</b>	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Število kvasovk in plesni v vzorcih surovega mleka	28
Preglednica 2: Število kvasovk v vzorcih mlečnih izdelkov	29
Preglednica 3: Število plesni v vzorcih mlečnih izdelkov	30
Preglednica 4: Število kvasovk v vzorcih sira posameznih proizvajalcev	31
Preglednica 5: Število plesni v vzorcih sira posameznih proizvajalcev	31
Preglednica 6: Vrednosti absorpcije standardnih raztopin (povprečna vrednost 4-ih meritev)	36

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prenos toksinov na človeka	12
Slika 2: Shema dela	14
Slika 3: Povprečno število kvasovk in plesni v g vzorca sira in ml vzorca surovega mleka, v log <sub>10</sub>	32
Slika 4: Plesni v vzorcih surovega mleka in vzorcih mlečnih izdelkov	34
Slika 5: Umeritvena krivulja absorpcije standardnih raztopin pri metodi Ridascreen <sup>®</sup> za merjenje koncentracije AFM <sub>1</sub> v siru	37



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AF	aflatoksin
AFM <sub>1</sub>	aflatoksin M <sub>1</sub>
°C	stopinj Celzija
g	gram
KE	kolonijske enote
kg	kilogram
LOG	logaritem
MKB	mlečno kislinske bakterije
MO	mikroorganizmi
ml	mililiter
max	maksimum
min	minimum
N	normaliteta
ng	nanogram
nm	nanometer
µg	mikrogram
Sd	standardna deviacija – standardni odklon
µl	mikroliter

## 1 UVOD

Mleko in mlečni izdelki vsebujejo številne hranljive snovi, zato so ugoden medij za naselitev in razmnoževanje mikroorganizmov, kot so bakterije, plesni in kvasovke. Če je njihovo število v surovem mleku in mlečnih izdelkih povišano, je to pokazatelj, da je prišlo do okužbe iz okolja, kjer se mleko pridobiva in predeluje. Mikroorganizmi lahko pridejo v mleko ali mlečne izdelke iz obolelih živali molznic, pri molži, neustrezni higieni ljudi in opreme, pri pridobivanju in predelavi, iz zraka, vode, krme, itd.. Njihovo število se lahko poveča tudi zaradi neustreznih temperatur hranjenja mleka in mlečnih izdelkov.

Mnogi mikroorganizmi v mleku in mlečnih izdelkih razgrajujejo mlečne beljakovine, maščobe, laktozo in kot tehnološki kvarljivci vplivajo na njihovo kakovost in obstojnost. Nekateri patogeni mikroorganizmi se lahko v mleku razmnožujejo in tvorijo večinoma termostabilne toksine ter povzročijo infekcije in intoksikacije. Znani so bakterijski enterotoksini vrst rodov *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacillus*, itd. Pogosti so tudi zelo nevarni mikotoksini, ki jih tvorijo različne plesni (Wouters in sod., 2002)

Aflatoksini so sekundarni metaboliti plesni rodu *Aspergillus*. Če se krave molznice krmijo s krmo, v kateri so prisotne te vrste plesni, lahko le-te tvorijo aflatoksin B<sub>1</sub>, ki se v jetrih živali pretvori v aflatoksin M<sub>1</sub>, ta pa se izloča preko mlečnih žlez v mleko. Aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) deluje hepatotoksično in kancerogeno. Ker predstavlja nevarnost za zdravje ljudi, evropska in tudi slovenska zakonodaja predpisujeta maksimalno dovoljeno koncentracijo 0,05 µg AFM<sub>1</sub> v kg surovega mleka, mleka za proizvodnjo mlečnih izdelkov ali toplotno obdelanega mleka (Pravilnik o ..., 2003; European Community ..., 2001).

## 1.1 CILJI NALOGE

Cilji naloge so:

- ugotoviti število kvasovk in plesni v vzorcih surovega mleka prirejenega v ljubljanski regiji,
- ugotoviti število kvasovk in plesni v vzorcih mlečnih izdelkov (skuta, mehki sir, poltrdi sir), izdelanih v malih živilskih obratih za predelavo mleka,
- izolirati in identificirati plesni na nivoju rodu, ugotoviti zastopanost vrst rodu *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*) ter ugotoviti njihovo sposobnost tvorbe aflatoksinov,
- ugotoviti prisotnost aflatoksina M<sub>1</sub> v vzorcih mlečnih izdelkov z encimsko-imunološko metodo.

## 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da bo število plesni in kvasovk v mlečnih izdelkih, zaradi dodatne okužbe med predelavo, višje kot v surovem mleku. Nekateri izdelki, vključeni v poskus, so namreč izdelani iz surovega ali le termiziranega mleka.

Pričakujemo razlike v številu kvasovk in plesni med posameznimi mlečnimi izdelki ter med izdelki posameznih proizvajalcev.

Pričakujemo prisotnost mikotoksina M<sub>1</sub> v posameznih vzorcih mlečnih izdelkov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MLEKO

Mleko je proizvod mlečne žleze sesalcev in je eno najpopolnejših naravnih hranil, ki vsebuje več kot devetdeset različnih sestavin.

V kravjem mleku je (Đorđević 1982):

- 3,2 – 5,5 % maščob,
- 2,6 – 4,2 % beljakovin,
- 4,6 - 4,9 % laktoze,
- 0,6 - 0,8 % mineralov in
- 86 – 89 % vode.

Maščoba je nosilec arome in okusa mleka, vpliva na barvo in konsistenco mlečnih izdelkov. Odstotek maščobe v mleku je odvisen od prehrane in obdobja laktacije krave (Bajt in Golc Teger, 2002).

Mleko je biološko visoko vredno živilo, ker vsebuje veliko esencialnih aminokislin, ki jih telo ne more sintetizirati samo. Mlečne beljakovine so sestavljene iz približno 80 % kazeina in 20 % sirotkinih beljakovin, ki pri izdelavi sira preidejo v sirotko. Beljakovine pri izdelavi fermentiranih mlečnih izdelkih vplivajo na čvrstost in gostoto izdelkov, pri izdelavi sirov pa na količino izdelanega sira (Bajt in Golc Teger, 2002).

Mlečni sladkor ali laktoza je disaharid, sestavljen iz D – glukoze in D – galaktoze. Mlečno kislinske bakterije razgrajujejo laktozo preko glukoze v mlečno kislino. Fermentirajo pa jo tudi propionsko kislinske, masleno kislinske bakterije in kvasovke (Bajt in Golc Teger, 2002).

V mleku je več kot 40 mineralov v obliki makroelementov (Ca, P, Mg, K, Na, Cl) ali mikroelementov (Fe, Mn, Cu, Zn, F, J) v takem medsebojnem razmerju, kot najbolj ustreza organizmom (Bajt in Golc Teger, 2002).

Večina vode v mleku je proste, nekaj vode pa je vezane v beljakovinah, na laktozo in membrane maščobnih kapljic (Bajt in Golc Teger, 2002).

V mleku so prisotni tudi vitamini, encimi, zaščitne snovi, rastni faktorji, itd. (Rogelj, 2003).

## 2.2 MLEČNI IZDELKI

Predelovanje mleka zahteva poznavanje kemijske sestave mleka, saj ima le ta močan vpliv na končni izdelek (Bajt in Golc Teger, 2002).

Mlečne izdelke lahko pridobivamo iz surovega ali pasteriziranega mleka. Pasterizacija je postopek toplotne obdelave mleka, s katerim uničimo zdravju škodljive mikroorganizme, večino tehnološko škodljivih mikroorganizmov in preprečimo delovanje nekaterih encimov, prisotnih v mleku. S pasterizacijo dosežemo, da bodo izdelki varnejši in izenačeni po kakovosti, izboljšamo pa jim tudi senzorične lastnosti, saj izgubijo značilen vonj in okus po surovem mleku. Izognemo se tudi številnim napakam izdelkov, ki jih povzročajo tehnološko škodljivi mikroorganizmi v surovem mleku (Bajt in Golc Teger, 2002).

Iz surovega in pasteriziranega mleka izdelujejo različne izdelke, kot so (Bajt in Golc Teger, 2002):

- fermentirani mlečni izdelki (kislo mleko, jogurti, kislá smetana, kefir ...),
- sveži sir,
- mehki sir,
- poltrdi sir,
- trdi sir,
- surovo maslo,
- napitki iz sirotke in pinjenca,
- namazi iz skute, surovega masla.

Za nastanek fermentiranih mlečnih izdelkov je osnova mlečnokislinsko vrenje ali fermentacija, pri čemer se mlečni sladkor ali laktoza spremeni v mlečno kislino. Fermentacijo povzročijo mlečnokislinske bakterije, včasih pa sodelujejo tudi kvasovke. Fermentirano mleko sodi med najstarejše mlečne izdelke. Fermentirane mlečne izdelke lahko izdelujemo iz kravjega, ovčjega, kozjega ali mešanega mleka. Glede na vsebnost maščob so izdelki lahko iz polnomastnega mleka, delno posnetega mleka ali posnetega mleka (Bajt in Golc Teger, 2002).

Sir je izdelek ki ga dobimo z usirjanjem surovega mleka ali toplotno obdelanega mleka s siriščem ali kislino; lahko je svež ali zorjen, čvrst ali polčvrst (Bajt in Golc Teger, 2002).

Glede na odstotek vode delimo sire na (Bajt in Golc Teger, 2002):

- do 80 % sveži sir (skuta),
- 50 – 55 % mehki sir,
- 40 – 50 % poltrdi sir,
- 35 – 40 % trdi sir za rezanje,
- < 35 % zelo trdi sir za strganje.

Skuta je najstarejša vrsta sira, narejena iz mleka, s pomočjo mezofilne mlečnokislinske mikroflore. Lahko je narejena iz posnetega mleka, delno posnetega ali polnomastnega mleka. Od tega je odvisna tudi barva skute. Iz posnetega mleka je bele barve, iz polnomastnega pa krem barve. Ima vse dobre lastnosti fermentiranih mlečnih izdelkov, lahko prebavljivost in visoko beljakovinsko vrednost. Skuto lahko izdelujemo iz kravjega, kozjega ali ovčjega mleka (Bajt in Golc Teger, 2002).

Mehki siri zorijo v slanici in imajo po končanem zorenju v notranjosti enakomerno mehko testo. Nimajo prave skorje. Mehki siri lahko zorijo brez plesni, lahko pa zorijo s plesnijo na površini ali v testu. Zoritev lahko poteka tudi pod rdečo mažo. Dodajajo jim lahko različne dodatke, kot so zelišča, začimbe itd. (Bajt in Golc Teger, 2002).

Poltrdi siri imajo praviloma skorjo, lahko pa so brez nje. Struktura testa je gladka in elastična, z manjšim številom očes velikosti graha. Vonj in okus sta mila, odvisno od časa zorenja. Zorenje običajno traja 3 mesece (Mavrin in Oštir, 2002).

### 2.3 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST MLEKA IN MLEČNIH IZDELKOV

Postopek pridobivanja mleka je takšen, da okužbe z mikroorganizmi skoraj ne moremo preprečiti. Glavni vir okužbe surovega mleka je notranjost mlečne žleze, zlasti pri molznicah obolelih za mastitisom, zunanost vimena in seskov, molzni stroj, mlekarska oprema, molznik, krma, voda in zrak. V mleku, namolzenem iz zdravega vimena, je malo mikroorganizmov. Če je splošno higiensko stanje proizvodnega obrata, živali in opreme dobro, vsebuje skupno mleko po molži do 10,000 MO/ml (Rogelj, 2003). Če je mleko takoj po molži ohlajeno na  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ , bo nizka temperatura preprečila nadaljnji razvoj mikroorganizmov (Bramley in McKinnon, 1990).

V surovem mleku so najpogostejši mikroorganizmi bakterije, nekoliko redkeje pa so prisotne plesni in kvasovke, ki pasterizacije ne preživijo (Jordal in sod., 1993).

Glede na njihovo delovanje razdelimo mikroorganizme na (Mavrin in Oštir, 2002):

- tehnološko koristne mikroorganizme, ki jih kot starterske kulture uporabljamo za izdelovanje fermentiranih mlečnih izdelkov (mlečnokislinske bakterije, propionske bakterije, žlahtne plesni itd.),
- tehnološko škodljive mikroorganizme, ki povzročajo kvarjenje, oziroma napake mleka in mlečnih izdelkov (proteolitični in lipolitični mikroorganizmi itd.),
- zdravju škodljive ali patogene mikroorganizme, ki ogrožajo zdravje potrošnika (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* itd.).

Mlečnokislinske bakterije so koristni mikroorganizmi, vendar samo pri predelavi mleka v fermentirane mlečne izdelke in v primeru, da se njihovo delovanje usmerja in obvladuje (Rogelj, 2003). V mleku so del naravne mikroflore, prisotne pa so povsod tam, kjer je

možnost spontane fermentacije ogljikovih hidratov. So del avtohtone mikroflore humanega in živalskega prebavnega in urogenitalnega trakta (Ouwenhand, 1998). Mlečno kislinske bakterije se glede na njihovo optimalno temperaturno območje delijo na mezofilne (med 20 in 30°C) in termofilne (od 30 do 45°C). Pogosto jih uporabljajo kot starterske kulture pri izdelavi fermentiranih mlečnih izdelkov (Wouters in sod., 2002). Najpogostejše so bakterije iz rodov *Lactobacillus* in *Lactococcus* (Rogelj in Perko, 2003). S tehnološkimi procesi želimo pri proizvodnji določenih mlečnih izdelkov število kvarljivcev zmanjšati, število koristnih mikroorganizmov pa povečati. V ta namen pri izdelavi mlečnih izdelkov uporabljamo predhodno termizacijo ali pasterizacijo (Rogelj in Perko, 2003).

### 2.3.1 Kvasovke

Kvasovke so evkariontski organizmi, ki imajo pravo jedro. V skupino kvasovk se praviloma uvrščajo enocelične prave glive. Za kvasovke je značilno nesporno razmnoževanje v obliki brstenja. Celice so lahko po obliki okrogle, ovalne ali podolgovate. Celice nekaterih vrst kvasovk se med seboj povežejo in tvorijo strnjene, razvejane verige – psevdomicelije. Kolonije so običajno kremaste konsistence, lahko pa tvorijo sluzaste kolonije, ki so podobne bakterijskim (Adamič in sod., 2003). Ker so zelo odporne proti sončni svetlobi in izsuševanju ter na velika odstopanja v območju vrednosti pH, so v naravi zelo razširjene. Najdemo jih v zemlji, vodi, zraku, rastlinah, živalih itd. (Adamič in sod., 2003; Jay, 1992).

Kvasovke v surovem mleku pasterizacija uniči. Mlečni izdelki, posebno siri, se s kvasovkami okužijo iz okolja, zraka, vode, površin in sten v sirarskih obratih (Chapman in Sharpe, 1990; Jay, 1992). Kot kvarljivci izločajo pline in s tem povzročijo značilen vonj po sadju in okus po kvasu (Davis in Wilbey, 1990). V mlekarški industriji kvasovke uporabljajo v kombinaciji z mlečnokislinskimi bakterijami pri izdelavi kefirja in kumisa (Wouters in sod., 2002). Mlečnokislinske bakterije povzročijo mlečno kislinsko fermentacijo, kvasovke pa alkoholno fermentacijo. Kvasovke imajo pomembno vlogo pri



podpiranju simbioze med prisotnimi mikroorganizmi, tvorbi CO<sub>2</sub> ter razvoju značilnega okusa in arome (Koroleva, 1988, cit po Wouters in sod., 2002).

### 2.3.2 Plesni

Plesni so heterotrofni mikroorganizmi brez fotosintetskih barvil, ki se hranijo z organskimi snovmi. Morfološko je plesen mrežasta struktura niti, ki na živilih tvori puhaste prevleke. Nitke, ki zrastejo iz spor, imenujemo hife. Fertilne hife služijo pri plesnih kot razmnoževalni organ, vegetativne hife pa služijo prehranjevanju in pritrditvi plesni. Hife so lahko submerzne, če so potopljene v substrat, ali substratne, če rastejo v zraku nad substratom. Preplet hif imenujemo micelij, ki lahko doseže velikosti nekaj mm (Adamič in sod., 2003). Kolonije so obarvane zaradi barvil, ki jih posamezne vrste tvorijo. Kolonije vrst rodu *Aspergillus* so zelene, rjave, rumene, kolonije vrst rodu *Fusarium* so bele ali rdeče, kolonije vrst rodu *Mucor* pa črne, modre ali zelene. Na osnovi morfoloških značilnosti kolonij na trdem gojišču in mikroskopskega pregleda nativnega preparata plesni, lahko izvedemo njihovo okvirno identifikacijo na nivoju rodu (Zalar in Gunde – Cimerman 2000; Samson in sod., 2000; Jeršek, 2002, cit. po Adamič in sod., 2003).

V surovem in pasteriziranem mleku se plesni največkrat pojavljajo kot kvarljivci, predvsem zaradi njihove lipolitične in proteolitične aktivnosti. Surovo mleko se s plesnimi okuži iz zraka in silirane krme, mlečni izdelki pa iz zraka, opreme, vode, slanice in prostora, kjer ga izdelujejo in hranijo (Fine Kure in sod; 2004; O'Brien in sod., 2005). V surovem mleku so najpogosteje zastopane plesni rodov *Geotrichum*, *Penicillium*, in *Monilia* (Kapun Dolinar, 2001), v sirih pa plesni rodov *Geotrichum* in *Penicillium* (Fine Kure in sod., 2004). Divji tipi plesni s svojo aktivnostjo vplivajo na organoleptične lastnosti sirov, tvorijo pa tudi strupene mikotoksine (Jordal in sod., 1993; Wouters in sod., 2002). Nekaterim sirom dodajo žlahtne plesni kot del starterskih kultur, da pridobijo značilen okus, aromo in teksturo. Na osnovi barve in rastnih lastnosti lahko razdelimo žlahtne plesni v bele in modre plesni. Tipi bele plesni *Penicillium camemberti* rastejo na površini sira kot sta Camembert in Brie, tipi modre plesni *Penicillium roqueforti* pa

rastejo v sirnem testu na primer sirov Requefort in Gorgonzola (Tomine, 1990, cit. po Wouters, 2002).

### 2.3.2.1 Plesni rodu *Aspergillus*

Plesni rodu *Aspergillus* spadajo med najpogostejše kvarljivce živil. Nekatere vrste tvorijo aflatoksine, ki so najbolj pomembni mikotoksini. Tvorijo še mnoge druge toksične sekundarne metabolite, kot so: ohratoksin, gliotoksin, fumitremogren, patulin, itd. Živilo, okuženo s plesnijo *Aspergillus*, ni primerno za uporabo (Adamič in sod., 2003).

### 2.3.2.2 Plesni rodu *Geotrichum*

V rod *Geotrichum* spada 23 vrst, za živila pa ja najpomembnejša vrsta *G. candidum*. Kot kvarljivec se pojavlja na paradizniku, suhi papriki, korenju, kumarah. Ta vrsta je izmed vseh plesni najpogosteje izolirana iz mleka in mlečnih izdelkov. Tvori proteolitične in lipolitične encime, ki razgrajujejo mlečne beljakovine in maščobo. Tako povzroči slabšo kakovost in krajšo obstojnost mleka ter mlečnih izdelkov. Ta plesen je problematična predvsem pri proizvodnji mehkih sirov, kot sta Brie in Camembert. Po drugi strani pa izbrani sevi v starterskih kulturah pripomorejo k zeleni aromi in okusu obeh vrst sirov (Tornadijo in sod., 1998; Wouters in sod., 2002; Adamič in sod., 2003).

### 2.3.2.3 Plesni rodu *Mucor*

Plesni tega rodu so razširjene in veljajo kot hitro rastoče glive. Sposobne so rasti v aerobnih in v anaerobnih pogojih. So pogosti kvarljivci sirov, mleka, mesa, krompirja pa tudi pijač (Adamič in sod., 2003).

#### 2.3.2.4 Plesni rodu *Penicillium*

Plesni rodu *Penicillium* so glede na veliko število vrst, ki lahko rastejo v različnih razmerah, najpomembnejši kvarljivci živil. Poleg zemlje so njihovo naravno okolje različne vrste žit, zelenjava, siri, meso itd. Veliko vrst tvori mikotoksine in druge sekundarne toksične metabolite. Nekatere vrste pa so industrijsko pomembne npr. v sirarstvu, v obratih za predelavo mesa in v farmaciji, v proizvodnji antibiotikov (Adamič in sod., 2003).

#### 2.3.2.5 Plesni rodu *Moniliella*

Njihov naravni habitat je okolje z nizkimi vrednostmi pH, zemlja, les, slanica, kis, sadni sokovi, mlečni izdelki. Značilno je, da na sirih tvorijo črne pike (Samson in sod., 2000).

### 2.3.3 Mikotoksini

Plesni, zlasti iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium* in *Fusarium*, lahko izločajo toksične sekundarne metabolite. Njihova prisotnost v mleku in mesu je pogosto posledica krmljenja krav molznic s plesnivo krmo. Večina mikotoksinov je termostabilnih, uniči jih šele segrevanje pri temperaturah 125-130°C (Kapun Dolinar, 2001). Mikotoksini rodu *Aspergillus* se imenujejo aflatoksini (Kapun Dolinar, 2001; Creppy, 2002). Najpogostejše vrste, ki tvorijo aflatoksine, so: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*, *A. rambellii*, itd. Vendar toksinov ne tvorijo vsi sevi omenjenih vrst plesni (Frisvald in sod., 2005; Creppy, 2002). Do sedaj so odkrili aflatoksin tip B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoksin tip B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoksin tip G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), aflatoksin tip G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) in aflatoksin tip M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>). *A. flavus* proizvaja samo AFB<sub>1</sub>, vrsti *A. fumigatus* in *A. nomius* pa AFB in G (Creppy, 2002). Po učinku so kancerogeni, teratogeni in mutageni. AFB<sub>1</sub> je najbolj toksičen. Leta 1993 je Mednarodna agencija za raziskavo raka (IARC) potrdila kancerogenost AFB<sub>1</sub> in AFM<sub>1</sub> (Bakirci, 2001). Lopez in sod. (2003), so z raziskavami dokazali, da je AFM<sub>1</sub>, kljub visoki strupenosti, vseeno 10 × manj toksičen kot AFB<sub>1</sub>.

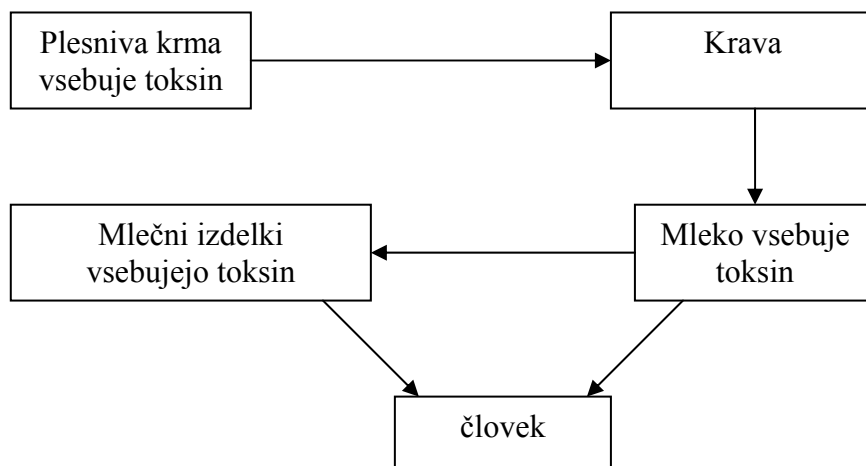
Vendar so akutna obolenja kot posledica uživanja aflatoksinov redka, saj bi bilo za njihovo povzročitev potrebno zaužiti veliko količino, s plesnijo okuženega živila, da bi v telo vnesli dovolj toksinov. Pomembnejša obolenja pri ljudeh so tista, ki so posledica uživanja manjših količin aflatoksinov daljši čas. Toksini se kopičijo v mišicah, srcu, predvsem pa v jetrih (Kapun Dolinar, 2001).

### 2.3.3.1 Aflatoksini v mleku in mlečnih izdelkih

Med prisotnostjo in količino AFB<sub>1</sub> v krmi in AFM<sub>1</sub> v mleku obstaja linearna odvisnost. Koncentracija AFM<sub>1</sub> v mleku je odvisna tudi od sezone (Wood, 1991; Dragacci in sod., 1995; Bakirci, 2001). Lopez in sod. (2003) in Kamkar (2005) so objavili, da je število kvasovk in plesni, s tem pa tudi koncentracija mikotoksinov v sirih, večja v zimskih mesecih, zaradi uporabe silirane krme. V spomladanskih in poletnih mesecih sta število kvasovk in plesni ter koncentracija mikotoksinov nižji, ker se za prehrano krav uporablja seno in sveža paša (Godič Torkar in Golc Teger, 2006; Blanco in sod., 1988; Lopez in sod., 2003; Kamkar, 2005). AFM<sub>1</sub> lahko najdemo v mleku, če je krava molznica zaužila krmo, kontaminirano s plesnijo *Aspergillus*, ki proizvaja AFB<sub>1</sub>. AFB<sub>1</sub> se v kravjih jetrih pretvori v AFM<sub>1</sub>, ta pa se preko mlečnih žlez izloča z mlekom. AFM<sub>1</sub> lahko odkrijejo v mleku že po 12 – 24 urah po prvem zaužitju krme, okužene z AFB<sub>1</sub> (Lopez in sod., 2003). AFM<sub>1</sub> se kljub pasterizaciji prenese iz mleka v sire in v sirotko (Bakirci, 2001; Kiermier in Buchner, 1977; Van Egmond in sod., 1977), ker je termostabilen (Lopez in sod., 2003; Gelosa in Buzzetti 1994, cit. po Galvano in sod., 1996.). Koncentracija AFM<sub>1</sub> je v mehkih sirih za 2,5 – 3,3 krat in v trdih sirih za 3,9 – 5,8 krat večja, kot je njegova koncentracija v mleku, iz katerega je bil sir narejen (Yousef in Marth, 1989; Bakirci, 2001). AFM<sub>1</sub> je vodotopen in se veže na kazein v siru (Dosako in sod., 1980, cit. po Bakirci, 2001).

Ker predstavlja AFM<sub>1</sub> nevarnost za zdravje ljudi, evropska in tudi slovenska zakonodaja predpisujeta maksimalno dovoljeno koncentracijo 0,05 µg AFM<sub>1</sub> v kg surovega mleka, mleka za proizvodnjo mlečnih izdelkov ali toplotno obdelanega mleka (Pravilnik o ..., 2003; European Community ..., 2001).

Najbolj pomembno je, da se krave molznice krmijo z zdravo, s plesnimi neokuženo krmo (Bakirici, 2001; Creppy, 2002).

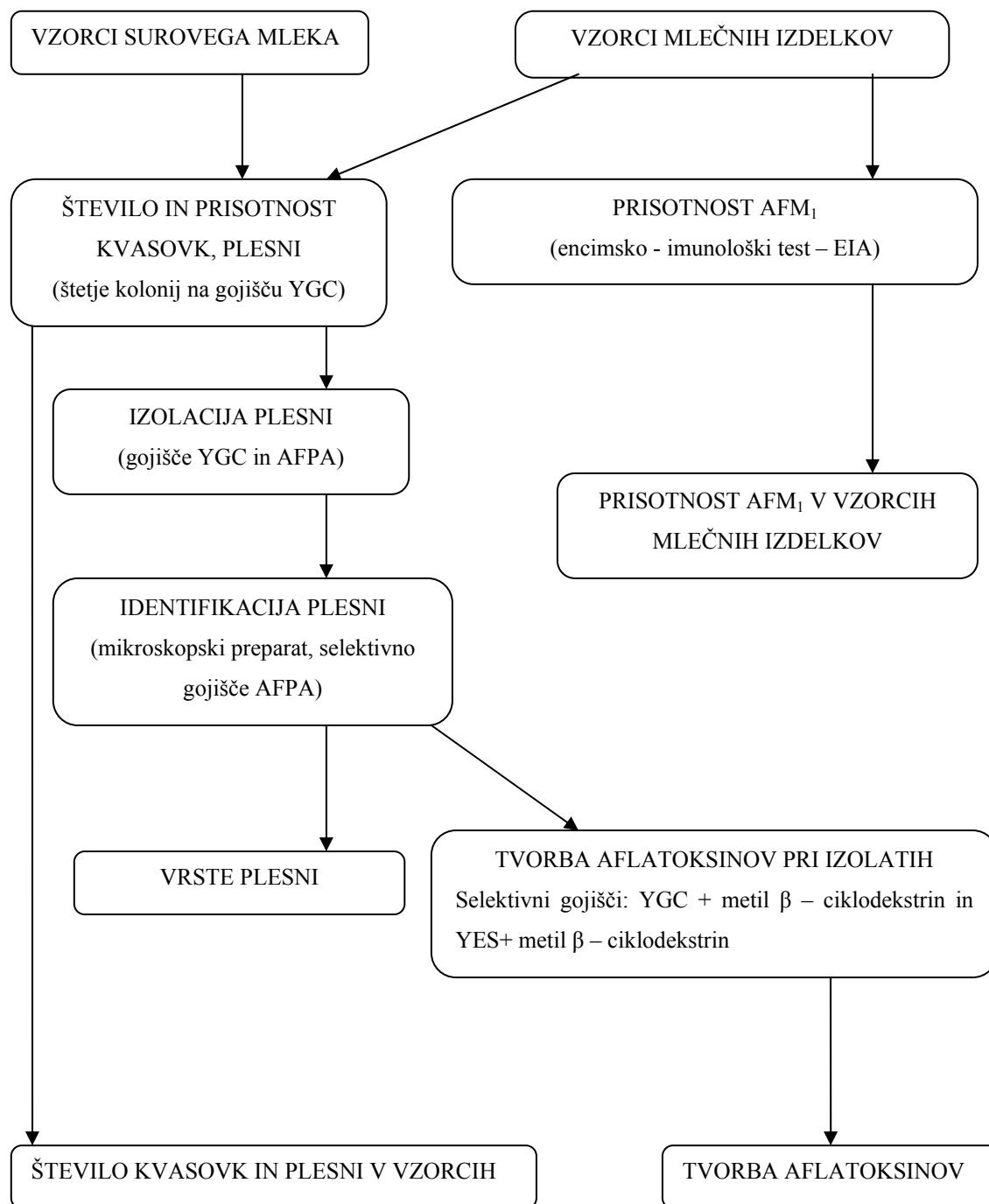


Slika 1: Prenos toksinov na človeka (Kapun Dolinar, 2001)

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK PREISKAVE IN SHEMA DELA

- V 60 vzorcih surovega mleka in 40 vzorcih mlečnih izdelkov smo ugotavljali število kvasovk in plesni s štetjem poraslih kolonij na selektivnem gojišču YGC (ISO 6611:2004/IDF 94:2004),
- na osnovi morfoloških značilnosti kolonij in mikroskopskega preparata smo izolirane seve uvrstili v rodove (Zalar in Gunde Cimerman, 2000),
- prisotnost vrst *Aspergillus flavus/parasiticus* smo preverjali na osnovi značilne rasti na selektivnem gojišču AFPA,
- tvorbo aflatoksinov pri izolatih *Aspergillus* smo ugotavljali na selektivnih gojiščih YGC in YES z dodatkom metil-beta ciklodekstrina,
- v vzorcih mlečnih izdelkov smo z encimsko - imunološko metodo Ridascreen<sup>®</sup> ugotavljali prisotnost AFM<sub>1</sub>.



Slika 2: Shema dela

## 3.2 VZORČENJE

- Mlečni izdelki

Štirideset vzorcev mlečnih izdelkov petih malih živilskih obratov za predelavo mleka smo odvzeli na eni izmed ljubljanskih tržnic. Vzorčili smo tako, da so bili enakomerno zastopani vzorci vseh proizvajalcev na tržnici in vsi predvideni tipi mlečnih izdelkov. V poskus je bilo zajetih 14 vzorcev skute, 13 vzorcev soljenih in nesoljenih mehkih sirov in 13 vzorcev poltrdih sirov iz kravjega mleka. Vzorci mehkih sirov so bili odvzeti brez slanice.

- Surovo mleko

Šestdeset vzorcev surovega mleka iz zbirnih bazenov posameznih proizvajalcev ali zbiralnic so sterilno odvzeli kontrolorji kmetijskih zadrug v območju Ljubljane in jih v hladni verigi dostavili v Laboratorij za mlekarstvo. Vzorci so bili preiskani v največ štirih urah po odvzemu.

Vzorčenje smo izvedli v obdobju od novembra leta 2004 do januarja leta 2005.

## 3.3 MATERIAL

### 3.3.1 Razredčevala

- Raztopina dikalijevega hidrogen fosfata

Sestava:

Dikalijev hidrogen fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	20,00 g
Destilirana voda	1000 ml

Raztopino smo uporabili za pripravo primarne suspenzije vzorcev mlečnih izdelkov. 20 % raztopino smo pripravili tako, da smo 20 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MERCK, Nemčija, 1.05104) dodali v 1000 ml destilirane vode (Mili Q) in premešali na magnetnem mešalu. Ko se je sol



raztopila, smo naravnali vrednost pH na  $7,5 \pm 0,2$  pri 25 °C. Za uravnavanje pH smo uporabili 1N HCl ali 1N NaOH. Razredčevalo smo sterilizirali 15 min pri temperaturi 121 °C (ISO 8261:2001/IDF 122:2001).

- Ringerjeva raztopina  $\frac{1}{4}$  jakosti

Ringerjevo raztopino smo uporabili za nadaljnje decimalno razredčevanje vzorcev mleka in primarne suspenzije vzorcev mlečnih izdelkov.

Sestava:

Natrijev klorid (NaCl)	2,25 g
Kalijev klorid (KCl)	0,105 g
Kalcijev klorid (CaCl <sub>2</sub> )	0,06 g
Natrijev hidrogen karbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	0,05 g
Destilirana voda	1000 ml

Za pripravo Ringerjeve raztopine  $\frac{1}{4}$  jakosti smo uporabili Ringerjeve tabletki (MERCK, Nemčija, 1.15525). Po dve tabletki smo raztopili v 1000 ml destilirane vode (Mili Q, Millipore, Danska), premešali na magnetnem mešalu, da so se tabletki raztopile in uravnali vrednost pH na  $6,9 \pm 0,1$  pri temperaturi 25 °C (Navodila proizvajalca Merck). Za uravnavanje pH smo uporabili 1N NaCl ali 1N NaOH. Po 9,4 ml raztopine smo z dispensorjem dozirali v epruvete. Epruvete z Ringerjevo raztopino smo sterilizirali 15 min pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji je bilo v epruveh 9,0 ml  $\pm 2$  % Ringerjeve raztopine. Ponovno smo preverili vrednost pH, ki je morala biti v predpisanem območju (ISO 8261:2001/IDF 122:2001).

### 3.3.2 Gojišča

- Gojišče YGC – Yeast Glucose Chloramphenicol agar

Gojišče YGC je selektivno gojišče za štetje in izolacijo kvasovk in plesni.

Sestava:

Kvasni ekstrakt	5,0 g
D –glukoza (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20,0 g
Kloramfenikol (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,1 g
Agar	14,9 g
Destilirana voda	1000 ml

40 g gojišča YGC v prahu (MERCK, Nemčija, 1.16000) smo raztopili v enem litru destilirane vode (mili Q). Gojišče smo raztapljali s segrevanjem v vodni kopeli, vendar ni smelo zavreti. Vrednost pH gojišča smo uravnali na  $6,6 \pm 0,2$ . Za uravnavanje smo uporabili 1N NaCl ali 1N NaOH. Gojišče smo razlili v manjše erlenmajerice po cca 200 ml in sterilizirali v avtoklavu 15 min pri temperaturi 121 °C (ISO 6611:2004/IDF 94:2004).

- Gojišče YGC + Metil β – ciklodekstrin

Gojišče smo uporabili za ugotavljanje tvorbe aflatoksinov pri izoliranih, na gojišču poraslih sevih plesni (Fente in sod., 2001; Ordaz in sod. 2003).

Sestava:

Gojišče YGC	4,0 g
Metil β – ciklodekstrin (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> ) 7 (CH <sub>3</sub> )	0,3 g
Natrijev deoksiholat	6,0 g
Destilirana voda	1000 ml

Raztopljenemu gojišču YGC (MERCK, Nemčija, 1.16000) smo dodali metil β – ciklodekstrin (SIGMA; Nemčija, C4555 – 1G) in uravnali vrednost pH na  $6,6 \pm 0,2$ . Po sterilizaciji smo gojišču aseptično dodali še 6 g natrijevega deoksiholata (SIGMA, Nemčija, D6750 – 25G), premešali in nato po 15 ml gojišča nalili v petrijeve posodice.

- Gojišče YES + Metil β – ciklodekstrin

Sestava:

Kvasni ekstrakt	20,0 g
Saharoza (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	150,0 g
Agar	20,0 g
Destilirana voda	1000 ml

Raztopljenemu gojišču YES (MERCK, Nemčija. 1.01613) smo dodali 0,3 g metil β – ciklodekstrina (SIGMA, Nemčija, C4555 – 1G), umerili pH na  $6,3 \pm 0,2$  in sterilizirali pri 121 °C 15 minut. Gojišče smo uporabili za ugotavljanje prisotnosti aflatoksinov plesni rodu *Aspergillus* (Samson in sod., 2000).

- Selektivno gojišče AFPA

Gojišče AFPA (OXOID, CM0713, Velika Britanija) je selektivno gojišče za izolacijo in delno identifikacijo plesni vrst *Aspergillus flavus* in *Aspergillus parasiticus*.

Sestava:

Pepton	10,0 g
Kvasni ekstrakt	20,0 g
Železov amonijev citrat	0,5 g
Dikloran	0,002 g
Agar	15,0 g
Destilirana voda	1000 ml

Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca Oxoid tako, da smo 22,75 g gojišča v prahu raztopili v 500 ml destilirane vode in segrevali v vodni kopeli, da se je gojišče popolnoma raztopilo in dodali 50,5 mg v 3 ml etanola (S PHARMACEUM, Slovenija) raztopljenega kloramfenikola (OXOID, Velika Britanija; SR0078). Kloramfenikol preprečuje rast bakterij. Vrednost pH smo uravnali na  $6,3 \pm 0,2$  in gojišče sterilizirali 15 minut pri temperaturi 121 °C (OXOID, Velika Britanija, 1990).

- Hranljivi bujon

To tekoče gojišče smo pripravili za zamrzovanje plesni.

Sestava:

Tripton	10,0 g
Mesni ekstrakt	5,0 g
Natrijev klorid	5,0 g
Destilirana voda	1000 ml

Sestavine, tripton (BIOLIFE, Italija, 412290), mesni ekstrakt (BIOCAR DIAGNOSTIC, Francija, A120 2HA) in natrijev klorid (NaCl) (MERCK, Nemčija, 1.06404), smo raztopili v destilirani vodi, segrevali v vodni kopeli in uravnali vrednost pH na  $7,2 \pm 0,2$  pri temperaturi 25 °C ter sterilizirali 15 minut pri temperaturi 121 °C; (priprava po navodilih BIOCAR DIAGNOSTICS, 5<sup>th</sup> ed.). Za zamrzovanje plesni smo sterilnemu hranljivemu bujonu dodali steriliziran glicerol (KEMIKA, Hrvaška, 0711901) v razmerju 9 : 1.

### 3.3.3 Reagenti za uravnavanje vrednosti pH gojišč in razredčeval

Priprava 1N NaOH: 8 g NaOH (MERCK, Nemčija, 1.06498)/200 ml destilirane vode.

Priprava 1N HCl: 9,38 ml 32 % HCl (MERCK, Nemčija, 1.00319)/100 ml destilirane vode.

### 3.3.4 Referenčni sevi

Seva *A. flavus* EXF 523 in *A. flavus* EXF 483 smo dobili iz zbirke ekstremofilnih mikroorganizmov Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete. *A. flavus* EXF 483 tvori aflatoksine.

### 3.3.5 Encimsko - imunološki test Ridascreen<sup>®</sup>

Test Ridascreen<sup>®</sup> (R - BIOPHARM, Nemčija, 04284) je hitri test za ugotavljanje prisotnosti aflatoksina M<sub>1</sub> v mleku in mlečnih izdelkih. V kompletu pripomočkov so priložene vse komponente, ki jih potrebujemo pri testu.

Komponente:

- mikrotiterska plošča s 96 epruветami,
- raztopine s standardnimi koncentracijami aflatoksina M<sub>1</sub> za pripravo umeritvene krivulje absorpcije. V kompletu je 6 stekleničk po 1,3 ml vsebine. V vsaki izmed njih je različna koncentracija AFM<sub>1</sub>. Prva vsebuje 0 ng/kg (zero standard), druga 5 ng/kg, tretja 10 ng/kg, četrta 20 ng/kg, peta 40 ng/kg in šesta steklenička 80 ng/kg aflatoksina M<sub>1</sub> v mleku v prahu,
- konjugat - v steklenički ga je 1,3 ml. Razredčenega smo dodali pri drugem, 60 minutnem inkubiranju vzorcev,
- substrat (7,0 ml) smo uporabili pri tretjem, zadnjem, 30 minutnem inkubiranju vzorcev,
- kromogen (7,0 ml) smo dodali skupaj s substratom pri zadnjem inkubiranju,
- stop raztopina (14,0 ml) - po inkubiranju smo dodali stop raztopino, ki je omogočila merjenje absorpcije največ eno uro po koncu inkubacije,
- pufer 1 (20 ml) in pufer 2 (12 ml),
- pufer za izpiranje je raztopina soli za izpiranje mikrotiterskih plošč. Reagent smo raztopili v 1000 ml destilirane vode.

Reagenti za pripravo vzorcev pri izvajanju analize Ridascreen<sup>®</sup>, ki niso vključeni v komplet:

- metanol (MERCK, Nemčija, 1.06009),
- n-heptan (MERCK, Nemčija, 1.04379),
- diklorometan (MERCK, Nemčija, 1.06050),
- etanol 96 % (S PHARMACEN, Slovenija),
- natrijev hidrogen fosfat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O) (MERCK, Nemčija, 106349),
- natrijev dihidrogen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O) (CARLO ERBA, Italija, 480137).

- PBS – pufer je raztopina soli v vodi. Dodali smo ga evaporiranim vzorcem sirov pri testu.

Sestava:

Natrijev hidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	0,55 g
Dinatrijev dihidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	2,85 g
Natrijev klorid (NaCl)	9,00 g
Destilirana voda	1000 ml

Po raztapljanju smo vrednost pH uravnali na 7,2. Sterilizacija ni potrebna.

### 3.3.6 Oprema

- avtoklav (Kambič, Slovenija),
- centrifuga (MIKRO 22R, Hittch zentrifuge),
- čitalec mikrotiterskih plošč (ELX 808 Bio-Tek Instruments, Inc. ZDA),
- dispensor (Biohit, Finska),
- evaporator (Liebisch Gebr, tip 5000-6201, Nemčija),
- gnetilnik ( INTERSCIENCE, Bag mikser, Francija),
- hladilnik (LTH, Slovenija),
- inkubator (LABO, Slovenija),
- magnetno mešalo (Tehtnica, Slovenija),
- mikrovalovna pečica (Bosch, Nemčija),
- pH meter (METTLER TOLEDO, MP 120, Švica),
- stresalnik (Tehtnica, Slovenija),
- tehtnica 1 (METTLER TOLEDO, EB 300M, Švica),
- tehtnica 3 (METTLER TOLEDO, P 1200, Švica),
- vodna kopel (LABO, Slovenija).

### **3.3.7 Potrošni material**

- Hachove epruvete s pokrovi in tesnili,
- bakto epruvete,
- erlenmajerice,
- nastavki za pipetiranje (Biohit) s pipetami,
- sterilne vrečke za gnetilnik (IVEL, 14050, Švica),
- epruvete endorf (2 ml) ( BRANDT, 780500, Nemčija),
- steklene pipete.

## **3.4 METODE DELA**

### **3.4.1 Izvajanje mikrobioloških preiskav**

Z mikrobiološkimi preiskavami smo ugotavljali število in prisotnost določenih vrst ali skupin mikroorganizmov v vzorcu mleka ali mlečnega izdelka. Delo v mikrobiološkem laboratoriju je potekalo pod sterilnimi pogoji, tako da ni bila možna okužba iz okolja. Pribor, ki smo ga uporabljali za delo, smo predhodno sterilizirali. Delovne površine in roke smo predhodno razkužili z ustreznim razkužilom. Mikrobiološke preiskave smo izvajali ob prižganem gorilniku.

### **3.4.2 Priprava vzorcev**

- Vzorci mleka

Vzorci mleka, namenjene za nadaljnje preiskave, smo pred pipetiranjem premešali 25 - krat v razdalji 30 cm. Vzorci se niso smeli peniti.

- Vzorci mlečnih izdelkov

Vsak vzorec je tehtal najmanj 250 g. Odvzeli smo povprečen vzorec tako, da smo skuto v originalni embalaži dobro premešali s sterilno žlico, vzorce mehkih sirov pa pregnetli. Poltrdi siri so bili brez skorje, zato smo vzorčili čez celotni prerez. 10 g vzorca smo v sterilnih pogojih natehtali v sterilne vrečke za gnetilnik in dolili 90 ml sterilne 20 % raztopine dikalijevega hidrogen fosfata. Vzorce z razredčevalom smo gnetli v gnetilniku 3 do 6 minut, da so se popolnoma homogenizirali. Vrečke s primarno suspenzijo vzorca (razredčitev  $10^{-1}$ ) smo pred izvajanjem preiskave še termizirali v vodni kopeli 10 minut pri temperaturi 45°C in premešali (ISO 8261:2001/IDF 122:2001).

### 3.4.3 Ugotavljanje števila kvasovk in plesni v vzorcih mleka in mlečnih izdelkov

Ker smo predvidevali, da je število mikroorganizmov v 1 ml vzorca mleka v večini primerov tako visoko, da bi ob neposredni nacepitvi vzorca, na gojišču po inkubaciji poraslo preveč kolonij, da bi jih lahko prešteli, smo vzorec razredčevali. Bistvo decimalnega razredčevanja je namreč v tem, da zmanjšamo število mikroorganizmov na enoto volumna in s tem omogočimo optimalni rezultat preiskave (Arsov, 1994). Vzorce mleka ali primarne razredčitve smo predhodno dobro premešali. Po končanem penjenju smo s sterilno pipeto odpipetirali 1 ml vzorca v epruveto z 9 ml Ringerjeve raztopine. Temperatura razredčevala je morala biti približno enaka testnemu vzorcu (18 – 20 °C), da ne bi prišlo do poškodbe mikroorganizmov. Ringerjevo raztopino z vzorcem smo cca 10 sekund mešali na mehanskem stresalniku. Dobili smo desetkratno razredčitev vzorca ( $10^{-1}$ ). Pri vzorcih mlečnih izdelkov je bila to primarna suspenzija vzorca v dikalijevega hidrogen fosfatu. Decimalno razredčitve smo dobili tako, da smo zmešali 1 ml osnovne razredčitve ( $10^{-1}$ ) z 9 ml Ringerjeve raztopine, 1 ml pa smo prenesli tudi v označene petrijeve posodice. S serijo decimalnega razredčevanja in prenašanja razredčitev v petrijeve posodice smo nadaljevali glede na predvideno število mikroorganizmov v vzorcu. Za vsak vzorec smo tako pripravili petrijeve posodice z dvema zaporednima decimalnima razredčitvama  $10^{-1}$  in  $10^{-2}$ . K vzorcem smo primešali 10 - 15 ml gojišča YGC s temperaturo 45 – 47 °C. Gojišča nikoli nismo nalili neposredno na vzorec. Ko se je



gojišče z vzorcem strdilo, smo petrijeve posodice obrnili na krovno stran in jih inkubirali 3 – 5 dni pri temperaturi 25 °C.

Po inkubaciji smo prešteli kolonije na vseh števnihi ploščah in rezultat preračunali po formuli (1). Rezultat smo izrazili v številu kolonijskih enot na 1 mililiter ali gram vzorca (KE/ml ali KE/g) (ISO 6611:2004/IDF 94:2004).

### 3.4.4 Štetje kolonij kvasovk in plesni na gojišču

Po inkubaciji smo prešteli porasle kolonije kvasovk in plesni. Med seboj smo jih ločili po zunanem izgledu. Kolonije kvasovk so površinske, gladke, bleščče, z gladkimi robovi, omejene rasti, kremaste ali rožnate barve. Plesni tvorijo najpogosteje hrapave, različno obarvane kolonije, z jasno vidnim micelijem. Sporangiji s sporami so različno obarvani, njihova obarvanost se spreminja s starostjo kolonije. Hife segajo v gojišče. Kolonije smo šteli na petrijevih posodicah s tisto razredčitvijo, kjer je na gojišču poraslo od 10 – 150 kolonij. Če je bilo število kolonij na gojišču manjše od 10, smo rezultat, pomnožen s stopnjo razredčitve, napisali kot ocenjena vrednost; če pa je bilo število poraslih kolonij na gojišču v posamezni petrijevi posodici večje od 150, smo rezultat označili kot nešteven in smo upoštevali rezultat na gojišču z višjo razredčitvijo vzorca (ISO 6611:2004/IDF 94:2004).

Preračun rezultatov:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \quad \dots(1)$$

$\sum C$  vsota vseh kolonij na petrijevih posodicah

$n_1$  število petrijevih posodic prve razredčitve

$n_2$  število petrijevih posodic druge razredčitve

$d$  razredčitveni faktor prve razredčitve ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...)

(ISO 6611:2004/IDF 94:2004)

### **3.4.5 Priprava izolatov plesni za identifikacijo**

Posamezne plesni smo precepili na gojišči YGC in AFPA ter inkubirali 3 - 5 dni pri temperaturi 25 °C (gojišče YGC), oziroma pri temperaturi 30 °C (gojišče AFPA). Če so posamezni izolati počasneje rasli, smo inkubacijo podaljšali. Izolate smo zamrznili v mešanici hranljivega bujona in glicerola na temperaturo – 18 °C. Identifikacijo smo izvedli na osnovi morfoloških značilnosti posameznih kolonij in s pomočjo primerjave slike mikroskopskega preparata s slikami in opisi, navedenimi v literaturi (Samson in sod., 2000).

### **3.4.6 Priprava nativnega preparata**

Na objektno stekelce smo kapnili majhno kapljico vode. S cepilno zanko smo odstranili delček roba kolonije skupaj s tanko plastjo agarja ter jo prenesli na objektno stekelce v kapljico vode. Čez preparat smo položili krovno stekelce in pri tem pazili, da se niso pojavili zračni mehurčki. Pripravljene preparate smo gledali s svetlobnim mikroskopom pri 100–kratni, 400–kratni in 1000–kratni povečavi.

### **3.4.7 Ugotavljanje prisotnost plesni vrst *A. flavus* in *A. parasiticus* na gojišču AFPA**

Posamezne tipe kolonij plesni, izoliranih iz vzorcev mleka in mlečnih izdelkov, ki so porasle na gojišču YGC, smo s cepilno zanko prenesli na pripravljeno selektivno gojišče AFPA in inkubirali 42 – 43 ur pri temperaturi 30 °C. Kolonije *A. flavus* /*parasiticus* so bile oranžno-rjave barve z oranžno cono, ki se je opazila na spodnji strani gojišča, pod kolonijami. Za kontrolo rasti značilnih kolonij smo uporabili referenčna seva *A. flavus* EXF 523 in *A. flavus* EXF 483.

### 3.4.8 Ugotavljanje tvorbe aflatoksinov pri izolatih plesni

Seve, ki so na gojišču AFPA tvorili značilne kolonije in referenčne seve *A. flavus* EXF 523 in *A. flavus* EXF 483 smo s cepilno zanko prenesli na gojišče YGC z dodanim metil β-ciklodekstrinom. Po desetdnevni inkubaciji pri temperaturi 28 °C smo ugotavljali značilno belo precipitacijsko cono pod UV svetlobo.

### 3.4.9 Ugotavljanje aflatoksina M<sub>1</sub> v vzorcih mlečnih izdelkov z encimsko-immunološko metodo Ridascreen®

- Princip dela:

Preskus temelji na reakciji antigen – protitelo. Epruvetke v mikrotiterskih ploščah so prekrte s specifičnimi protitelesi proti AFM<sub>1</sub>. Z dodajanjem standardov, z različnimi koncentracijami AFM<sub>1</sub> ali raztopin vzorcev, se na vezna mesta na protitelesih, pritrjenih na epruvetke, vežejo molekule AFM<sub>1</sub> proporcionalno, glede na njihovo koncentracijo v vzorcu. V naslednji stopnji se na še prosta protitelesa vežejo molekule konjugata, ki ga sestavlja toksin AFM<sub>1</sub> z vezanim encimom, nevezan konjugat pa se s spiranjem odstrani. Nato se v epruvete doda substrat s kromogenom, ki se z vezavo na encim obarva modro. Reagent, ki ustavi reakcijo, obarva raztopino rumeno. Intenzivnost obarvanosti raztopine, ki je obratno sorazmerna s koncentracijo AFM<sub>1</sub> v vzorcu, merimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 450 nm.

Priprava vzorca:

Prisotnost aflatoksina M<sub>1</sub> smo ugotavljali v vseh štiridesetih vzorcih mlečnih izdelkov. Vzorce smo nastrgali na kovinskem strgalniku in odtehtali 2 g vzorca v stekleničko s steklenimi vrelnimi kroglicami. Dodali smo 40 ml diklorometana in vse skupaj stresali 15 minut. Nastalo suspenzijo smo prefiltrirali skozi filter papir v Hachove centrifugirke po 10 ml. Filtrat smo evaporirali pod šibkim dušikovim pritiskom pri temperaturi 60 °C 60 – 90 minut, da je diklorometan iz vzorca popolnoma izhlapel. Vzorcju smo dodali 0,5 ml metanola, 0,5 ml pufru PBS in 1 ml heptana. Vse skupaj smo pretresli na stresalniku (vibromiksu) in centrifugirali 15 minut pri temperaturi 15 °C in številu vrtljajev 2700 g. Po

15 minutah sta se v centrifugirkah ločili heptanska in matanolna faza s PBS. Metanol in PBS sta ostala na dnu, zgornjo fazo heptana pa smo odstranili s pipeto. V ependorfove epruvete smo odpipetirali 100 µl vzorca iz metanolno–vodne faze in dodali 400 µl pufra 1 (razredčitev 1:5). 100 µl te raztopine smo uporabili za izvajanje metode Ridascreen<sup>®</sup>.

Izvajanje testa Ridascreen<sup>®</sup>:

Vsi reagenti so morali biti segreti na sobno temperaturo. Iz vsake ependorfove epruvete smo odpipetirali po 100 µl vzorca in prenesli v celice na mikrotiterski plošči, nežno premešali in dali inkubirati v temni prostor za 60 minut pri temperaturi 20 – 25 °C. Po eni uri inkubiranja smo vzorce odlili in sprali s pufrom za spiranje, dodali konjugat, ki smo ga predhodno pripravili iz encim konjugata in pufra 2 v razmerju 1:11. V vsako celico smo odpipetirali 100 µl konjugata in zopet inkubirali 60 minut pod istimi pogoji. Nato smo konjugat zlili iz epruvetk, sprali s pufrom za izpiranje in dodali 50 µl substrata ter 50 µl kromogena. Po 30 minutah inkubacije pri temperaturi 20 – 25 °C smo dodali v vsako epruvetko mikrotiterske plošče 100 µl stop reagenta in izmerili absorpcijo pri 450 nm. Slepí vzorec je bila epruveta brez vzorca (zrak). (Navodilo proizvajalca R – Biopharm, Ridascreen<sup>®</sup>, 2003).

Vsak vzorec smo analizirali dvakrat.

#### **3.4.10 Statistična obdelava podatkov**

Za statistično obdelavo smo uporabili statistični paket SAS/STAT 2000 iz programskega paketa SAS. Vse vrednosti, ki smo jih dobili po štetju mikroorganizmov na petrijevih ploščah ob koncu analiz, smo pretvorili v logaritemske vrednosti zato, da smo dobili normalno porazdelitev. Izračunali smo povprečne vrednosti, minimum, maksimum in standardni odklon. Za prikaz razmerij med logaritmskim številom kvasovk in plesni v vzorcih surovega mleka in vzorcih sirov smo izračunali parsonove korelacijske koeficiente.

## 4 REZULTATI

### 4.1 SUROVO MLEKO

Kvasovke so bile prisotne v 55 (91,6 %) in plesni v 39 (65 %) od 60 vzorcev surovega mleka. Povprečno število kvasovk je bilo 1,7 log<sub>10</sub>KE/ml, plesni 0,7 log<sub>10</sub>KE/ml. Minimalno število tako kvasovk kakor plesni je bilo < 1, maksimalno število kvasovk je doseglo 4,1 log<sub>10</sub>KE/ml, in plesni 3,1 log<sub>10</sub>KE/ml. Statistični parametri so navedeni v preglednici 1.

Preglednica 1: Število kvasovk in plesni v vzorcih surovega mleka (v KE/ml)

Statistični parametri	Kvasovke	Plesni
Povprečje	1,7	0,7
Min	≤ 0 <sup>a</sup>	≤ 0 <sup>a</sup>
Max	4,1	3,1
Sd	0,9	0,9

Min – minimalna vrednost, Max – maksimalna vrednost, Sd – standardni odklon

<sup>a</sup> število KE je bilo ≤ 1/ml vzorca

### 4.2 MLEČNI IZDELKI

Kvasovke in plesni, v koncentraciji večji kot 10 celic na gram (10 KE/g), smo ugotovili v 24 (60 %) izmed 40 vzorcev mlečnih izdelkov, proizvedenih v malih živilskih obratih za predelavo mleka.

Kvasovke so bile prisotne v 9 (64,3 %) od 14 vzorcev skute, v 11 (84,6 %) od 13 vzorcev mehkega sira in v 4 (30,8 %) od 13 vzorcev poltrdega sira.

Plesni so bile prisotne v 10 (71,4 %) vzorcih skute, 9 (69,2 %) vzorcih mehkega sira in v 5 (38,4 %) vzorcih poltrdega sira.

Pri vzorcih skute se je prisotnost plesni in kvasovk razlikovala pri treh primerih. Pri enem so bile prisotne kvasovke, odsotne plesni; pri drugih dveh pa ravno obratno. Pri dveh vzorcih poltrdega sira so bile prisotne kvasovke in ni bilo plesni, pri treh pa so bile prisotne samo plesni, brez kvasovk. V petih vzorcih mehkih sirov so bile prisotne le kvasovke.

Skuta: povprečno število kvasovk v vzorcih je bilo 3,0 log<sub>10</sub>KE/g, plesni pa 2,8 log<sub>10</sub>KE/g.

Mehki sir: povprečno število kvasovk v vzorcih je bilo 3,0 log<sub>10</sub>KE/g, plesni pa 2,2 log<sub>10</sub>KE/g.

Poltrdi sir: v vzorcih poltrdega sira je bilo število kvasovk in plesni najnižje. Do okužbe s kvasovkami in plesnimi je prišlo v 2 (15 %) vzorcih. Povprečno število kvasovk je bilo 1,5 log<sub>10</sub>KE/g, povprečno število plesni pa 1,3 log<sub>10</sub>KE/g.

Statistični parametri so navedeni v preglednicah 2 in 3.

Preglednica 2: Število kvasovk v vzorcih sira (v log<sub>10</sub>KE/g)

Statistični parametri	Vzorci			
	Skuta	Mehki sir	Poltrdi sir	Povprečje (vsi vzorci)
Povprečje	3,0	3,0	1,5	2,5
Min	≤ 1 <sup>b</sup>	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Max	5,9	5,2	5,2	5,9
Sd	1,9	1,3	1,2	1,6

Min - minimalne vrednosti, Max – maksimalne vrednosti, Sd – standardni odklon

<sup>b</sup> število KE je bilo ≤ 10/g vzorca

Preglednica 3: Število plesni v vzorcih sira (v log<sub>10</sub>KE/g)

Statistični parametri	Vzorci			
	Skuta	Mehki sir	Poltrdi sir	Povprečje (vsi vzorci)
Povprečje	2,8	2,2	1,3	2,1
Min	≤ 1 <sup>b</sup>	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Max	5,1	5,7	2,6	5,7
Sd	1,6	1,6	0,6	1,4

Min - minimalne vrednosti, Max – maksimalne vrednosti, Sd – standardni odklon

<sup>b</sup> število KE je bilo ≤ 10/g vzorca

Povprečno število kvasovk v 40 vzorcih sira je bilo 2,5 log<sub>10</sub>KE/g, povprečno število plesni pa 2,1 log<sub>10</sub>KE/g. Korelacijski koeficient med številom kvasovk in plesni v vzorcih surovega mleka in mlečnih izdelkov je bil  $r = 0,46$  ( $p < 0,0001$  – statistično značilna korelacija).

Ugotovili smo tudi razlike v številu kvasovk in plesni med izdelki posameznih proizvajalcev. Najvišje število kvasovk in plesni smo zasledili pri vzorcih proizvajalca A, najmanjše število kvasovk in plesni pa pri izdelkih proizvajalca E. Statistični parametri so navedeni v preglednicah 4 in 5.

Preglednica 4: Število kvasovk v vzorcih sira posameznih proizvajalcev (v log<sub>10</sub>KE/g)

Proizvajalci						
Statistični parametri	A	B	C	D	E	Povprečje (vsi proiz.)
Povprečje	4,0	2,9	2,9	2,1	1,1	2,5
Min	≤ 1 <sup>b</sup>	≤ 1	1,6	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Max	5,8	5,9	4,0	5,2	2,2	5,9
Sd	1,7	1,7	1,0	1,5	0,4	1,6

Min - minimalne vrednosti, Max – maksimalne vrednosti, Sd – standardni odklon

<sup>b</sup> število KE je bilo ≤ 10/g vzorca

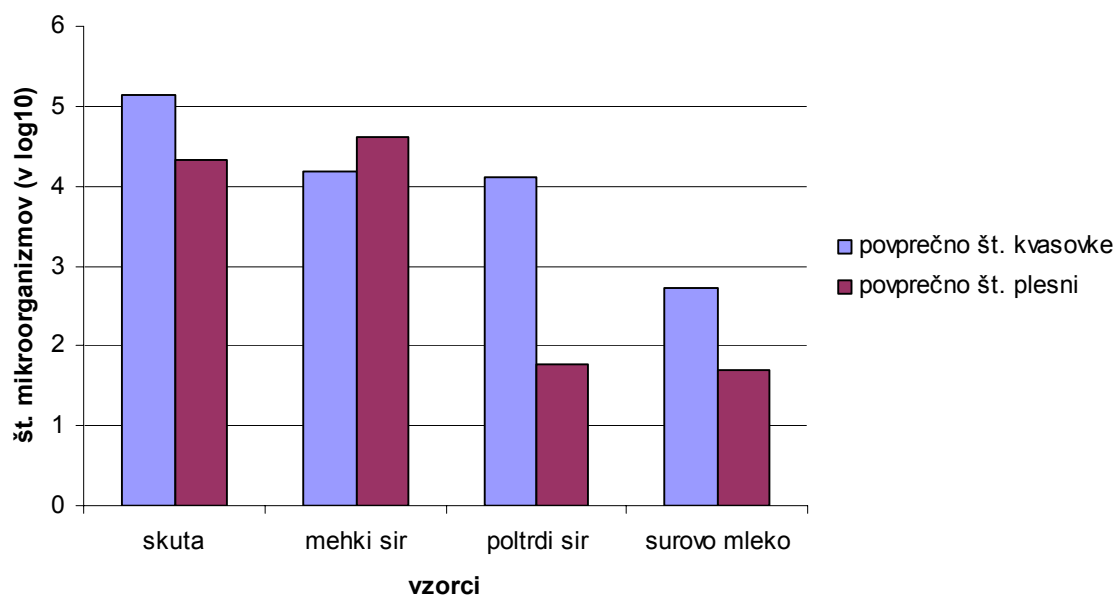
Preglednica 5: Število plesni v vzorcih sira posameznih proizvajalcev (v log<sub>10</sub>KE/g)

Proizvajalci						
Statistični parametri	A	B	C	D	E	Povprečje (vsi proiz.)
Povprečje	3,5	2,2	2,5	1,4	1,6	2,1
Min	≤ 1 <sup>b</sup>	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Max	5,7	5,1	4,0	4,2	2,8	5,7
Sd	1,9	1,6	1,1	1,0	0,8	1,5

Min – minimalna vrednost, Max – maksimalna vrednost, Sd – standardni odklon

<sup>b</sup> število KE je bilo ≤ 10/g vzorca





Slika 3: Povprečno število kvasovk in plesni v g vzorca sira in v ml vzorca surovega mleka, v log<sub>10</sub>

#### 4.3 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH SEVOV PLESNI

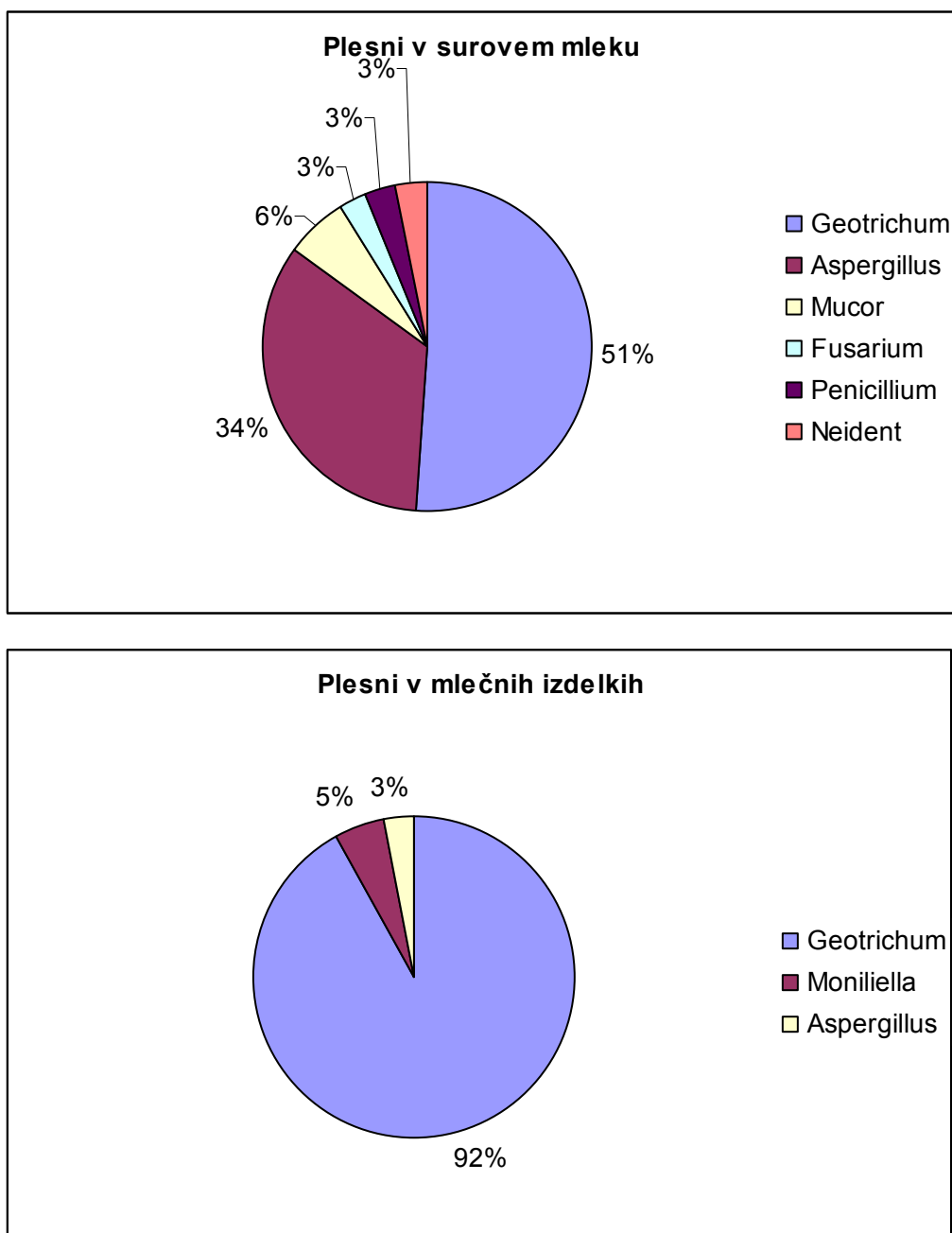
Izolirane plesni smo identificirali na podlagi morfoloških značilnosti kolonij na gojišču ter morfoloških značilnosti pod mikroskopom (Zalar in Gunde – Cimerman, 2000).

- Plesni rodu *Aspergillus* so bele, rjave, črne ali zelene barve in zelo hitro rastoče. Barva kolonij je odvisna tudi od vrste gojišča oziroma od substrata. Konidiofor izhaja iz zadebeljene bazalne celice in se zaključi z okroglo ali ovalno vrečko, ki se imenuje apeks. Iz apeksa izhajajo konidiogene celice, imenovane fialide. Na primarnih fialidah, ki so običajno ovalne oblike, so lahko okrogle sekundarne fialide. Na njih se tvorijo dolge verižice enoceličnih konidijev. Spore so najpogosteje okrogle (Adamič in sod., 2003).
- Plesni rodu *Geotrichum* tvorijo bele kolonije različne velikosti, z nizko in kompaktno strukturo, podobno kvasovkam (Adamič in sod., 2003).
- Plesni rodu *Mucor* tvorijo kolonije, ki so najprej bele barve, nato pa postanejo sive, črno-modre, zelene ali rjave. Imajo nizko kompaktno strukturo. Hife so

nepobarvane ali obarvane s svetlimi odtenki. Iz hif poženejo dolgi sporangiofori, ki se na koncu razširijo v okrogle vrečke, v katerih so sporangiji s sporangiosporami. Sporangiji so najprej svetli, kasneje pa se obarvajo rjavo, sivo ali črno (Adamič in sod., 2003).

- Za plesni rodu *Penicillium* so značilne hitro rastoče kolonije, ki so največkrat obarvane zeleno, lahko pa je zelena barva kombinirana z drugimi (siva, modra, rumena). Zračni micelij je nizek, podoben vati. Substratni micelij je septiran ter debelejši in temnejši od zračnega micelija. Septirani konidiofori posamično ali v parih izhajajo iz bazalnih celic substratnega micelija (Adamič in sod., 2003).
- Plesni rodu *Moniliella* tvorijo v rasti omejene, hrapave ali žametaste kolonije. Najprej so smetanaste barve, po daljši inkubaciji potemnijo do svetlo olivne ali črnkasto rjave barve. Spore so elipsoidne ali subcilindrične. Hife so razvejene, prozorne ali obarvane (Samson in sod., 2000).

Iz 15 (39,5 %) izmed 38 vzorcev surovega mleka smo izolirali dva ali več različnih tipov plesni, skupno 68 sevov, od tega 35 izolatov (51,5 %) rodu *Geotrichum*, 23 izolatov (33,8 %) rodu *Aspergillus*, 4 izolate (5,9 %) rodu *Mucor*, 2 izolata (2,9 %) rodu *Fusarium* in 2 izolata (2,9 %) rodu *Penicillium*. Ostalih 3 % preparatov nismo uspeli identificirati. Iz vzorcev mlečnih izdelkov smo izolirali 37 sevov, od tega 30 izolatov (91,9 %) rodu *Geotrichum*, 2 izolata (5,4 %) iz rodu *Moniliella* in 1 sev (2,7 %) iz rodu *Aspergillus*. Seve iz rodu *Geotrichum* smo izolirali iz 17 (89 %) vzorcev mlečnih izdelkov in sicer 9 izolatov iz vzorcev skute, 7 izolatov iz vzorcev mehkega sira in en izolat iz vzorca poltrdega sira.



Slika 4: Plesni v vzorcih surovega mleka in vzorcih mlečnih izdelkov

#### 4.3.1 Identifikacija plesni *A.flavus* / *parasiticus* na gojišču AFPA

Po nacepiti in inkubaciji vseh 105 izoliranih plesni na gojišče AFPA, porasle kolonije niso imele značilne živo oranžno - rjave barve na spodnji strani kolonij, ki je značilna za *A. flavus* in *A. parasiticus*. Iz tega smo sklepali, da ti dve vrsti plesni v mleku in mlečnih izdelkih nista bili prisotni.

#### 4.4 REAKCIJA TVORBE TOKSINOV NA GOJIŠČU YGC Z METIL $\beta$ – CIKLODEKSTRINOM

Rast seva *A. flavus* EXF 483, na gojišču YGC z metil  $\beta$ -ciklodekstrinom je povzročila jasno vidno belo precipitacijsko cono okoli kolonije. To je pokazatelj, da plesen proizvaja toksine. Pri sevu *A. flavus* EXF 523 bele cone nismo zasledili, iz česar smo sklepali, da plesen ne proizvaja toksinov. To je bilo v skladu z opisanimi lastnostmi obeh standardnih sevov. Po inkubaciji izoliranih plesni na gojišču YGC z metil  $\beta$ -ciklodekstrinom, okrog kolonij ni bilo vidne bele precipitacijske cone. Iz tega smo sklepali, da porasle plesni ne proizvajajo toksinov.

#### 4.5 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI AFM<sub>1</sub> V MLEČNIH IZDELKIH Z METODO RIDASCREEN<sup>®</sup>

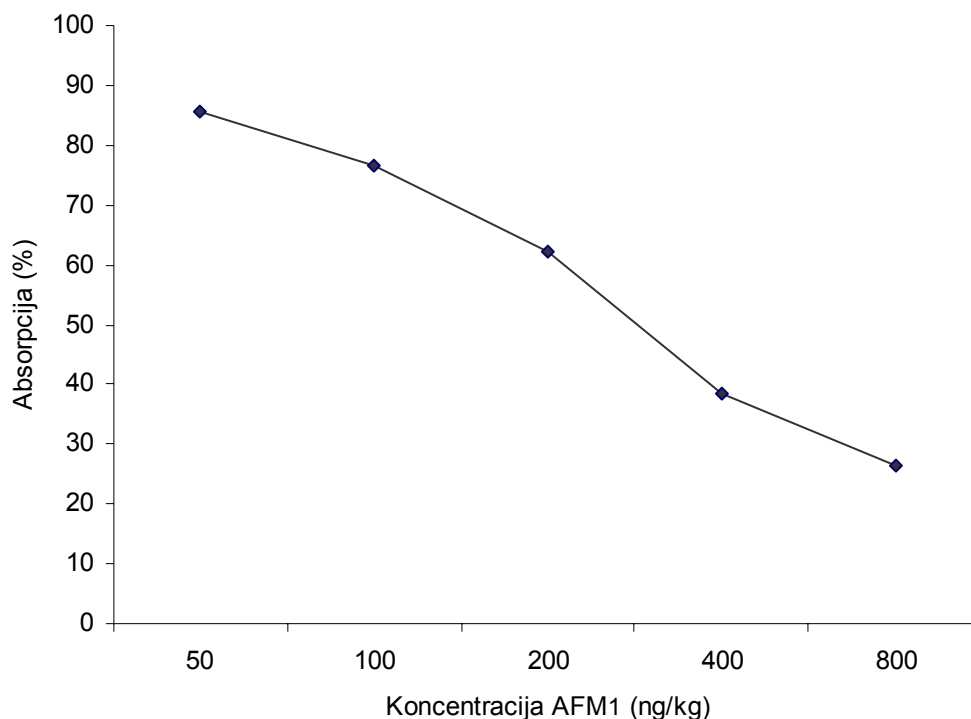
Prisotnost AFM<sub>1</sub> smo ugotavljali v 40 vzorcih mlečnih izdelkov. Vsak vzorec smo analizirali dvakrat. Rezultate smo odčitali s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo naredili na osnovi meritev standardnih raztopin AFM<sub>1</sub>. Umeritveno krivuljo smo naredili iz povprečne vrednosti štirikratnih meritev standardnih raztopin. Rezultate meritev vseh vzorcev in standardnih raztopin smo izračunali po formuli 2, kjer smo absorpcijo izračunali iz količnika absorpcije standarda, ki ne vsebuje AFM<sub>1</sub> in absorpcije standardov ter vzorcev. Rezultati so izraženi v %. Standard brez prisotnega AFM<sub>1</sub> daje po formuli 100 % absorpcijo.

$$\frac{\text{absorpcija vzorca}}{\text{absorpcija standarda 0}} \times 100 = \% \text{ absorpcije} \quad \dots(2)$$

Povprečne vrednosti absorpcije standardnih raztopin z ustreznimi koncentracijami AFM<sub>1</sub> so prikazane na sliki 1. Za vsak vzorec, z določeno izmerjeno absorpcijo, lahko s pomočjo umeritvene krivulje odčitamo ustrezno koncentracijo AFM<sub>1</sub>. V umeritveni krivulji je upoštevan faktor 10 zaradi razredčevanja vzorcev sira. Najmanjša koncentracija aflatoksinov M<sub>1</sub> v sirih, ki jo z metodo Ridascreen<sup>®</sup> zaznamo, je 50 ng/kg (navodilo proizvajalca R – Biopharm<sup>®</sup>), kar je bil tudi kriterij pri oceni pozitivnih rezultatov.

Preglednica 6: Vrednosti absorpcije standardnih raztopin (povprečna vrednost 4-ih meritev).

Oznaka standarda	S6	S5	S4	S3	S2	S1
Koncentracija AFM <sub>1</sub> (ng/kg)	800	400	200	100	50	0
Absorpcija (%)	26,5	38,4	62,1	76,4	85,7	100



Slika 5: Umeritvena krivulja absorpcije standardnih raztopin pri metodi Ridascreen<sup>®</sup> za merjenje koncentracije AFM<sub>1</sub> pri vzorcih sirov.

#### 4.5.1 Rezultati merjenja AFM<sub>1</sub>

Od 40 vzorcev mlečnih izdelkov smo z metodo Ridascreen<sup>®</sup> zaznali prisotnost AFM<sub>1</sub> v 4 vzorcih (10 %) s % absorpcije 84,54, 85,74, 84,94 in 81,92. Koncentracije le teh so bile nad 50 ng/kg AFM<sub>1</sub>. AFM<sub>1</sub> v koncentracijah nad 50 ng/kg je bil prisoten v 2 vzorcih skute, 1 vzorcu svežega sira in 1 vzorcu poltrdega sira. AFM<sub>1</sub> je bil prisoten v 3 izdelkih proizvajalca A in v enem izdelku proizvajalca E.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Vzorci surovega mleka in mlečnih izdelkov smo odvzeli v jesenskem in zimskem obdobju, ko je svežo pašo in seno zamenjala silirana krma. Blanco in sod. (1988), Kamkar (2005) ter Lopez in sod. (2003) namreč poročajo, da se število kvasovk, plesni ter koncentracija mikotoksinov v mleku poveča v letnih obdobjih z nižjo temperaturo in ob polaganju silirane krme.

Glede na dobljene rezultate smo ugotovili naslednje:

Kvasovke smo našli v 91,6 % in plesni v 65 % od 60 vzorcev surovega mleka. Povprečno število kvasovk ( $1,7 \log_{10}/\text{ml}$ ) v našem poskusu je bilo nižje kot rezultati Fadda in sod. (2004), ki so v mleku na kmetijah po Sardiniji ugotovili v povprečju  $2,64 \log_{10}/\text{ml}$  kvasovk. Ugotovili smo tudi nizko povprečno število plesni ( $0,7 \log_{10}/\text{ml}$ ). Vzroke za tako nizke vrednosti lahko iščemo v uporabi kakovostne krme, ustrezni higieni pri molži in čiščenju mlekarske opreme, v hitrem in intenzivnem hlajenju mleka itd. Iz surovega mleka smo izolirali plesni rodu *Geotrichum* (51,5 %), *Aspergillus* (33,8 %), *Mucor* (5,9 %), *Fusarium* (2,9 %) in *Penicillium* (2,9 %). Jodral in sod. (1993) so podali podobne rezultate najbolj pogosto izoliranih sevov iz surovega mleka: *Geotrichum* (76,5 %), *Fusarium* (43,3 %) in *Aspergillus* (32,2 %). O'Brien in sod., (2005) poročajo, da so v silirani krmi najbolj pogosto zastopane plesni rodu *Penicillium*, *Geotrichum*, *Fusarium* in *Mucor*, zato lahko predvidevamo, da so bile krave v našem poskusu krmljene s silirano krmo in so spore plesni prešle iz krme in okolja tudi v namolzeno mleko.

Kvasovke in plesni smo ugotovili v 60 % od 40 vzorcev mlečnih izdelkov. Izmed treh tipov mlečnih izdelkov (skuta – 14 vzorcev, mehki sir – 13 vzorcev, poltrdi sir – 13 vzorcev), je bila največja koncentracija kvasovk v skuti in mehkih sirih ( $3,0 \log_{10}/\text{g}$ ), manj pa v vzorcih poltrdega sira ( $1,5 \log_{10}/\text{g}$ ). Naši rezultati so primerljivi ali celo nižji od podobnih študij. Pereira Dias in sod. (2000) so v portugalskem ovčjem siru zasledili

kvasovke v koncentraciji od 2,7 do 6,4 log<sub>10</sub>/g vzorca. Povprečno število kvasovk v naših vzorcih je bilo 2,5 log<sub>10</sub>/g, za logaritem višje kot v vzorcih surovega mleka. Višja koncentracija kvasovk v mlečnih izdelkih je verjetno posledica neustreznih higienskih razmer med predelavo mleka. Robinson in Tamime (2002) poročata, da preidejo kvasovke v mleko in izdelke kot kvarljivci iz zraka, neprimerno vzdrževane mlekarske opreme ter slanice.

Plesni so bile prisotne v okoli 60 % vzorcev mlečnih izdelkov, podobno sliko najdemo tudi pri vzorcih surovega mleka (63,3 %), vendar je koncentracija plesni v sirih veliko višja (2,1 log<sub>10</sub>/g), kot v surovem mleku (0,7 log<sub>10</sub>/g). Ti rezultati potrjujejo okužbo iz okolja med predelavo mleka v mlečne izdelke (Godič Torkar in Golc Teger, 2004). Korelacijski koeficient med številom kvasovk in plesni v surovem mleku in mlečnih izdelkih je bil  $r = 0,46$  ( $p < 0,0001$  – visoko statistično značilna korelacija). Dopusčamo tudi možnost, da proizvajalci izdelujejo te mlečne izdelke iz surovega ali samo pri nižjih temperaturah termiziranega mleka, kar seveda kvasovk, zlasti pa spor plesni ne uniči. Tudi nizke vrednosti pH med fermentacijo ne vplivajo na zmanjšanje števila kvasovk in plesni. Optimalna pH vrednost za rast kvasovk je med 2,5 in 8,5, medtem ko imajo plesni še večji razpon, to je med 2 in 9 (Garbutt, 1997; Smole Možina in Bem, 2003).

Najvišje število plesni smo zasledili pri vzorcih skute (2,8 log<sub>10</sub>/g), v mehkem siru 2,2 log<sub>10</sub>/g, manj pa pri poltrdih sirih 1,3 log<sub>10</sub>/g. Razloge za razlike v koncentracijah lahko pripišemo razlikam v tehnoloških postopkih (termizacija, pasterizacija mleka, postopek fermentacije itd.). Ugotovili smo veliko odstopanje pri številu kvasovk in plesni pri posameznih vzorcih sirov, kar kažejo tudi veliki standardni odkloni.

Iz vzorcev mlečnih izdelkov smo izolirali plesni rodu *Geotrichum* (91,9 %), *Moniliella* (5,4 %) in *Aspergillus* (2,7 %). Plesen rodu *Geotrichum* je ena izmed najbolj pogosto izoliranih plesni iz mleka. Plesni rodov *Penicillium* in *Mucor* igrajo pomembno vlogo pri proizvodnji mlečnih izdelkov (Wouters in sod., 2002). Rezultati našega poskusa se ne ujemajo s trditvami Scotta (1989), Fine Kure in Skaarja (2000), da je rod *Penicillium* najbolj pogosta plesen v siru. Sledijo pa mu *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum* in *Mucor*. Predstavniki rodu *Penicillium* iz naših vzorcev sploh nismo izolirali, čeprav so



sposobni rasti tudi pri nizkih temperaturah. Rod *Aspergillus* je bil prisoten v najmanjšem obsegu (2,7 %). Eden izmed vzrokov za redko prisotnost plesni rodu *Aspergillus* je nezmožnost rasti pri nizkih temperaturah (nizka temperatura ohlajevanja mleka in zimski letni čas) (Bullerman, 1981; Godič Torkar in Vengušt, 2008). Ugotovili smo večjo raznolikost plesni v surovem mleku kot v mlečnih izdelkih. Vzorci mlečnih izdelkov so bili zbrani pri petih proizvajalcih, vendar zaradi specializiranosti nekaterih ponudnikov za določeno vrsto mlečnih izdelkov ni bilo mogoče vzorčiti pri vseh enakega števila in enakega tipa izdelka. Proizvajalca A in B sta usmerjena bolj v proizvodnjo skute in mehkih sirov in s tem je posledično večja okužba s kvasovkami in plesnimi kot pri proizvajalcu E, ki je usmerjen bolj v proizvodnjo poltrdih sirov. Proizvajalci A, B in C so ponujali izdelke slabše kakovosti kot D in E. Proizvajalec C pa je nudil izdelke z najslabšo mikrobiološko kakovostjo.

V našem poskusu nismo izolirali nobenega seva *A. flavus*, oziroma seva, ki bi tvoril aflatoksine. To potrjuje Scottove (1989) trditve, da se *A. flavus* redko pojavlja na sirih. Taki sevi tvorijo aflatoksine v sirih pri temperaturi višji od 10°C in  $a_w$  v območju 0,79. Z encimsko-imunološko metodo smo dobili rezultate o prisotnosti aflatoksina M<sub>1</sub> v vzorcih mlečnih izdelkov. Štirje (10 %) od 40 vzorcev sirov so bili pozitivni na vsebnost aflatoksina M<sub>1</sub> v koncentraciji višji od 50 ng/kg. Tri izmed štirih vzorcev, ki so vsebovali aflatoksine, smo odkupili pri proizvajalcu A. Sklepamo, da so krave molznice, katerih mleko uporablja za izdelavo mlečnih izdelkov, krmljene s krmo, kontaminirano s toksigenimi sevi *Aspergillus*. Ti tvorijo v krmi aflatoksin B<sub>1</sub>, ki se v kravjih jetrih pretvori v M<sub>1</sub> in izloči v mleko. Zato ni nujno, da je prisotnost AFM<sub>1</sub> povezana s pojavom plesni rodu *Aspergillus* v vzorcih mleka ali mlečnih izdelkov. Kamkar (2005) poroča o kar 82,5 % vzorcev mlečnih izdelkov, ki so vsebovali AFM<sub>1</sub>. Podobne rezultate so podali Sarimehmetoglu, Kuplulu in Celik (2004) iz Turčije, ki so odkrili AFM<sub>1</sub> v 81,75 % vzorcih mlečnih izdelkov. Lahko se pridružimo misli Vengušta, in sodelavcev (2003), da prisotnost AFM<sub>1</sub> v slovenskih sirih ne predstavlja velikega tveganja za zdravje ljudi, vendar je potrebno na tem področju nadaljevati z raziskavami.

## 5.2 SKLEPI

- Okoli 60 % vzorcev mlečnih izdelkov in kar 95 % vzorcev surovega mleka je bilo okuženih s kvasovkami in plesnimi, kar je verjetno posledica okužbe iz okolja, v katerem se mleko in mlečni izdelki pridobivajo in predelujejo;
- število kvasovk in plesni v vzorcih surovega mleka je bilo nižje kot v vzorcih mlečnih izdelkov;
- razlike se pojavljajo tudi med posameznimi vrstami izdelkov in med izdelki posameznih malih živilskih obratov za predelavo mleka;
- najvišje število kvasovk in plesni smo zasledili v skuti  $2,9 \log_{10}/g$ , manjše število pa je bilo v vzorcih poltrdih sirov in sicer  $1,4 \log_{10}/g$ ;
- V vzorcih surovega mleka je bilo povprečno število kvasovk  $1.7 \log_{10}/ml$  in plesni  $0,7 \log_{10}/ml$ ;
- značilne so bile velike razlike v številu kvasovk in plesni pri posameznih vzorcih sirov, kar kažejo veliki standardni odkloni;
- vzorci proizvajalca A so vsebovali najvišje število kvasovk in plesni, vzorci proizvajalca E pa najmanj,
- najpogosteje izolirana vrsta plesni je bila tako v mlečnih izdelkih (91 %) kot v surovem mleku (51 %) iz rodu *Geotrichum*;
- prisotnost aflatoksina M<sub>1</sub> smo z metodo Ridascreen<sup>®</sup> zasledili v 10 % vzorcev mlečnih izdelkov;
- priporočamo, da se kljub nizki okužbi mlečnih izdelkov z aflatoksinom M<sub>1</sub>, vsaj občasno preveri njihova prisotnost ter nadzoruje higiena okolja, krme in postopkov, v katerih se mleko pridobiva in predeluje v mlečne izdelke.

## 6 POVZETEK

V Sloveniji je veliko majhnih, samostojnih živilsko–predelovalnih obratov, kjer predelujejo mleko v različne mlečne izdelke, kot so skuta, siri, maslo itd., te pa prodajajo na tržnicah v mestih ali večjih krajih. Kakšna bo kakovost izdelanih mlečnih izdelkov, je odvisno predvsem od okolja, v katerem se mleko pridobiva in predeluje, krme, sezone, zdravja krav molznic, mikrobiološke kakovosti namolzenega mleka, temperature skladiščenja mleka in izdelkov, higiene mlekarskih pripomočkov, higiene molznika in sirarja itd.

Namen našega dela je bil ugotoviti prisotnost kvasovk in plesni v 40 vzorcih mlečnih izdelkov in 60 vzorcih surovega mleka. Izdelki so bili odvzeti pri prodajalcih petih malih živilskih obratov za predelavo mleka, ki so ponujali svoje izdelke na eni izmed ljubljanskih tržnic. Vzorce surovega mleka so odvzeli kontrolorji kmetijskih zadrug iz zbiralnih bazenov v območju ljubljanske regije. Večjo pozornost smo posvetili plesnim rodu *Aspergillus*, saj nekateri sevi proizvajajo sekundarne toksične metabolite imenovane aflatoksini, ki so zdravju škodljivi. Prisotnost aflatoksina M<sub>1</sub> smo ugotavljali v vzorcih mlečnih izdelkov. Okoli 60 % vzorcev mlečnih izdelkov in okoli 95 % vzorcev surovega mleka je vsebovalo kvasovke in plesni. Povprečno število plesni se je pri vzorcih skute in mehkega sira gibalo v območju od 2,8 do 2,2 log<sub>10</sub>/g in je bilo precej višje kot pri vzorcih poltrdih sirov s povprečjem 1,3 log<sub>10</sub>/g. Število kvasovk je bilo v vzorcih skute in mehkih sirov enako (3,0 log<sub>10</sub>/g), medtem ko je bilo povprečno število pri vzorcih poltrdih sirov precej nižje (1,5 log<sub>10</sub>/g). Povprečno število plesni v surovem mleku je bilo 0,7 log<sub>10</sub>/ml, medtem ko je bilo število kvasovk višje (1,7 log<sub>10</sub>/ml). Povprečno število kvasovk v vzorcih surovega mleka je bilo nižje, število plesni pa višje v primerjavi z vzorci mlečnih izdelkov. Ugotovili smo tudi razlike v številu kvasovk in plesni v vzorcih sira različnih proizvajalcev. Izmed 105 izoliranih sevov plesni iz vzorcev surovega mleka in vzorcev mlečnih izdelkov, je kar 47,6 % sevov pripadalo rodu *Geotrichum* spp. Poleg plesni rodu *Geotrichum* (51,5 %) smo iz mleka izolirali še rodove *Aspergillus* (33,8 %), *Mucor* (5,9 %), *Fusarium* (2,9 %) in *Penicillium* (2,9 %), iz mlečnih izdelkov pa rodove plesni *Geotrichum* (91 %), *Moniliella* (5,4 %) in *Aspergillus* (2,7 %). V vzorcih surovega mleka

je bila raznolikost plesni večja. Izolirane seve plesni *Aspergillus* nismo mogli uvrstiti v vrsti *A. flavus/parasiticus* in niso tvorili aflatoksinov. S hitrim testom Ridascreen<sup>®</sup> smo pri 4 od 40 vzorcev mlečnih izdelkov ugotovili nedovoljeno koncentracijo aflatoksina M<sub>1</sub>.

## 7 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–45
- Arsov A. 1994. Opis postopka izvedbe mikrobiološke analize (ISO 6611:1992). V: Seminar. Standardizacija analitike in predstavitev nekaterih najpomembnejših postopkov v mlekarški mikrobiologiji, Domžale, 16–17 feb. 1994 (neobjavljeno)
- Bajt N., Golc Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 142 str.
- Bakirci I. 2001. A study on the occurrence of aflatoksin M<sub>1</sub> in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control*, 12, 1: 47–51
- Biocar Diagnostics. Products of Microbiology. 5<sup>th</sup> edition. Hechtelsebaan, Rosseels printing: 175 str.
- Blanco J.L., Dominguezs L., Gomez – Lucia E., Garayzabal J.F.F., Garcia J.A., Suarez G. 1988. Presence of aflatoksin M<sub>1</sub> in commercial ultra – high temperature treated milk. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 6: 1622–1623
- Bramley A.J., McKinnon C.H. 1990. The Microbiology in Raw Milk. V: Dairy Microbiology Handbook. Second edition. Robinson R.K. (ed). New York, John Wiley and Sons: 261–208
- Bullerman L.B. 1981. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 64, 12: 2439–2452
- Chapman H.R., Sharpe M.E. 1990. Microbiology of cheese. V: Dairy Microbiology. Robinson R.K. (ed). London and New Jersey, Applied Science Publishers: 203–290
- Creppy E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 1–3: 19–28
- Davis J.G., Wilbey R.A. 1990. Microbiology of cream and dairy desserts. V: Dairy Microbiology. Robinson R.K. (ed.). London and New Jersey, Applied Science Publishers: 41–108
- Dorđević J. 1982. Mleko. Beograd, BIGZ: 278 str.
- Dragacci S., Gleizes E., Fremi J.M., Candlish A.A.G. 1995. Use of immunoaffinity chromatography as a purification step for the determination of aflatoksin M<sub>1</sub> in cheese. *Food Control*, 12: 59–65

- European Community Comments for the codex committee on food additives and contaminants, Beijing, Peoples` s of China, 20-24 March 2000, CL 1999/13-GEN – CX 0016 FAC – Agenda item 16a, Draft Maximum Level for Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. Anex 1: Maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities. L77/6, 16.3.2001.
- Fadda M.E., Mossa V., Pisano M.B., Deplano M., Cosentino S. 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. International Journal of Food Microbiology, 95, 1: 51–59
- Fente C.A., Ordaz J., Vazquez B.I., Franco C.M., Cepida A. 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin – producing *Aspergillus* strains. Applied and Environmental Microbiology, 67, 10: 4858–4862
- Fine Kure C., Skaar I. 2000. Mould growth on the Norwegian semi – hard cheeses Norvegia and Jarlsberg. International Journal of Food Microbiology, 62, 1–2: 133–137
- Fine Kure C., Skaar I., Brendehaug J. 2004. Mould contamination in production of semi – hard cheese. International Journal of Food Microbiology, 93, 1: 41–49
- Frisvald J.C., Skouboe P., Samson R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin and 3 – O – methyl – sterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. Systematic Applied Microbiology, 28, 5: 442–453
- Galvano F., Galofaro V., Galvano G. 1996. Occurrence and stability of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products. Journal of Food Protection, 59, 10: 1079–1090
- Garbut J. 1997. Essential of food microbiology. London, Arnold International: 288 str.
- Godič Torkar K., Golc Teger S. 2004. The microbiological quality of some critical control points in the cheese production of individual slovenian cheese – makers. Acta Agriculturae Slovenica, 84, 1: 43–61
- Godič Torkar K., Golc Teger S. 2006. The presence of some pathogen microorganisms, yeasts and moulds in cheese samples produced at small dairy – processing plants. Acta Agriculturae Slovenica, 88, 1: 37–51
- Godič Torkar K., Vengušt A. 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk and cheese in Slovenia. Food control, 19, 6: 570-577
- ISO 6611:2004/IDF 94:2004. Milk and milk products – Enumeration of colony – forming units of yeasts and / or moulds – Colony – count technique at 25 degrees. Genova, International Organization for Standardization, Switzerland: 8 str.

- ISO 8261:2001/IDF 122:2001. Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination. Genova, International Organization for Standardization, Switzerland: 1–12
- Jay J.M. 1992. Modern Food Microbiology. 4th edition. New York, Chapman & Hall: 720 str.
- Jordal M., Linan E., Acosta I., Gallego C., Rojas F., Bentabol A. 1993. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. International Journal of Food Microbiology, 18, 2: 171–174
- Kamkar A. 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in Iranian Feta cheese. Food control, 16, 7: 593–600
- Kapun Dolinar A. 2001. Mikrobiologija. Ljubljana, Zavod republike Slovenije za šolstvo: 269 str.
- Kiermier F., Buchner M. 1977. Distribution of aflatoxin M<sub>1</sub> in whey and curd during cheese processing. Zeitschrift fur Lebensmittel – Untersuchung und Forschung, 164, 2: 82–86
- Lopez C., Ramos L., Ramadan S., Bulacio L. 2003. Presence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk for human consumption in Argentina. Food Control, 14, 1: 31–34
- Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 118 str.
- O'Brien M., O'Kiely P., Forristal P.D., Fuller H.T. 2005. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. Microbiological Letters, 247, 2: 131–135
- Ordaz J.J., Fante C.A., Vazquez B.I., Franco C.M., Capeda A. 2003. Development of a method for direct visual determination of aflatoxin production by colonies of the *Aspergillus flavus* group. International Journal of Food Microbiology, 83, 2: 219–225
- Ouwenhand A. C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Salminen S., Von Wright A. (eds.). New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker: 139–159
- Pravilnik o onesnaževalcih v živilih. Ur. l. RS št. 69-3323/03
- Pereira Dias S., Potes M.E., Marinho A., Malfeito Ferrera M., Loureiro 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewe's cheese. International Journal of Food Microbiology, 60, 1: 55–63
- RIDASCREEN® Aflatoxin M<sub>1</sub> – Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of aflatoxin M<sub>1</sub>. 2003. Darmstadt, R– Biopharm: 25 str.
- Robinson R.K., Tamime A.Y. 2002. Maintaining a clean working environment. V: Dairy Microbiology Handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Robinson R. K. (ed). New York, John Wiley and Sons: 561–592

- 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
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole – Možina S., Gašperlin L. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541–578
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.S., Filtenborg O. 2000. Introduction to food – and airborne fungi. 6<sup>th</sup> edition. Utrecht, CBS, Centraalbureau Voor Schimmelcultures: 31 str.
- Sarimehmetoglu B, Kaplulu O, Celik T.H. 2004. Detection of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese samples by ELISA. Food control, 15, 1: 45–49
- Smole Možina S., Bem Z. 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole – Možina S., Gašperlin L. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47–86
- Scott P.M. 1989. Micotoxigenic fungal contaminants of dairy products. V: Micotoxins in dairy products. Van Egmont H. P. (ed.). New York, Elsevier Science Publishers: 194–235
- Tornadijo M.E., Fresno J.M., Sermiento R.M., Carballo J. 1998. Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheese from raw goat's milk. Le Lait, 78, 6: 647–659
- Van Egmond H.P., Paulsch W.E., Schuller P.L. 1977. The effect of processing on the aflatoxin M<sub>1</sub> content of mil and milk products. Pasteur, 3, 4: 381–390
- Vengušt A., Tavčar Kalcher G., Pestevšek U., Vrtač K. 2003. Aflatoxin in food of animal origin. V: Milk in dairy products, Book of Abstracts in European Dairy Congress 2003, Portorož, Slovenia, 15–18 nov 2003. Domžale, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department: 48
- Wood G.E. 1991. Aflatoxin M<sub>1</sub>. V: Mycotoxins and phytoalexins. Sharma R.P., Salunkhe D.K. (eds.). London, CRC Inc.: 145–163
- Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., Smit G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12, 2–3: 91–109
- Yousef A.E., Marth E.H. 1989. Stability and degradation of aflatoxin M<sub>1</sub>. V: Micotoxins in dairy products. Van Egmont H. P. (ed.). London and New York, Elsevier Applied Science: 127–161
- Zalar P., Gunde – Cimerman N. 2000. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba: 94 str.



## **ZAHVALA**

Posebna zahvala mentorici doc. dr. Karmen Godič Torkar za vso pomoč, strokovne nasvete ter spodbude in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Stanislavi Golc Teger za nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Ireni Rogelj za recenziranje in predsedniku komisije doc. dr. Silvestru Žgurju za pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se dr. Klemenu Potočniku za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se tudi dr. Zalar iz Biologije za standardne seve, ter gospe Alenki Levart iz Inštituta za prehrano za pomoč pri pripravi vzorcev.

Zahvaljujem se dr. Nataši Siard za pregled in bibliografsko ureditev diplomske naloge, ter gospe Karmeli Malinger za lektoriranje izvlečka.

Zahvaljujem se staršem, ki so mi omogočili študij in me pri tem vzpodbujali.

Hvala vsem, ki me imajo radi in so mi v času študija stali ob strani.

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Janja RUČNA

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KVASOVK, PLESNI  
IN AFLATOKSINA M<sub>1</sub> V MLEKU IN MLEČNIH  
IZDELKIH**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2008

