Primjena metode protočne citometrije i MALDI_TOF tehnike za određivanje psihotrofnih bakterija u sirovom mlijeku

Pavičić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:167601

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

PRIMJENA METODE PROTOČNE CITOMETRIJE I MALDI-TOF TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE PSIHROTROFNIH BAKTERIJA U SIROVOM MLIJEKU

DIPLOMSKI RAD

Dora Pavičić

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

PRIMJENA PROTOČNE CITOMETRIJE I MALDI-TOF TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE PSIHROTROFNIH BAKTERIJA U SIROVOM MLIJEKU

DIPLOMSKI RAD

Dora Pavičić

Mentor: Doc. dr. sc. Nataša Mikulec

Neposredni voditelj: Dr. sc. Snježana Kazazić

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Dora Pavičić**, JMBAG 01780099853, rođen/a dana 04. veljače 1996. godine u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

PRIMJENA PROTOČNE CITOMETRIJE I MALDI-TOF TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE PSIHROTROFNIH BAKTERIJA U SIROVOM MLIJEKU

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice Dore Pavičić, JMBAG 0178099853, naslova

PRIMJENA PROTOČNE CITOMETRIJE I MALDI-TOF TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE PSIHROTROFNIH BAKTERIJA U SIROVOM MLIJEKU

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1. Doc. dr. sc. Nataša Mikulec	mentor	_____
Dr. sc. Snježana Kazazić	neposredni voditelj	_____
2. Prof. dr. sc. Neven Antunac	član	_____
3. Prof. dr. sc. Samir Kalit	član	_____

Zahvala

Veliku zahvalnost, prije svega dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Nataši Mikulec na sugestijama, korisnim savjetima, razumijevanju i pruženoj podršci pri izradi ovog diplomskog rada.

Također veliku zahvalu dugujem i svojoj neposrednoj voditeljici dr. sc. Snježani Kazazić na pomoći u identifikaciji uzoraka MALDI-TOF tehnikom na Institutu Ruđer Bošković. Veliko hvala na izdvojenom vremenu i korisnim savjetima u izradi ovog diplomskog rada.

I na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene za vrijeme studiranja diplomskog studija. Najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima. Ovaj rad posvećujem baš Vama, koji ste mi pružali najveću podršku i omogućili mi studiranje.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj rada 2

2. Psihrotrofne bakterije 3

2.1. Gram negativne psihrotrofne bakterije 3

2.1.1. *Pseudomonas* spp. 3
2.1.2. Porodica *Enterobacteriaceae* 4

2.2. Gram pozitivne psihrotrofne bakterije 5

2.2.1. *Bacillus* spp. 5
2.2.2. *Clostridium* spp. 6

2.3. Prisutnost psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku 7

2.4. Izvori kontaminacije 8

2.5. Promjene sastava sirovog mlijeka uzrokovanih povišenim brojem psihrotrofnih bakterija 9

2.6. Metode određivanja psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku 11

2.6.1. Klasična metoda određivanja psihrotrofnih bakterija u mlijeku 11
2.6.2. Metoda protočne citometrije 13

3. MALDI-TOF tehnika identifikacije psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku 16

3.1. Spektrometrija masa 16

3.2. MALDI tehnika 17

3.3. MALDI-TOF analizator mase s vremenom leta 18

3.4. Postupak uzorkovanja MALDI-TOF tehnikom 19

4. Materijali i metode rada 21

4.1. Uzorkovanje i analiza mlijeka 21

4.2. Referentna metoda određivanja broja bakterija na čvrstom hranilištu 21

4.3. MALDI-TOF tehnika identifikacije psihrotrofnih bakterija 24

5. Rezultati i rasprava 28

5.1. Rezultati metode protočne citometrije 28

5.2. Rezultati MALDI-TOF tehnike u identifikaciji psihrotrofnih bakterija 30

6. Zaključak 44

7. Popis literature 45

8. Prilog 47

Životopis 78

Sažetak

Diplomskog rada studentice Dora Pavičić, naslova

PRIMJENA PROTOČNE CITOMETRIJE I MALDI-TOF TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE PSIHROTROFNIH BAKTERIJA U SIROVOM MLIJEKU

Psihrotrofne bakterije u pravilu čine >70-90% ukupno prisutne mikrobne populacije u ohlađenom sirovom mlijeku. Za mljekarsku industriju od presudne je važnosti brzo određivanje broja psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku. U 30 uzoraka sirovog mlijeka određivao se ukupan broj psihrotrofnih bakterija metodom protočne citometrije referentnom metodom prema međunarodnoj normi HRN ISO 6730. Identifikacija i klasifikacija bakterija provodila se usporedbom MALDI-TOF spektra masa s referentnim spektrima pohranjenim u bazi podataka i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa. MALDI-TOF tehnikom u ohlađenom sirovom mlijeku identificirano je 20 rodova i 35 bakterijskih vrsta. MALDI-TOF tehnika pokazala se prikladnom za brzu i točnu identifikaciju psihrotrofnih bakterija uzgojenih na hranjivoj podlozi, te u kombinaciji s metodom protočne citomerije pruža sveobuhvatniji uvid u mikrobiologiju sastava sirovog mlijeka.

Ključne riječi: sirovo mlijeko, psihrotrofne bakterije, protočna citometrija, MALDI-TOF tehnika

Summary

Of the master's thesis – student Dora Pavičić**,** entitled

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY AND MALDI-TOF TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF PSYCHROTROPHIC BACTERIA IN RAW MILK

Psychrotrophic bacteria generally make up > 70-90% of the total microbial population present in refrigerated raw milk. For the dairy industry, it is crucial to quickly determine the number of psychrotrophic bacteria in raw milk. In 30 raw milk samples, the total number of psychrotrophic bacteria was determined by flow cytometry by reference method according to HRN ISO 6730. The identification and classification of bacteria was performed by comparing the MALDI-TOF mass spectra with the reference spectra stored in the database and processed using the MALDI Biotyper computer program. The MALDI-TOF technique in refrigerated raw milk identified 20 genus and 35 bacterial species. The MALDI-TOF technique has proven to be suitable for the rapid and accurate identification of psychrotrophic bacteria grown on a nutrient medium and in combination with the flow cytometry method, provides a more comprehensive insight into the microbiology of raw milk composition.

Keywords: raw milk, psychrotrophic bacteria, flow cytometry, MALDI-TOF technique

1. Uvod

Sirovo mlijeko je idealni medij za rast mnogih mikroorganizama sadržavajući veliku koncentraciju vode i korisnih nutrijenata te gotovo neutralan pH (6.4 - 6.8). Svojim sastavom prvenstveno mliječnim šećerom (laktoza) te mliječnom masti, citratima i proteinima predstavlja neiscrpan izvor hrane za mikrobnu populaciju. Mikroorganizmi koji se pojavljuju u sirovom mlijeku potječu iz prirodnog okruženja proizvodnje mlijeka. Tlo, stelja, onečišćena voda i hrana, nečiste životinje i neadekvatno korištenje i čišćenje muznog uređaja mogu biti uzročnici pojave različite mikrobne populacije u sirovom mlijeku. Od ukupno prisutne mikrobne populacije u ohlađenom sirovom mlijeku, psihrotrofne bakterije u pravilu čine > 70 – 90% te predstavljaju skupinu različitih bakterijskih vrsta koje rastu pri temperaturama između 2 °C i 6 °C. Tijekom hlađenja i vremenski duže pohrane sirovog mlijeka na niskim temperaturama, uobičajena je pojava rasta psihrotrofnih bakterija. Većinu psihrotrofnih bakterija karakterizira sposobnost tvorbe termostabilnih enzima koji uzrokuju kvarenje mlijeka i mliječnih proizvoda nakon toplinske obrade mlijeka ili pasterizacije. Također, iz toplinski obrađenog mlijeka i mliječnih proizvoda psihrotrofne bakterije su najčešće izolirani uzročnici kvarenja u slučajevima naknadne mikrobne kontaminacije proizvoda. Određene vrste psihrotrofnih bakterija pokazuju i prirodnu otpornost na antibiotike i/ili mogu stvarati toksine te se istovremeno smatraju i uvjetno patogenim bakterijama. Samim time, psihrotrofne bakterije uzročnici su kvarenja i umanjene kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda. Kvarenje uzrokovano psihrotrofnim bakterijama očituje se u promjeni okusa, neželjenoj koagulaciji proteina mlijeka, povećanju koncentracije slobodnih masnih kiselina, u promjeni teksture određenih mliječnih proizvoda. U odnosu na druge parametre kvalitete, negativan utjecaj psihrotrofnih bakterija očituje se i kroz umanjenu pogodnost mlijeka za preradu, manji prinos te kraće vrijeme održivosti proizvoda na policama. U smislu kvalitete sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda psihrotrofne bakterije postale su ozbiljan problem s kojim se suočava današnja mljekarska industrija. Za mljekarsku industriju je od presudne važnosti brzo određivanje broja psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku. U tu svrhu pogodnom se pokazala metoda protočne citometrije za određivanje ukupnog broja psihrotrofnih bakterija te matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja - analizator masa s vremenom leta (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight; MALDI-TOF) tehnika za utvrđivanje zastupljenosti pojedinih bakterijskih vrsta unutar skupine psihrotrofnih

bakterija. MALDI-TOF je dokazana instrumentalna tehnika za identifikaciju bakterija u hrani, međutim može koristiti u svrhu identifikacije patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda.

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je prikazati prikladnost metode protočne citometrije za utvrđivanje ukupnog broja psihrotrofnih bakterija te MALDI-TOF tehnike za utvrđivanje zastupljenosti bakterijskih vrsta u sirovom mlijeku.

2. Psihrotrofne bakterije

Psihrotrofne bakterije predstavljaju skupinu različitih bakterijskih vrsta koje rastu pri temperaturama između 2 °C i 6 °C. Najučestalije psihrotrofne bakterije izolirane iz sirovog mlijeka su Gram negativne bakterije i to iz sljedećih rodova: *Pseudomonas, Aeromonas, Serratia, Acinetobacter, Alcaligenes, Achromobacter, Enterobacter i Flavobacterium* spp. uz izrazitu dominaciju roda *Pseudomonas* spp. od oko 50% zastupljenosti od ukupne populacije Gram negativnih bakterija. Gram pozitivne psihrotrofne bakterije koje se pojavljuju u sirovom mlijeku pripadaju rodovima: *Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Microbacterium, Micrococcus, Arthobacter, Streptococcus, Staphylococcus i Lactobacillus* spp. Neke od navedenih psihrotrofnih bakterija, kada se nalaze u ohlađenom sirovom mlijeku, proizvode termostabilne lipaze koje pridonose razvoju užegnutog okusa, kao i proteinaze koje razgrađuju kazein (Antunac i Havranek, 2013.).

2.1. Gram negativne psihrotrofne bakterije

2.1.1. *Pseudomonas* spp.

Rod *Pseudomonas* spp. predstavlja najvažniju i najdominantniju skupinu Gram negativnih psihrotrofnih bakterija u ohlađenom sirovom mlijeku. Jedna od bitnih karakteristika ovog roda je proizvodnja termostabilnih enzima (proteaze i lipaze) tijekom rasta u ohlađenom mlijeku. Pokretljivi Gram negativni štapići rastu na temperaturama hlađenja već od 0 °C pa sve do optimalne temperature rasta između 25 i 30 °C. Prepoznatljivi su po kratkom generacijskom intervalu na temperaturama od 0 do 7 °C, a jednako tako se interval smanjuje s prisutnošću zraka u mediju. Prema Suhren, 1989., zabilježen je najbrži rast roda *Pseudomonas* spp. u sirovom mlijeku od 8 - 12 sati na temperaturi od 3 °C i 5,5 - 10,5 sati na temperaturama između 3 i 5 °C. Mnoge vrste ovog roda proizvode proteinaze koje su odgovorne za hidrolizu dostupnog kazeina u topljive peptide. Jednako tako, ovaj rod karakterizira izrazita lipolitička aktivnost. Proteolitička i lipolitička aktivnost može dovesti do formiranja gorkih peptida u sirovom mlijeku što u konačnici rezultira promjenom organoleptičkih svojstava mlijeka. Proteinaze, lipaze i fosfolipaze roda *Pseudomonas* spp. najčešće su proizvedene na kraju eksponencijalne faze rasta na niskim temperaturama hlađenja mlijeka. Na istim

temperaturama hladnjaka, stacionarna faza roda *Pseudomonas* spp. se produljuje i može preživjeti dulji period kontaminacije rezidue mlijeka. Flourescentne vrste (*Pseudomonas flourescens i Pseudomonas fragi*) predstavljaju oko 50% bakterijskih vrsta roda *Pseudomonas* spp. te ih karakterizira proizvodnja propusnog flourescentnog pigmenta (pioverdina) tijekom rasta (Slika 2.1.1.1.)



Slika 2.1.1.1. *Pseudomonas flourescens*
(http://www.agrotekno-lab.com/2013/12/pseudomonas-fluorescens.html)

2.1.2. Porodica *Enterobacteriaceae*

Porodica *Enterobacteriaceae* pojavljuje se u 5 do 33% slučaja psihrotrofne mikroflore sirovog mlijeka. Karakterizira ih izrazita pokretljivost, sitnija građa te veća optimalna temperatura rasta (> 30 °C). Koliformne bakterije koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* sposobne su fermentirati laktozu uz proizvodnju kiseline i plina (CO_2) pri 32 °C tijekom 48 sati. Najčešći uzročnici koliformnog kvarenja spominju se rodovi *Enterobacter* i *Klebsiella* spp. Jednako je važno spomenuti i bakterijsku vrstu *Escherichia coli* koja fermentira glukozu proizvodeći piruvat, koji prelazi u mliječnu, octenu i mravlju kiselinu. Pojedini sojevi proizvode enterotoksin od kojih su neki otporni na toplinu. Izvor ove bakterije je nečistoća i vrlo često uzrokuje kontaminaciju sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda.

2.2. Gram pozitivne psihrotrofne bakterije

2.2.1. *Bacillus* spp.

Bakterijske vrste roda *Bacillus* spp. su sporogene, Gram pozitivne bakterije koje se pojavljuju u sirovom mlijeku. Optimalna temperatura na kojoj rastu je 20 - 40 °C, iako neke vrste kao što je *Bacillus stearothermophilus* pokazuju karakteristike rasta na temperaturama višim od optimalne. Generacijski interval i lag faza *Bacillus* spp. pri temperaturi od 2 do 7 °C duža je u usporedbi s rodom *Pseudomonas* spp. Na temperaturi od 10 °C, *Bacillus cereus* je najčešći uzročnik kvarenja sirovog mlijeka uz pojavnost do čak 80% te se još navode prisutne i vrste poput *B. licheniformis, B. subtilis i B. megaterium*. Razlog česte pojavnosti u sirovom mlijeku je sposobnost stvaranja termostabilnih hidrolitičkih enzima koji razgrađuju glavne sastojke mlijeka (protein, mast, fosfolecitin). Naime, bakterijske vrste ovog roda imaju slabu kompetitivnu sposobnost rasta s mikroorganizmima uzročnicima kvarenja te je njihova pojavnost u malom broju i ne predstavlja rizik za zdravlje čovjeka. Suprotno, rastu brzo u toplinski obrađenoj hrani u kojoj su eliminirane ostale nesporotvorne bakterije pa je u proizvodnji sigurne hrane kontrola bakterijskih vrsta roda *Bacillus* spp. obavezna (Samaržija, 2017.).

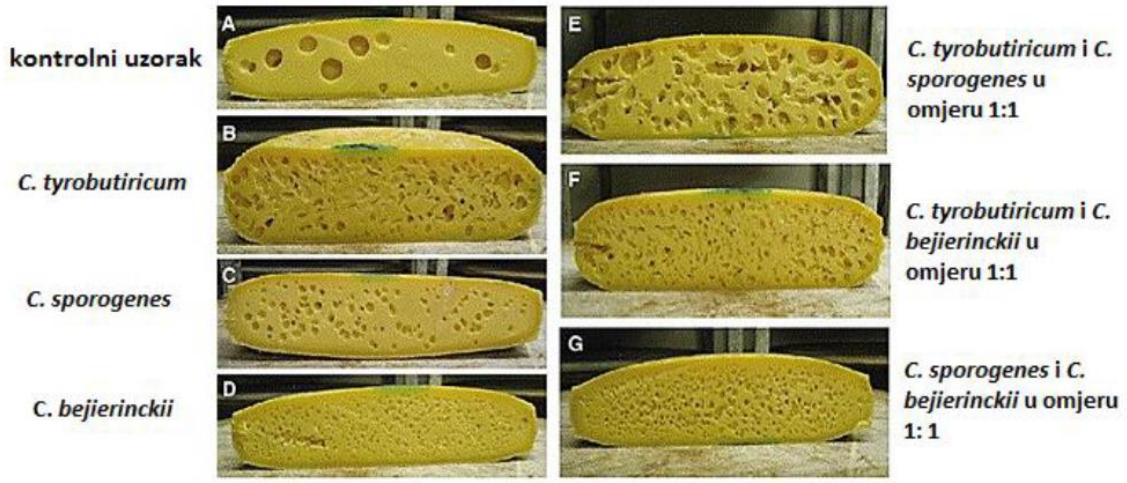


Slika 2.2.1.1. *Bacillus subtilis*

(https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-bacillus-subtilis/)

2.2.2. *Clostridium* spp.

Bakterijske vrste roda *Clostridium* spp. su sporogene, gram pozitivne bakterije koje često uzrokuju kvarenje mlijeka dovoljno da ih u uzorku ima u malim količinama. Od patogenih vrsta, koje imaju sposobnost tvorbe toksina, najznačajnije za mljekarsku industriju su *Clostridium perfringens* i u znatno manjoj mjeri *Clostridium botulinum*. U prirodi su široko rasprostranjene, pronađene u zemlji, blatu, prašini i raspadnom bilju. Pojavljuju se sezonski, zimi, za vrijeme boravka životinja u staji gdje se one zadržavaju na nečistoj sijeni i konzumiraju sporama kontaminiranu silažu. Prisutnost bakterijskih spora *Clostridium botulinum* značajna je za sterilizirano mlijeko i vrhnje radi visokog udjela masti i visoke pH vrijednosti te se za takve mliječne proizvode preporučuje visoki toplinski tretman koji će reducirati broj spora. Bakterijske vrste roda *Clostridium* spp. najčešći su izolirani uzročnici kasnog nadimanja sira. Za kasno nadimanje sira Gaude dovoljno je 5-10 spora *C. tyrobutiricum* u 1 L mlijeka (Samaržija, 2017.). Zbog obilnog stvaranja plina CO_2 i H_2 pogreške kasnog nadimanja sira manifestiraju se u obliku elastične teksture koja na prerezu pokazuje atipične oči razasute u tijestu sira (Slika 2.2.2.1.).



Slika 2.2.2.1. Prikaz kasnog nadimanja sira bakterijskim vrstama roda *Clostridium spp.* (Samaržija, 2017.)

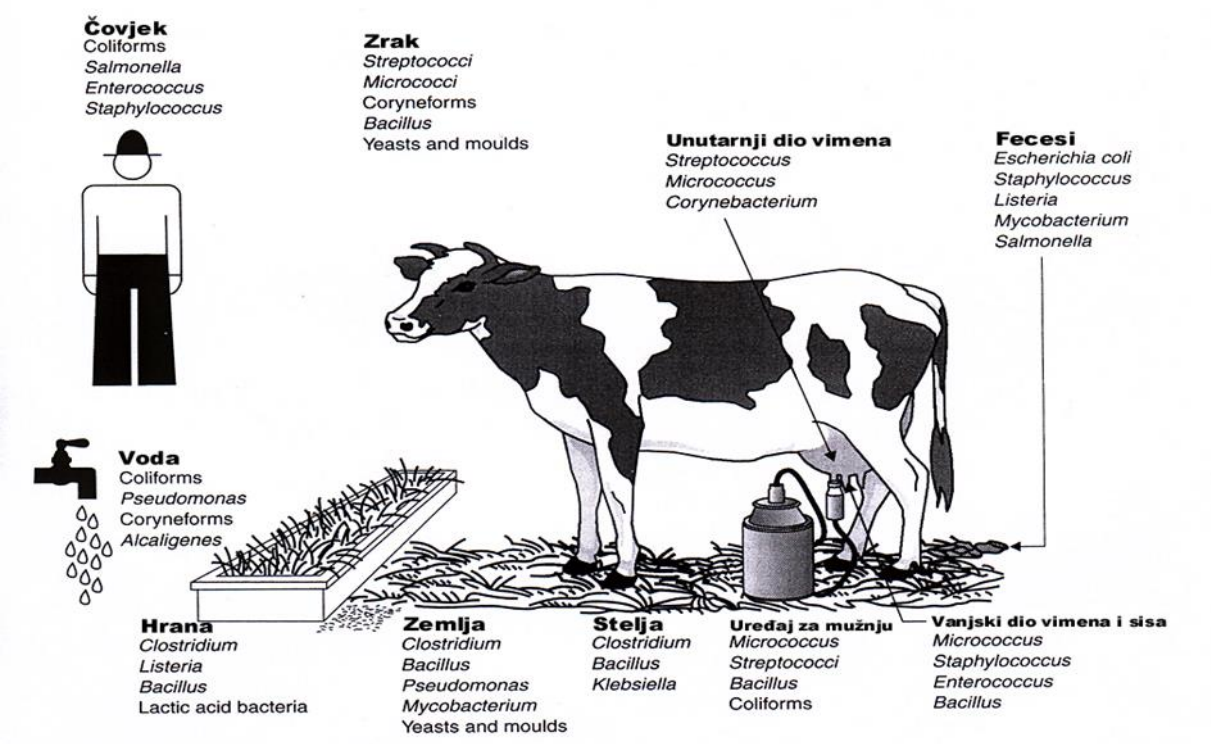
2.3. Prisutnost psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku

Sirovo mlijeko, neposredno nakon higijenski provedene mužnje, sadrži početnu mikrobnu populaciju od 5 000 CFU/mL. U tim uvjetima dominantnu populaciju proizvedenog mlijeka uglavnom čine bakterije rodova *Micrococcus, Streptococcus, Lactococcus i Corynebacterium* spp. te zanemariv broj ostalih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Dužim periodom hlađenja i pohrane sirovog mlijeka na niskim temperaturama (2 - 6 °C) značajno se mijenja sastav prisutnih mikrobnih populacija. U ohlađenom sirovom mlijeku kao dominatna mikrobna populacija prevladavaju Gram negativne i Gram pozitivne psihrotrofne bakterije. Tu se posebno izdvaja *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* spp. koje su najčešće izolirane bakterijske vrste u trenutku kvarenja mlijeka. Dominantnost psihrotrofnih bakterija u ukupnoj mikrobnoj populaciji još je naglašenija kada se mlijeko proizvodi u higijenski lošijim uvjetima i/ili sadrži povećani broj somatskih stanica. Iz tih razloga, od ukupno prisutne mikrobne populacije u ohlađenom sirovom mlijeku psihrotrofne bakterije čine više od 90%. Psihrotrofne bakterije imaju sposobnost rasta i razmnožavanja na niskim temperaturama te veliki broj tih bakterijskih vrsta ima sposobnost tvorbe ekstracelularnih i/ili intracelularnih hidrolitičkih termostabilnih enzima koji svoju aktivnost zadržavaju i nakon konvencionalne toplinske obrade mlijeka. Također, iz toplinski obrađenog mlijeka i mliječnih proizvoda, psihrotrofne bakterije su najčešće izolirani uzročnici kvarenja u slučajevima naknadne mikrobne kontaminacije proizvoda. Kvarenje i umanjena kvaliteta mliječnih proizvoda mogu biti posljedica ili prisutnosti živih organizama i/ili njihovih termostabilnih enzima. Kvarenje se očituje u promjeni okusa, neželjenoj koagulaciji proteina mlijeka, povećanju koncentracije slobodnih masnih kiselina, te ovisno o vrsti mliječnog proizvoda u promjeni teksture i udjelu pojedinih nepoželjnih organskih spojeva. Negativan utjecaj psihrotrofnih bakterija očituje se i kroz umanjenu pogodnost mlijeka za preradu, manji prinos te kraće vrijeme održivosti proizvoda na policama. Većina psihrotrofnih bakterija koje uzrokuju kvarenje mlijeka i mliječnih proizvoda nije patogena, međutim, određene vrste tih bakterija pokazuju rezistentnost na antibiotike te se smatraju uvjetno patogenim bakterijama. Gotovo sve vrste psihrotrofnih bakterija imaju sposobnost adhezije na čvrstu površinu te na površini mljekarske opreme stvaraju biofilm koji se teško odstranjuje antibakterijskim sredstvima te u mljekarskoj industriji može predstavljati tvrdokoran izvor učestale kontaminacije proizvoda psihrotrofnim bakterijama uzročnicima kvarenja i/ili uvjetno patogenim bakterijama. EU standard za ocjenu

kvalitete sirovog mlijeka zahtijeva da ukupan broj mezofilnih aerobnih bakterija nije veći od 30 000 CFU/mL, a broj psihrotrofnih bakterija nije veći od 5 000 CFU/mL. Svako povećanje udjela psihrotrofnih bakterija u mikrobnoj populaciji sirovog mlijeka u određenoj mjeri negativno utječe na kvalitetu proizvoda i indirektno na smanjenje prihoda. Brzina kojom će psihrotrofne bakterije doseći razinu kontaminiranosti, koja je potrebna za uočljivu pojavu kvarenja, uvjetovana je njihovim početnim brojem neposredno nakon mužnje i dužinom hladne pohrane sirovog mlijeka. Praćenjem dinamike rasta mikrobne populacije sirovog ohlađenog mlijeka (4 °C) molekularnim metodama temeljenim na analizi DNA utvrđeno je da psihrotrofna mikrobna populacija postaje u mlijeku dominantnom populacijom neovisno o razini kontaminiranosti već za 24 sata (Samaržija i sur., 2012.).

2.4. Izvori kontaminacije

Psihrotrofne bakterije široko su rasprostranjene u prirodi, prvenstveno u vodi, tlu i vanjskom okolišu. Manja zastupljenost psihrotrofnih bakterija može biti i u zraku. Optimalnu metaboličku aktivnost iskazuju na temperaturama između 20 i 30 °C. Međutim, mogu rasti i razmnožavati se na niskim temperaturama adaptacijom uvjetovanog obogaćenja membranskih lipida poluzasićenim masnim kiselinama te promjenom stanične membrane za bolju propusnost u aktivnom transportu metabolita. Psihrotrofne bakterije ne pripadaju prirodnoj mikrobnoj populaciji vimena, nisu uzročnici upale vimena (mastitisa) te je njihova prisutnost u sirovom mlijeku isključivo posljedica kontaminacije mlijeka nakon mužnje. Mogući izvori kontaminacije psihrotrofnih bakterija su: rezidualna voda u muzilicama, mljekovodima ili hladionicima, nečiste sise i vime, nečiste ruke čovjeka koji obavlja mužnju, kontaminirana hrana i voda, prljava stelja i feces gdje životinje borave, neadekvatno očišćene površine mljekarske opreme za prihvat, transport i pohranu mlijeka te tvrdokorni biofilm na mljekarskoj opremi. Biofilm se razvija u sistemima koji se tijekom tehnoloških operacija djelomično pune ili gdje zaostaje rezidualna tekućina nakon završenog procesa. Ovisno o uvjetima ono može predstavljati pogodno mjesto za formiranje spora.



Slika 2.4.1. Izvori kontaminacije sirovog mlijeka na mliječnoj farmi (Antunac, 2013.)

2.5. Promjene sastava sirovog mlijeka uzrokovanih povišenim brojem psihrotrofnih bakterija

Sirovo mlijeko promijenjenog sastava uzrokovanog povišenim brojem psihrotrofnih bakterija uobičajeno se ne sakuplja niti stavlja u promet. Psihrotrofne bakterije koje se pojavljuju u manjim koncentracijama u sakupljenom sirovom mlijeku, ne mijenjaju organoleptička svojstva te ih se ne može otkriti senzorskom analizom, već posebnim utemeljenim fizikalnim ili kemijskim instrumentalnim metodama. Nedostaci okusa i mirisa mogu se pojaviti uslijed nakupljanja nusproizvoda staničnog metabolizma ili zbog djelovanja složenih enzimskih sustava na mliječne sastojke. Mnoge nepoželjne promjene učestale su kada okolišni uvjeti pogoduju proliferaciji mikroba i aktivnosti enzima. Najčešće se govori o mlijeku koje je kiselo, gorko, voćno i slatko. Ovi oblici kvarenja povezani su kako s rastom psihrotrofnih bakterija tako i s rastom kvasca i plijesni. S obzirom na karakteristike kvarenja, bakterijska je kontaminacija najčešća i najveća, a bitno je naglasiti i njen potencijalni razvoj. Bakterijska kontaminacija je odgovorna za dvije glavne vrste oštećenja: zakiseljavanje i lipolizu.

Zakiseljavanje najčešće provodi mezofilna mliječna mikroflora koja je jedan od glavnih prirodnih onečišćivača mlijeka. Prisutnost te flore pokazuje veću ili manju brzinu zakiseljavanja, ovisno o temperaturnim uvjetima u fazi proizvodnje, prerade i distribucije. Kvarenje se očituje u kiselom okusu zbog prisutnosti mliječne kiseline i u manjim količinama organskih kiselina (octena kiselina, propionska kiselina, ugljični dioksid). Nadalje, heterofermentativni karakter mliječne mikroflore se karakterizira ispuštanjem u okoliš različitih spojeva (aldehida, ketona i alkohola), osim organskih kiselina navedenih gore (Kim i sur., 1983.).

Kvarenje sirovog mlijeka uzrokovano nekontroliranom proteolizom povezano je s bakterijskom mikroflorom koja kontaminira mlijeko na farmi i različitog je intenziteta, ovisno o vrsti, vremenskom razdoblju i temperaturi. Psihrotrofne bakterije u ohlađenom mlijeku mogu biti uzrok topljivosti mliječnih proteina različitog intenziteta zbog ekstracelularnih proteaza. Oslobođene frakcije proteina (peptidi, aminokiseline i amino-amonijak) odgovorne su za razvoj gorkog okusa i okusa sličnog plinu amonijaku. Štoviše, iako je većina proteaza osjetljiva na toplinu, neki enzimi koji dolaze iz psihtrotrofnih bakterija su termostabilni i njihovi štetni učinci mogu se pojaviti i u steriliziranim mliječnim proizvodima (Kim i sur., 1983.).

Enzimi odgovorni za lipolizu imaju dva različita podrijetla. Svježe kravlje mlijeko sadrži lipolitičke enzime: membransku lipazu i plazma lipazu. Iako njihova izolacija i karakteristike nisu u potpunosti razjašnjene, ti enzimi nemaju značajan utjecaj na sirovo mlijeko kada je mlijeko u fazi mirovanja i kada su masne globule netaknute. Podrijetlo lipaza može biti povezano s nezadovoljavajućim higijenskim uvjetima na farmi. Psihrotrofne bakterije najveća su prijetnja zbog njihove sposobnosti rasta na niskoj temperaturi i njihovog visokog izvanstaničnog djelovanja. Najaktivniji i najučestaliji mikroorganizmi i vrste bakterija imaju relativno kratko razdoblje razmnožavanja (4 do 24 h) s rasponom temperature od 0 do 49 °C. Jednako tako je utvrđena povezanost između gustoće bakterija, pojave oštećenja i promjena sastava mlijeka. Kada je udio masti djelomično koncentriran (vrhnje, maslac, sir i mliječni prah), mogu se pojaviti oštećenja na nižim koncentracijama bakterija posebno tijekom duljeg skladištenja. Učestalost i intenzitet lipolize povećava se promjenom početnog globularnog stanja masti. Dokazan je utjecaj endogenih čimbenika na životinju, u ovom slučaju kravu, da je učinak hranjenja povezan s fazama laktacije koji određuju sintezu globularne membrane i stadij laktacije. Prekomjerno tresenje, dodavanje zraka, utjecaj topline i homogenizacija u različitim fazama proizvodnje i prerade, može štetno utjecati na integritet masne globule,

potaknuti modifikacije između masne i nemasne faze i povećati procese lipolize. Razvoj sustava proizvodnje mlijeka koji karakterizira proširenje sabirnih područja, veću mehanizaciju mužnje, sakupljanja i transporta dovodi do duljeg vremena prerade. Ti su čimbenici u cjelini doveli do izraženijeg stupnja kvarenja sirovine i porasta organoleptičkih oštećenja u gotovom proizvodu (Kim i sur., 1983.).

2.6. Metode određivanja psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku

Ukupan broj bakterija u sirovom mlijeku utvrđuje se direktnim ili indirektnim metodama. Direktne metode se dijele na brojanje bakterija na čvrstom hranilištu i mikroskopske metode. Klasičnom metodom i modifikacijama klasične metode utvrđuje se broj kolonija. Suprotno, mikroskopskim metodama - direktno brojanje bakterija pod mikroskopom, DEFT (Direct epifluorescence filter technique), automatskom epifluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom - utvrđuju se pojedinačni organizmi. Metode za utvrđivanje bakterija u mlijeku još se dijele i na kvalitativne i kvantitativne. Kvalitativnim metodama dokazuje se prisutnost određenih bakterijskih vrsta, a direktnim kvantitativnim metodama utvrđuje se ukupan broj bakterija. Indirektnim kvantitativnim metodama prosuđuje se broj bakterija na osnovi njihovih metaboličkih produkata. Najčešće se određuje količina ATP-a, piruvata, enzima ili toksina (Samaržija i sur., 2004.).

2.6.1. Klasična metoda određivanja psihrotrofnih bakterija u mlijeku

Klasična metoda temelji se na određivanju broja bakterija koje rastu na standardnom čvrstom hranilištu u Petrijevim zdjelicama nakon inkubacije uzoraka na temperaturi od 6,5 °C kroz 10 dana (HRN ISO 6730:2010). Svaka porasla kolonija može se razviti iz pojedinačne bakterijske stanice ili iz nakupine pojedinačnih bakterijskih stanica. Dogovorom je usvojeno da svaka kolonija predstavlja jednu bakterijsku stanicu. Tako se broj bakterija u uzorku izračunava na osnovi broja poraslih kolonija. Klasična metoda za određivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku i mliječnim proizvodima procjenjuje točnost ostalih metoda za određivanje ukupnog broja bakterija. Glavni nedostatci klasične metode su izrazito dugo vrijeme potrebno za

dobivanje rezultata i neprikladnost metode u analizi velikog broja uzoraka mlijeka. Izrada klasične metode može se prikazati u nekoliko koraka.

Prvi korak ove metode je izrada otopine peptona (Slika 2.6.1.1. a)). Miješanjem 1 g peptona i 1000 mL destilirane vode dobiva se otopina peptona koja se potom sterilizira pri temperaturi 121 °C 15-20 minuta. Hranjiva podloga za nasađivanje psihrotrofnih bakterija dobiva se otapanjem 20 g hranjive podloge (plate count agar with skim milk, Biolife) u 1 L vode. Hranjivu podlogu potrebno je kuhati do vrenja i preliti u vatrostalnu bočicu koja se nakon toga sterilizira u autoklavu. U daljnjem postupku pipetom se uzorkuje 1 mL mlijeka koji se dodaje u epruvetu koja sadržava 9 mL sterilne otopine peptona. Tako dobivena otopina mlijeka ima razrjeđenje 10^{-1}. Postupak je potrebno ponoviti ovisno o stupnju razrjeđenja koji je potreban za određivanje broja psihrotrofnih bakterija. Zatim se sterilnom pipetom u dvije sterilne Petrijeve zdjelice stavi po 1 mL razrijeđene otopine i u svaku Petrijevu zdjelicu zalije se 12-15 mL hranjive podloge, zagrijane na temperaturi od 45 °C (Slika 2.6.1.1. b)). Kada se podloga ohladi i stvrdne, Petrijeve zdjelice se hlade u hladnjaku na 4 °C. Inkubacija pripremljenih uzoraka traje 10 dana. Nakon gotove inkubacije, određivanje broja kolonija psihrotrofnih bakterija na Peterijevim zdjelicama računa se prema posebnoj formuli:

$$Broj\ mikroorganizama/mL = \frac{\Sigma\ C}{\frac{1x\ n1 + 0{,}1\ x\ n2}{d}}$$

gdje predstavlja: Σ C - suma svih kolonija na svim izbrojanim zdjelicama

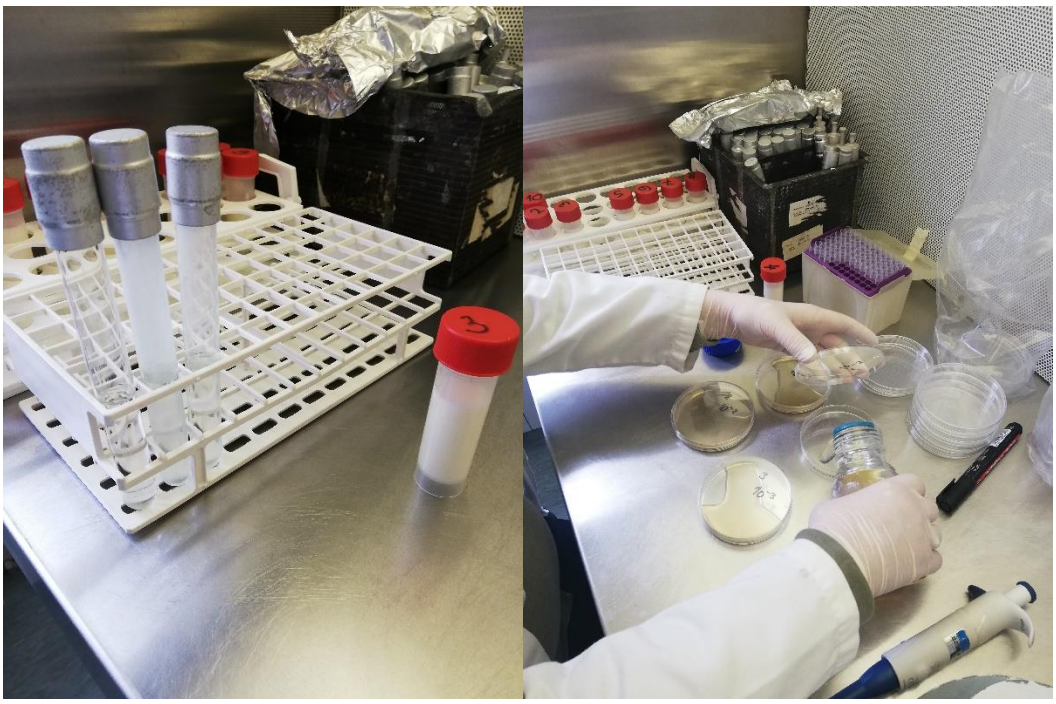
n1 – broj izbrojanih zdjelica u prvom razrijeđenju

n2 – broj izbrojanih zdjelica u drugom razrijeđenju

d – faktor razrijeđenja prvog razrijeđenja.

(Izvor: Prezentacija iz kolegija Mlijeko i mliječni proizvodi, Mikulec, 2017/18)

a) b)

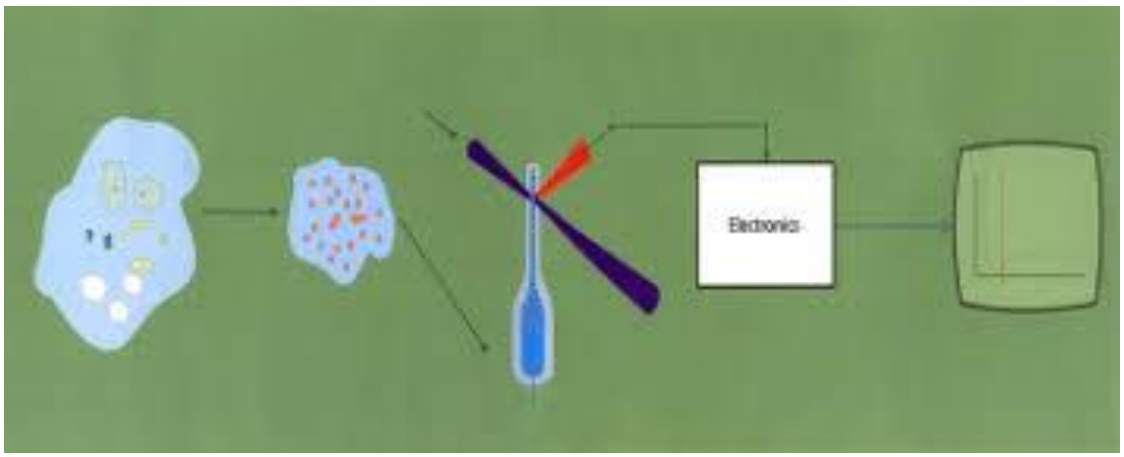


Slika 2.6.1.1. a) Prikaz otopine peptona b) Prelijevanje hranjive podloge na Petrijevu zdjelicu

2.6.2. Metoda protočne citometrije

Princip rada instrumenata baziranih na metodi protočne citometrije zasniva se prvenstveno na filtriranju uzorka mlijeka koji se miješa sa specifičnim inkubacijskim reagensom (pufer, enzim) pomoću kojeg se iz mlijeka izdvajaju sve komponente osim bakterija. Nakon filtracije uzorak protječe u obliku tanke niti kroz cijev koju osvjetljava laserski izvor svjetlosti te fluorescencijom deoksiribonukleinske kiseline (DNK) oboji bakterijske stanice. Na kraju procesa detektor očitava fluorescentne svjetlosne impulse te na osnovu jednadžbe linearne regresije izračunava ukupan broj bakterija u mlijeku (Slika 2.6.2.1.). Cijeli postupak je automatiziran pa je u jednom satu moguće analizirati do 150 uzoraka ovisno o modelu intrumenta. Metoda je prikladna za analizu velikog broja uzoraka mlijeka. Prije početka bakteriološke analize mlijeka protočnom citometrijom, instrument se kontrolira standardom poznate vrijednosti radi provjere gornjeg i donjeg praga detekcije, stabilnosti instrumenta i utjecaja stabilnosti instrumenta na rezultat sljedećeg uzorka. Prema specifikaciji proizvođača potrebna je i slijepa proba koja mora pokazivati manje od 3 detektirana impulsa.

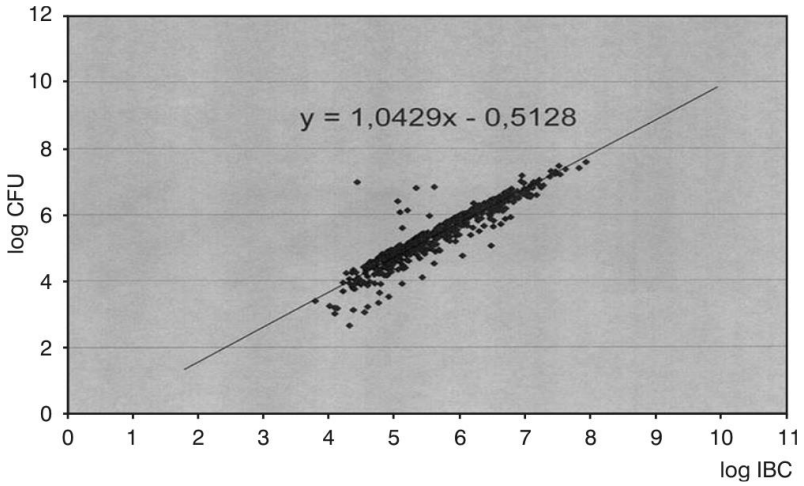
Mjerno područje instrumenta iznosi od < 10 impulsa do > 70 000 impulsa, što je izraženo u jedinici klasične metode 2 900 do 32 milijuna bakterija u 1 mL mlijeka. Obojene bakterije u analiziranom uzorku broje se kao impulsi i predstavljaju pojedinačnu bakterijsku stanicu (eng. IBC- Indvidual Bacterial Count). Prema međunarodnom standardu (FIL-IDF, 100B:1991), ukupan broj bakterija u mlijeku izražava se kao broj kolonija utvrđen klasičnom metodom (eng. CFU- Colony Forming Units). Zbog toga se, analizom linearne regresije, rezultati ukupnog broja bakterija utvrđenih metodom protočne citometrije preračunavaju u jedinicu klasične metode. Izražavanje rezultata analize jedne metode u jedinicu druge metode naziva se konverzija rezultata. Određivanje broja bakterija u mlijeku protočnom citometrijom na uređaju *„Bactoscan FC“* standardnom metodom HRN EN ISO 21187 te HRN EN ISO 4833-1 određuje se ukupni broj pojedinačnih bakterija (IBC) koji predstavlja ukupan broj živih i neživih bakterija. Taj broj se konvertira u ukupan broj živih psihrotrofnih bakterija (CFU) referentnom metodom HRN ISO 6730 (Samaržija i sur., 2004.).



Slika 2.6.2.1. Određivanje ukupnog broja bakterija protočnom citometrijom (Samaržija i sur., 2004.)

Prednost određivanja ukupnog broja mikroorganizama metodom protočne citometrije je brzina i automatiziranost metode. Referentna metoda za određivanje ukupnog broja mikroorganizama temelji se na klasičnom brojanju kolonija izraslih na hranjivoj podlozi pogodnoj za rast svih mikroorganizama u mlijeku. Instrument *„Bactoscan FC*“ koji radi na principu protočne citometrije direktno određuje pojedinačne bakterijske stanice (IBC) (eng. Individual Bacteria Count), dok broj kolonija (CFU) (eng. Colony Forming Unit) prema kojem se

određuje higijenska kvaliteta mlijeka, preračunava na temelju takozvane konverzije. Glavni rezultat instrumentalne metode protočne citometrije je upravo broj kolonija (CFU) kao pokazatelj higijenske kvalitete mlijeka. Za vjerodostojnu konverziju rezultata potrebno je provesti veći broj analiza koristeći instrumentalnu i referentnu metodu nacjepljivanja uzoraka mlijeka na hranjivu podlogu (HRN EN ISO 4833-1:2013) zbog velikih oscilacija u rezultatima mikrobioloških analiza. Dobiveni rezultati se koriste za izračun parametara „a“ i „b“ u jednadžbi pravca y= ax + b. Na temelju impulsa IBC rezultati se transformiraju u broj kolonija (CFU). Impulsi predstavljaju nezavisnu (x), a broj kolonija zavisnu varijablu (y) (Slika 2.6.2.2.). Iz rezultata dobivenih metodom protočne citometrije (x) na ovaj način moguće je s točnošću provjeriti vrijednost referentne klasične metode (y) (CFU). Na ovaj način u sistemski dio instrumenta postavljen je poseban program za konverziju rezultata za određivanje broja psihrotrofnih bakterija u mlijeku. Analiza koja referentnom metodom traje 10 dana, instrumentalnom metodom je rezultat moguće dobiti u 20-ak minuta.



Slika 2.6.2.2. Primjer konverzijskog pravca (Izvor: Prezentacija iz kolegija Mlijeko i mliječni proizvodi, Mikulec, 2017/18)

3. MALDI-TOF tehnika identifikacije psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku

3.1. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je tehnika analize kojom se pomoću spektrometra masa određuje omjer mase i naboja iona u visokom vakuumu. Spektrometar masa sastoji se od 3 glavna dijela: ionskog izvora u kojem dolazi do prevođenja molekula uzorka u plinovite ione, analizatora mase koji razdvaja ione u odnosu na njihov omjer mase i naboja te detektora.



Slika 3.1.1. Prikaz koraka u analizi spektrometrijom masa

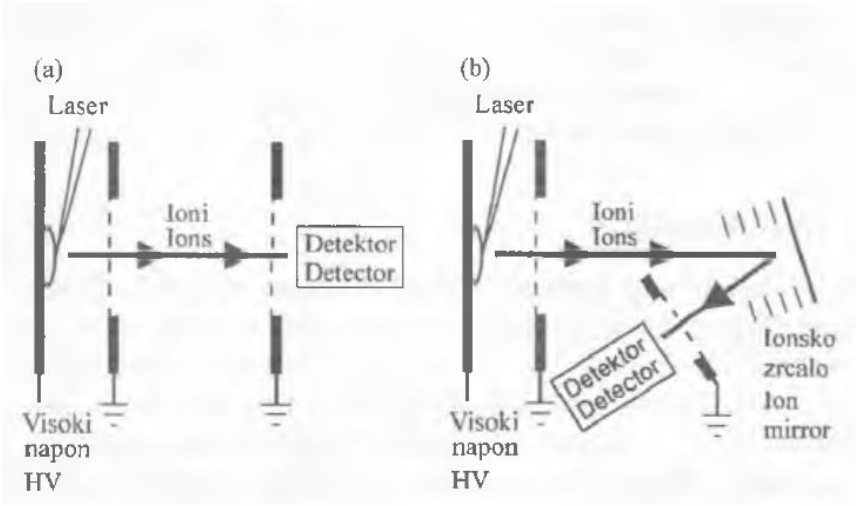
Ionizacija molekule analita provodi se primanjem ili gubitkom elektrona. Taj proces može biti započet utjecajem elektrona (Electron impact, EI), ionizacijom koja je potaknuta atomima (Fast Bombardment Ionization, FAB) ili protonima (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; MALDI; electrospray ionization, ESI). Proces separacije iona može se izvoditi različitim postupcima, od kojih su najučestaliji: separacija iona magnetskim i električnim poljem (sector field instruments), separacija unutar RF polja (quadrupol), separacija magnetsko ionskim klopkama (on trap, IT) i separacija nakon vremena leta u ionskoj cijevi (Time-of-Flight instruments, TOF). MALDI spektrometrija masa krajem 1980. godine postaje jedna od najvažnijih metoda analize peptida i proteina. Ova tehnika omogućuje precizno određivanje masa velikih termički nestabilnih spojeva poput proteinskih molekula (Singhal i sur., 2015.).

3.2. MALDI tehnika

MALDI tehnika ionizacije se temelji na desorpciji analita kristaliziranog u suvišku molekula matrice. Molekula matrice služi kao nosač za ione koji su generirani iz polarnih ili nabijenih molekula biopolimera. Nakon laserskog pulsa i početka zračenja (UV područje) dolazi do naglog zagrijavanja molekule matrice zbog apsorpcije energije koju ona oslobađa u obliku topline. Tijekom naglog zagrijavanja dolazi do desorpcije matrice i analita u plinovitu fazu. Za MALDI eksperimente matrica mora zadovoljiti nekoliko osnovnih uvjeta. Mora apsorbirati na valnoj duljini zračenja laserskog pulsa, mora se dobro otapati u otapalima u kojima se topi molekula analita, mora dobro izolirati molekule analita te kokristalizirati s biomolekulama analita te omogućiti dobre ionizacijske uvjete kao što su davanje ili primanje protona. Na taj način je kontroliran prijenos energije laserskog pulsa te je molekula analita zaštićena od suviška energije koja dovodi do njene degradacije. Najčešće korištene matrice su: α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina, 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, sinapinska kiselina, jantarna kiselina i nikotinska kiselina. Prednost ove tehnike je mogućnost primjene s visokom osjetljivošću te snimanje širokog raspona bioloških molekula koje uključuju i netopive molekule kao što su oligosaharidi, glikolipidi i polinukleotidi. Za MALDI tehniku koriste se pulsni laseri sa širinom trajanja pulsa od 1 do 200 ns (UV laseri, N_2 337 nm) i Q-prekidani Nd:YAG (355 i 266 nm). Najčešće se koristi MALDI tehnika u kombinaciji s TOF analizatorima masa koji istovremeno bilježe signal svih iona i svakog laserskog pulsa te imaju prividno neograničenu gornju detekcijsku granicu masa (Kazazić i sur., 1999.; Bruker Daltonics 2004.; Singhal i sur., 2015.).

3.3. MALDI-TOF analizator mase s vremenom leta

Ioni nastali u ionskom izvoru se u analizatoru masa s vremenom leta (TOF) ekstrahiraju i ubrzavaju statičnim električnim poljem. Ubrzavajući potencijal gibanja iona je konstantan te su ioni ubrzani do fiksne kinetičke energije. Ubrzavajući potencijal iona može biti od 1 do 40 kV, a duljina puta od 0,1 do 3 m. Ubrzani ioni na putu do detektora se razdvajaju na temelju razlike u omjeru mase i naboja. Detektor proizvodi signal na kraju analizatora prema prolasku svakog ionskog paketa. TOF maseni spektrometar predstavlja signal detektora u funkciji vremena. Vrijeme produkcije iona, početna raspodjela brzine i vrijeme ekstrahiranja iona utječu na širinu detektiranog signala. Širenje iona nakon desorpcije reducirano je ugradnjom ionskog zrcala na kraju analizatora. Ioni veće kinetičke energije prije dolaze do ionskog zrcala i dublje prodiru u zrcalo tijekom reflekcije, dok ioni manje kinetičke energije zaostaju i samim time kasnije stižu na detektor što poboljšava razlučivanje instrumentu ovog tipa (Kazazić i sur., 1999.).



Slika 3.4.1. a) Linearni i b) spektrometar masa (TOF) s ionskim zrcalom koji se koristi za MALDI-MS (Kazazić i sur., 1999.)

3.4. Postupak uzorkovanja MALDI-TOF tehnikom

Ionizacija desorpcijom laserskog značenja ili MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) u analizi uzorka generira ione u plinovitoj fazi isparavanjem smjese matrica - analit. Jednostavnost spektra MALDI-TOF tehnike omogućava izravnu karakterizaciju bioloških smjesa bez prethodne izolacije uzorka. MALDI-TOF tehnika se primjenjuje za određivanje molekulskih masa, sekvenci, aktivnih mjesta i strukture biomolekula na pikomolskoj razini. Bakterije su identificirane primjenom MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight; matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja - analizator masa s vremenom leta) spektrometrije masa koristeći Microflex LT spektrometar masa (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) i MALDI Biotyper 3.0 računalni program.

MALDI-TOF tehnika snimanjem biološkog materijala rezultira karakterističnim spektrima masa proteina za svaki mikroorganizam. Identifikacija i klasifikacija mikroorganizma provodi se usporedbom („pattern matching“) MALDI-TOF spektra nepoznatog uzorka s referentnim spektrima pohranjenim u biblioteci mikroorganizama i obradom istih pomoću MALDI Biotyper 3.0 računalnog programa. Maseni spektri su automatski generirani pomoću microflex LT MALDI TOF masenog spektrometra (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) koji je korišten u linearnom pozitivnom modu unutar raspona mase od 2 000 - 20 000 Da. Instrument je kalibriran pomoću Bruker bakterijskog standardnog testa. Zabilježeni maseni spektri su obrađeni MALDI Biotyper 3.0 softverskim paketom (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) koristeći standardne postavke. Izlaz u MALDI Biotyperu je log vrijednost rezultata u rasponu 0 - 3,0 koja predstavlja vjerojatnost ispravne identifikacije izolata, izračunata uspoređivanjem pikova (engl. peak) nepoznatog izolata s referentnim spektrom u biblioteci mikroorganizama. Identifikacijski kriteriji (Tablica 3.5.1.) postavljeni su sljedećim rezultatima: ocjena od 2.300 do 3.000 upućuje na vrlo vjerojatnu identifikaciju na razini vrste, ocjena od 2.000 do 2.299 upućuje na sigurnu identifikaciju roda s mogućom identifikacijom vrste, ocjena od 1.700 do 1.999 ukazuje na vjerojatnu identifikaciju na razini roda, a rezultat od < 1.700 smatra se nepouzdanim. Podaci dobiveni s dva ponavljanja dodani su kako bi se minimizirao bilo koji slučajni učinak. Prisutnost ili odsutnost pikova uspoređena je otiscima prstiju za određeni izolat. Identifikacija izolata odgovarala je vrsti referentnog soja s najboljim podudaranjem u bazi podataka.

Tablica 3.5.1. Identifikacijski kriteriji na razini vrste i roda (eng. Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results)

Ocjena	Opis	Simbol	Boja
2.300 - 3.000	**vrlo vjerojatna identifikacija na razini vrste**	**(+++)**	zelena
2.000 - 2.299	**sigurna identifikacija roda s mogućom identifikacijom vrste**	**(++)**	zelena
1.700 - 1.999	**vjerojatna identifikacija na razini roda**	**(+)**	žuta
0.0 < 1.699	**nepouzdana identifikacija**	**(-)**	crvena

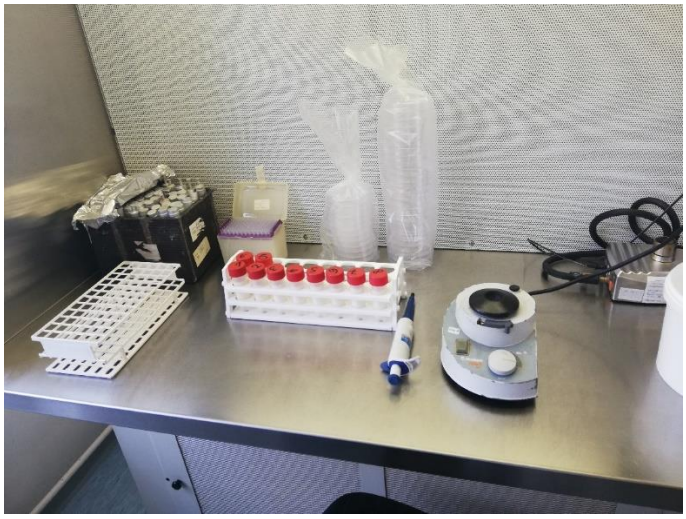
4. Materijali i metode rada

4.1. Uzorkovanje i analiza mlijeka

Ukupno je sakupljeno 30 uzoraka mlijeka koji su uzimani i analizirani u 3 različita vremenska intervala u zimu 2018. godine. Prvih deset uzoraka mlijeka je uzeto 12. studenog 2018. godine, drugih deset 19. studenog 2018. godine, a zadnjih deset uzoraka 10. prosinca 2018. godine. Razlog uzimanja uzoraka u različitom vremenskom intervalu je prikazati raznolikost broja i zastupljenosti psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku. Na instrumentu „*Bactoscan FC*“ (Foss Electric, Danska) je izmjeren ukupan broj bakterija (UBB), odnosno ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (eng. Colony Forming Units - CFU), metodom protočne citometrije (ISO 21187:2004, HRN ISO 4833:2003) uz korištenje internog faktora korekcije IBC-a (eng. Individual Bacterial Count).

4.2. Referentna metoda određivanja broja bakterija na čvrstom hranilištu

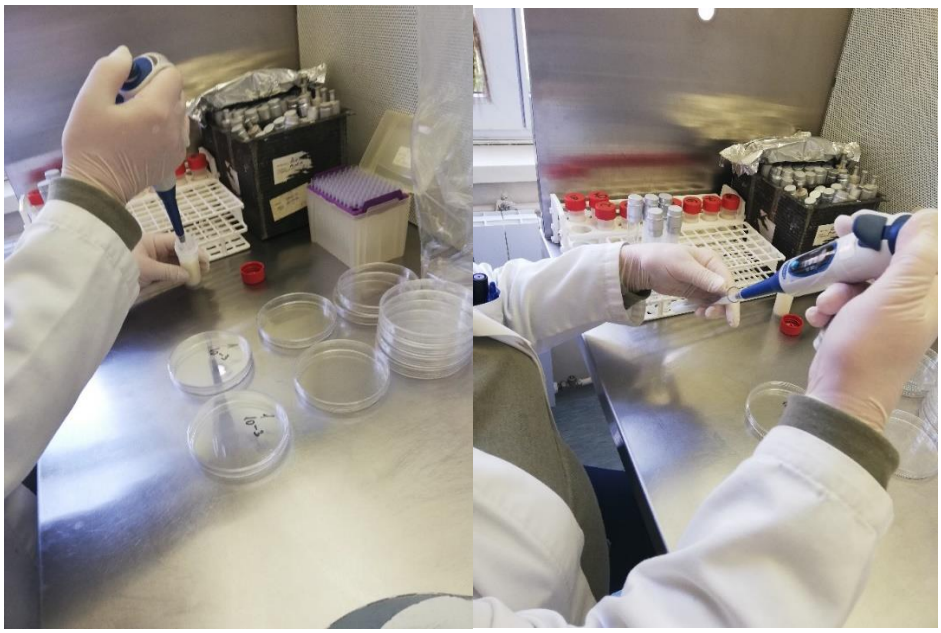
Referentna metoda za određivanje broja bakterija na čvrstom hranilištu može se opisati u nekoliko koraka. Prvi korak referentne metode je izrada otopine peptona, miješanjem 1 g peptona i 1 000 mL destilirane vode. Pripremljena otopina peptona se prelijeva u epruvete i sterilizira u autoklavu pri 121 °C u trajanju od 20 minuta. Drugi korak je priprema hranjive podloge. Hranjiva podloga za nasađivanje psihrotrofnih bakterija se dobiva otapanjem 20 g hranjive podloge u 1 L vode. Hranjivu podlogu potrebno je kuhati do vrenja i preliti u vatrostalnu bočicu koja se nakon toga autoklavira (121 °C, 20 minuta). Za provođenje referentne metode potrebno je pripremiti 10 uzoraka mlijeka koji su prethodno analizirani u instrumentu „*Bactoscan FC*“; otopine peptona s kojima se provodi različiti stupanj razrjeđenja, ovisno o očitanom rezultatu CFU u „*Bactoscan FC*“-u; sterilizirane Petrijeve zdjelice, sterilizirane nastavke za pipete, steriliziranu automatsku pipetu i vortex (tresač) koji ujednačeno miješa uzorak mlijeka i otopinu peptona u epruveti.



Slika 4.2.1. Materijal potreban za provođenje referentne metode na čvrstom hranilištu

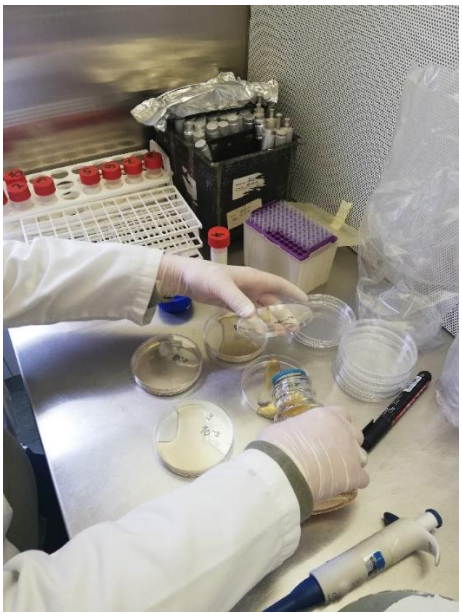
U daljnjem postupku pipetom se uzorkuje 1 mL mlijeka koji se ispipetira u epruvetu koja sadržava 9 mL sterilne otopine peptona. Tako dobivena otopina mlijeka ima razrjeđenje 10^{-1}. Postupak je potrebno ponoviti ovisno o stupnju razrjeđenja koji je potreban za određivanje broja psihrotrofnih bakterija.

a) b)



Slika 4.2.2. a) Prikaz uzorkovanja 1 mL mlijeka pipetom b) Pipetiranje uzorka mlijeka u epruvetu s otopinom peptona

Zatim se sterilnom pipetom u dvije sterilne Petrijeve zdjelice stavi po 1 mL razrijeđene otopine i u svaku Petrijevu zdjelicu zalije se 12-15 mL hranjive podloge, zagrijane do temperature od 45 °C (Slika 4.2.3.).



Slika 4.2.3. Prikaz prelijevanja hranjive podloge na razrijeđenu otopinu u Petrijevu zdjelicu

Kada se podloga ohladi i stvrdne, Petrijeve zdjelice se hlade u hladnjaku na 4 °C. Inkubacija pripremljenih uzoraka traje 10 dana. Nakon inkubacije, uzorci se pripremaju za MALDI-TOF tehniku koja se u ovom slučaju provodi na Institutu Ruđer Bošković uz pomoć instrumenta MALDI-TOF spektrometra masa (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka).

4.3. MALDI-TOF tehnika identifikacije psihrotrofnih bakterija

MALDI-TOF tehnika koristi se za identifikaciju i usporedbu psihrotrofnih bakterija prisutnih u ohlađenom sirovom mlijeku. Rutinski se provodi nakon klasične metode i inkubacije uzoraka u trajanju od 10 dana pri temperaturi hlađenja od 4 °C. Od 30 nasađenih uzoraka na Petrijevim zdjelicama, iz serije uzoraka 451/18 ukupno je analizirano 128 morfološki različitih izraslih kolonija (boja, veličina i izgled kolonije), iz serije 464/18 analizirano je 182 kolonije te iz serije 494/18 analizirano je 168 kolonija. Sveukupno je analizirano 478 bakterijskih kolonija.

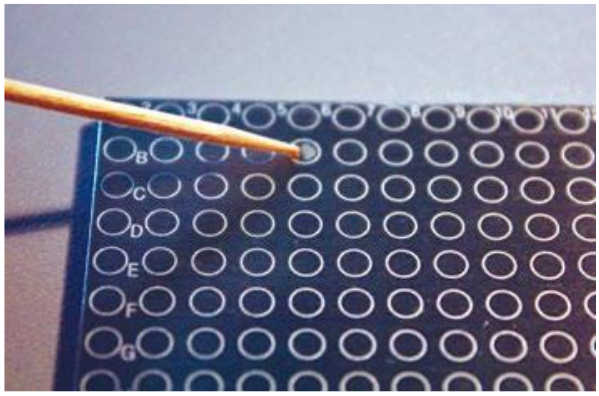
Za provođenje MALDI-TOF tehnike, osim uzorka kolonije uzgojene na Petrijevim zdjelicama, potrebno je osigurati sterilne čačkalice, automatsku pipetu do 10 µL, sterilizirane nastavke za pipete, MALDI pločicu, mravlju kiselinu, MALDI matricu (α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina), instrument MALDI-TOF spektrometra masa (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) te programski paket MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) s bibliotekom mikroorganizama s kojom se uspoređuju dobiveni rezultati.



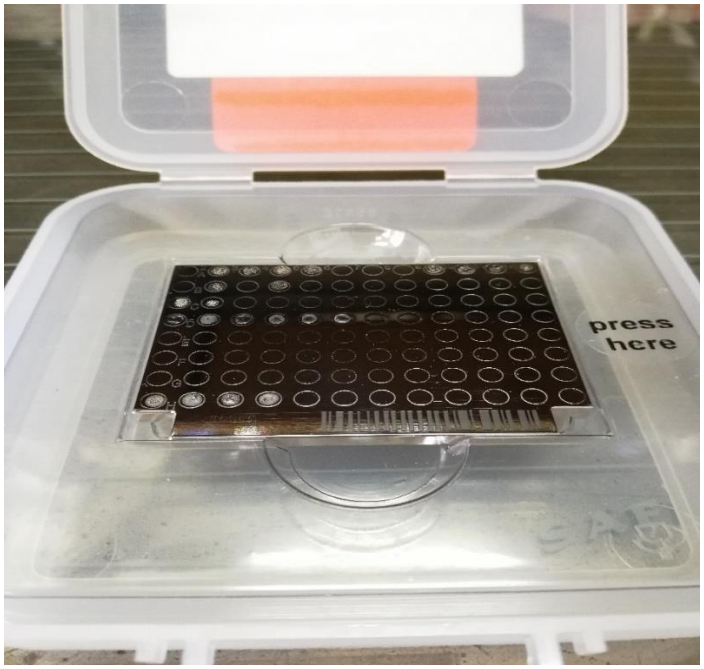
Slika 4.3.1. Prikaz MALDI-TOF spektrometra masa (microflex MALDI Biotyper Bruker)

Iz uzorka se pojedinačna kolonija sterilnom čačkalicom premazuje na MALDI pločicu te se na nju automatskom pipetom dodaje 1 µL 70% mravlje kiseline. Na uzorak posušen na sobnoj temperaturi naknadno se nanosi 1 µL MALDI matrice (otopina α-cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50% acetonitrila i 2,5% trifluorooctene kiseline). Na ovaj način pripremljen uzorak

se suši na sobnoj temperaturi te se MALDI pločica unosi u MALDI-TOF spektrometar masa i provodi se identifikacija mikoorganizma.



Slika 4.3.2. Prikaz premazivanja pojedinačne kolonije sterilnom čačkalicom na MALDI pločicu (Clinical Microbiology, MALDI Biotyper brochure)

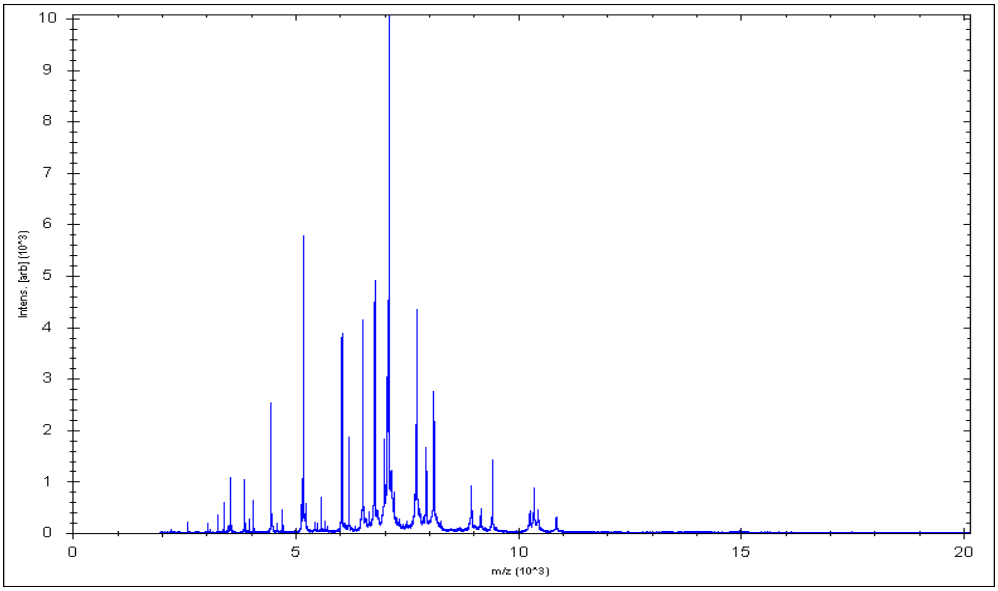


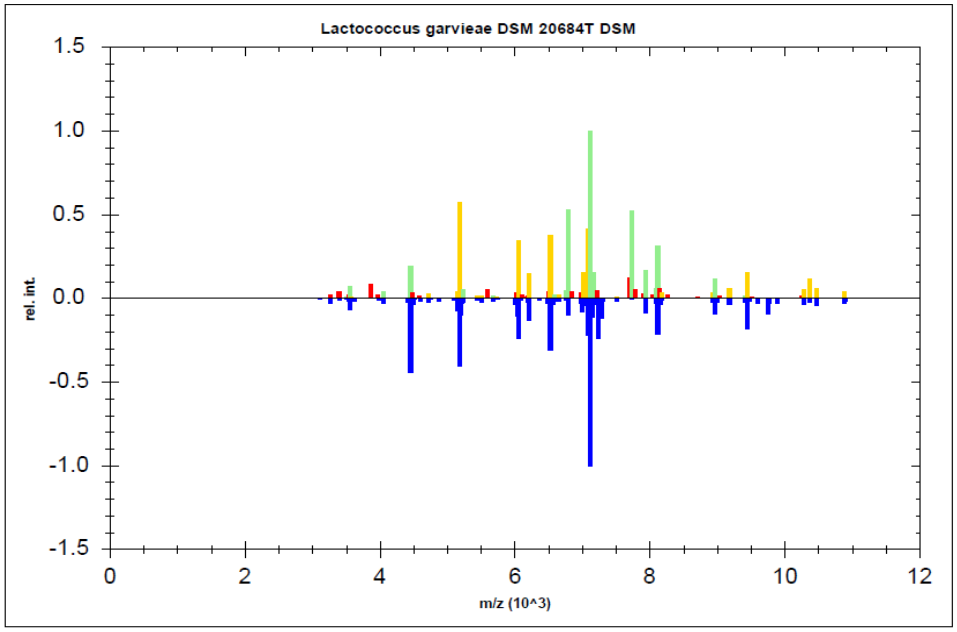
Slika 4.3.3. Priprema MALDI pločice za identifikaciju bakterija u MALDI-TOF spektrometru masa

Nakon unosa MALDI pločice u instrument, sastavlja se MALDI lista za očitanje bakterija te softver automatski generira MALDI-TOF spektar masa identificirane bakterije (Slika 4.3.4. a)). Klasifikacija mikroorganizma provodi se usporedbom („pattern matching“) MALDI-TOF

spektra masa uzorka (gornji spektar iznad linije) s referentnim spektrima pohranjenim u biblioteci mikroorganizama (donji spektar ispod linije, plave boje) i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa. Savršena poklapanja između spektra uzorka i referentnog spektra standardno su označeni zelenom bojom. Djelomična preklapanja označena su žutom bojom te razlike između uzorka i reference označene su crvenom bojom kako je prikazano na slici 4.3.4. pod b).

a)

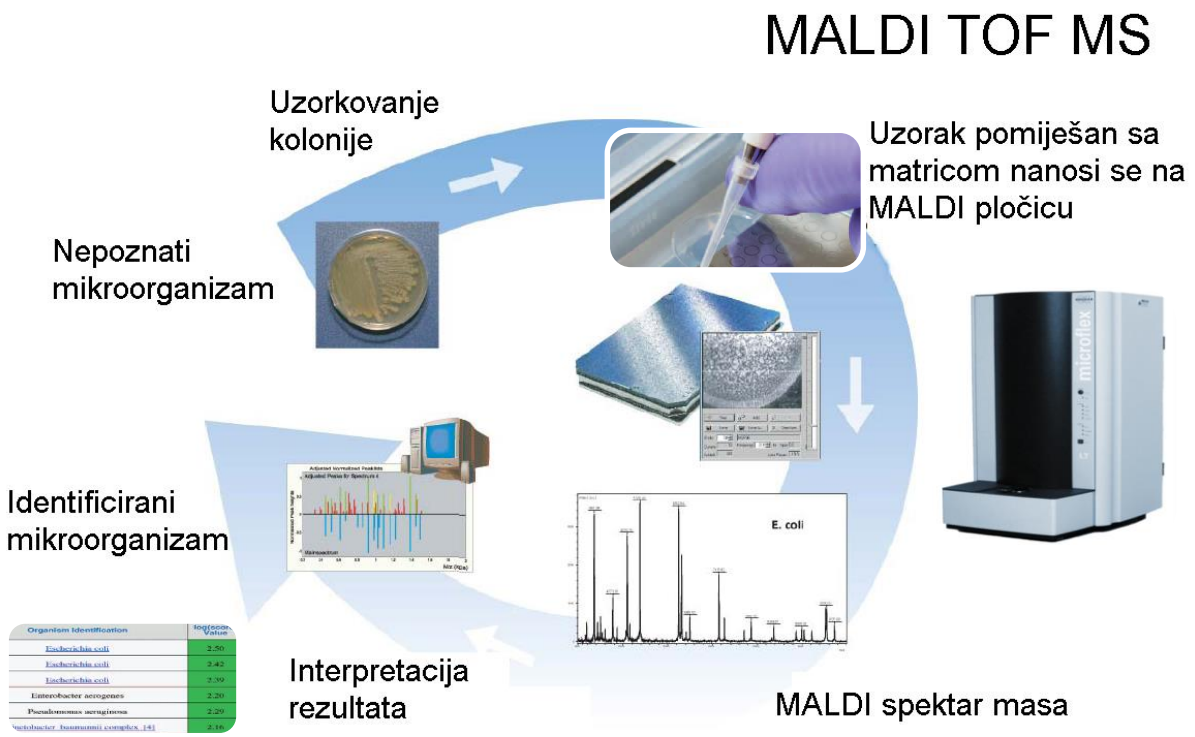




b)

Slika 4.3.4. a) MALDI-TOF spektar mase uzorka i b) Prikaz „pattern matching“ MALDI-TOF spektra masa uzorka s referentnim spektrom

Postupak uzorkovanja MALDI-TOF tehnikom identifikacije psihrotrofnih bakterija detaljnije je prikazano i objašnjeno slikom 4.3.5.



Slika 4.3.5. Prikaz tijeka rada MALDI-TOF Biotyper sustava

5. Rezultati i rasprava

5.1. Rezultati metode protočne citometrije

U tablicama 5.1.1., 5.1.2. i 5.1.3. prikazani su rezultati određivanja ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU) te ukupnog broja psihrotrofnih bakterija za 30 uzoraka mlijeka.

Tablica 5.1.1. Rezultati ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU) i ukupnog broja psihrotrofnih bakterija za uzorke šifre 451/18

Uzorci 451/18	Ukupan broj areobnih mezofilnih bakterija (CFU/mL)	Ukupan broj psihrotrofnih bakterija (CFU/mL)
1	34 000	32 000
2	23 000	12 000
3	187 000	120 000
4	59 000	35 000
5	320 000	1 500 000
6	30 000	160 000
7	99 000	47 000
8	74 000	180 000
9	291 000	1 200 000
10	214 000	300 000

Ukupan broj psihrotrofnih bakterija (CFU/mL) u uzorcima mlijeka 451/18 određen je klasičnom metodom brojanja kolonija na hranjivoj podlozi. Ukupan broj je varirao od 12 000 do 1 500 000 CFU/mL što nije sukladno preporučenim vrijednostima od 5 000 CFU/mL, koje za sirovo mlijeko navodi Samaržija i sur. (2012). U tablici 5.1.2. prikazani su rezultati serije 464/18, u kojoj samo uzorci pod brojem 2 (4 900 CFU/mL) i 6 (5 600 CFU/mL) imaju vrijednosti ukupnog broja psihrotrofnih bakterija sukladno preporučenim vrijednostima. Tablica 5.1.3. za uzorke 494/18 prikazuje ukupni broj psihrotrofnih bakterija od najmanje vrijednosti od 12 000 CFU/mL do najveće vrijednosti od 43 000 CFU/mL.

Tablica 5.1.2. Rezultati ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU) i ukupnog broja psihrotrofnih bakterija za uzorke serije 464/18

Uzorci 464/18	Ukupan broj areobnih mezofilnih bakterija (CFU/mL)	Ukupan broj psihrotrofnih bakterija (CFU/mL)
1	27 000	6 000
2	13 000	4 900
3	16 000	27 000
4	28 000	15 000
5	49 000	110 000
6	6 000	5 600
7	27 000	20 000
8	50 000	15 000
9	30 000	100 000
10	12 000	15 000

Tablica 5.1.3. Rezultati ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU) i ukupnog broja psihrotrofnih bakterija za uzorke serije 494/18

Uzorci 494/18	Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (CFU/mL)	Ukupan broj psihrotrofnih bakterija (CFU/mL)
1	21 000	15 000
2	41 000	34 000
3	24 000	16 000
4	16 000	12 000
5	20 000	36 000
6	14 000	14 000
7	15 000	15 000
8	20 000	21 000
9	40 000	43 000
10	28 000	17 000

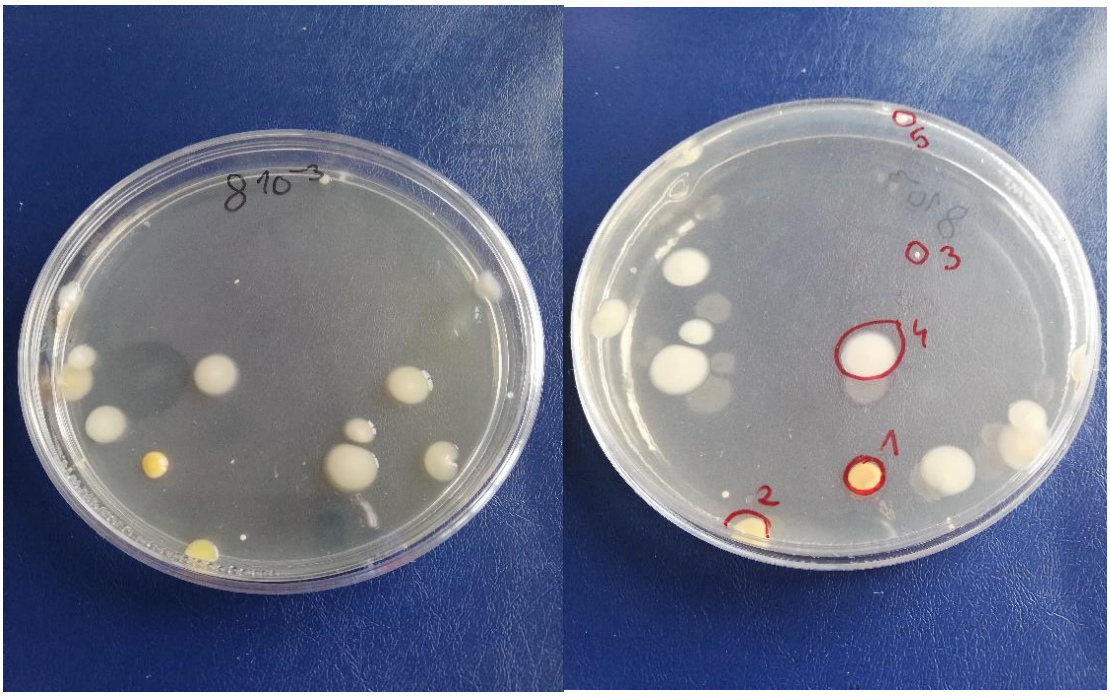
Zbog velikog broja proizvođača u mljekarskoj industriji, za utvrđivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku koristi se metoda protočne citometrije. Novom generacijom instrumenata može se u jednom satu analizirati 150 uzoraka mlijeka. Referentna metoda HRN EN ISO 4833-1:2013 koristi se za kontrolu točnosti, razinu odstupanja rezultata, kalibraciju instrumenta i međulaboratorijske kontrole. Kada se definira bakteriološka kvaliteta sirovog mlijeka, važno je naglasiti da se pojam bakteriološke kvalitete ne smije promatrati u strogim okvirima određenog rezultata. Točnost rezultata bakteriološke pretrage određena je brojnim čimbenicima koji u većoj ili manjoj mjeri utječu na rezultat. Na osnovi novih saznanja prihvaćaju se i dopunjuju svi međunarodni standardi koji reguliraju bakteriološku kvalitetu mlijeka važni za sigurnost proizvoda i za zdravlje potrošača (Samaržija i sur., 2004). Temeljeno na dosadašnjim rezultatima istraživanja u smislu preventivnih mjera, najučinkovitije je prihvatiti standard za kvalitetu sirovog mlijeka od ≤ 30 000 CFU/mL za ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija i < 5 000 CFU/mL za ukupni broj psihrotrofnih bakterija (Samaržija i sur., 2012).

5.2. Rezultati MALDI-TOF tehnike u identifikaciji psihrotrofnih bakterija

Za rezultate identifikacije izraslih kolonija na hranjivim podlogama korištena je MALDI-TOF tehnika. Prije pripreme MALDI pločice, izrasle kolonije se promotre i označe s brojevima za lakše uzorkovanje sterilnom čačkalicom. Kolonije istog morfološkog izgleda nisu uzorkovane dva puta. Pripremljene MALDI pločice snimane su MALDI-TOF spektrometrom masa dva puta radi točnosti prikazanih rezultata. Cilj uzorkovanja bio je identifikacija različitih bakterijskih vrsta.

Na slici 5.2.1. pod a) prikazan je neoznačeni uzorak broj 8 iz serije uzoraka serije 494/18 te pod b) nalazi se isti uzorak (broj 8, 494/18), označen s 5 izraslih kolonija koje se premazuju na MALDI pločicu i identificiraju u instrumentu MALDI-TOF spektrometru masa.

a) b)



Slika 5.2.1. a) Neoznačeni uzorak broj 8 (494/18) i b) Uzorak broj 8 (494/18) s označenim izraslim kolonijama

Nakon izrade MALDI liste za očitanje bakterija, programski paket automatski generira MALDI-TOF spektar masa te podudara rezultate s referentnim spektrom u biblioteci mikroorganizama. Na osnovi podudarnosti rezultata izrasle kolonije prikazane su sljedećim bakterijama:

1. *Kocuria carniphila* 1.957
2. *Acinetobacter baumannii* *1.014
3. *Corynebacterium ammoniagenes* *1.533 / *Corynebacterium stationis* 1.852
4. *Klebsiella oxytoca*
5. *Aerococcus viridans.*

Bakterije označene sa zvjezdicom (*) ukazuju na nepouzdanu identifikaciju do koje može doći uslijed nemogućnosti snimanja spektra masa zbog nedovoljnog ili prekomjernog uzimanja premaza kolonije i nedostatka referentnog spektra u biblioteci mikroorganizama. Ukoliko se rod *Corynebacterium* spp. ponavlja u nepouzdanoj identifikaciji prikazanoj kao na slici 5.2.2. pod a), postoji vjerojatnost da je bakterijski rod ispravno identificiran.

a)

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (-)	Corynebacterium ammoniagenes IMET 11243T HKJ	1.533	1697
2 (-)	Corynebacterium stationis DSM 20302T DSM	1.517	1705
3 (-)	Corynebacterium flavescens HKI 11080T HKJ	1.228	28028
4 (-)	Corynebacterium ammoniagenes DSM 20306T DSM	1.127	1697
5 (-)	Corynebacterium minutissimum x_x_10288_E IBS	1.076	38301
6 (-)	Corynebacterium striatum 12_B25690 ISB	1.058	43770
7 (-)	Comamonas kerstersii DSM 16026T HAM	1.031	225992
8 (-)	Corynebacterium flavescens IMET 11080T HKJ	1.029	28028
9 (-)	Corynebacterium minutissimum BK03540_09 ERL	1.01	38301
10 (-)	Arthrobacter arilaitensis DSM 16368T DSM	0.961	256701

b)

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+)	Corynebacterium stationis DSM 20302T DSM	1.852	1705
2 (-)	Corynebacterium ammoniagenes IMET 11243T HKJ	1.577	1697
3 (-)	Corynebacterium flavescens IMET 11080T HKJ	1.3	28028
4 (-)	Clostridium tetani type 1 1049_NCTC 279T BOG	1.096	1513
5 (-)	Pseudomonas mendocina DSM 50017T HAM	1.024	300
6 (-)	Alcaligenes faecalis ssp faecalis DSM 30030T HAM	0.997	32001
7 (-)	Corynebacterium diphtheriae DSM 44123T DSM_2	0.985	1717
8 (-)	Corynebacterium minutissimum 104_25_CCUG 36888_46 IBS	0.974	38301
9 (-)	Escherichia coli ATCC 25922 THL	0.968	562
10 (-)	Corynebacterium flavescens HKI 11080T HKJ	0.956	28028

Slika 5.2.2. Prikaz MALDI Biotyper rezultata za uzorak broj 8 (494/18) i koloniju označenu brojem 3 pod a) prvo snimanje i b) drugo snimanje

Sljedećim snimanjem utvrđena je vjerojatna identifikacija bakterijskih vrsta roda *Corynebacterium* spp. što je prikazano slikom 5.2.2. pod b). U prvom snimanju dobivena je bakterijska vrsta *Corynebacterium ammoniagenes* s ocjenom *1.533 (nepouzdana identifikacija), dok je drugim snimanjem dobivena bakterijska vrsta *Corynebacterium stationis* s ocjenom 1.852 (vjerojatna identifikacija na razini roda).

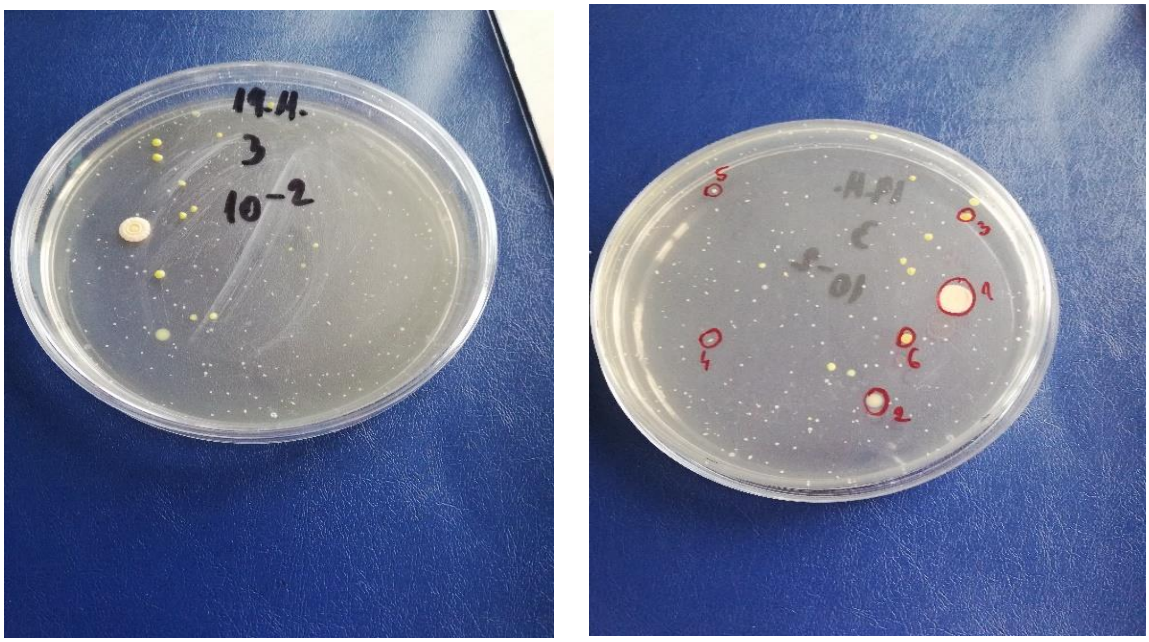
Za primjer pouzdane identifikacije, na slici 5.2.3. kolonija označena s brojem 4 prikazuje bakterijsku vrstu *Klebsiella oxytoca.* Rezultat s brojem 2.019 označen je zelenom bojom i potvrđuje identifikaciju ove bakterije.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Klebsiella oxytoca ATCC 700324 THL	2.019	571
2 (+)	Klebsiella oxytoca VA31877_09 ERL	1.943	571
3 (+)	Raoultella ornithinolytica MB_18887 CHB	1.779	54291
4 (+)	Klebsiella oxytoca VA20876_2_09 ERL	1.748	571
5 (+)	Klebsiella oxytoca ESBL 30298 PFM	1.702	571
6 (-)	Raoultella ornithinolytica CCUG 52805 CCUG	1.653	54291
7 (-)	Raoultella ornithinolytica DSM 7464T DSM	1.626	54291
8 (-)	Klebsiella oxytoca 35130 PFM	1.55	571
9 (-)	Raoultella ornithinolytica MHNC_57_7 ERL	1.51	54291
10 (-)	Klebsiella oxytoca VA20879_09 ERL	1.497	571

Slika 5.2.3. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za uzorak broj 8 (494/18) i koloniju označenu brojem 4

Na slici 5.2.4. prikazan je uzorak broj 3 iz serije uzoraka 464/18 te prikaz istog uzorka (3, 464/18) označenog s 6 izraslih kolonija.

a) b)



Slika 5.2.4. a) Neoznačeni uzorak broj 3 (464/18) i b) Uzorak broj 3 (464/18) s označenim izraslim kolonijama

Na osnovi podudarnosti rezultata izrasle kolonije prikazane su sljedećim bakterijama:

1. *Staphylococcus succinus* *1.508
2. *Microbacterium maritypicum*
3. *Microbacterium liquefaciens*
4. *Lactococcus lactis*
5. *Candida pararugosa* *1.444
6. *Microbacterium liquefaciens*.

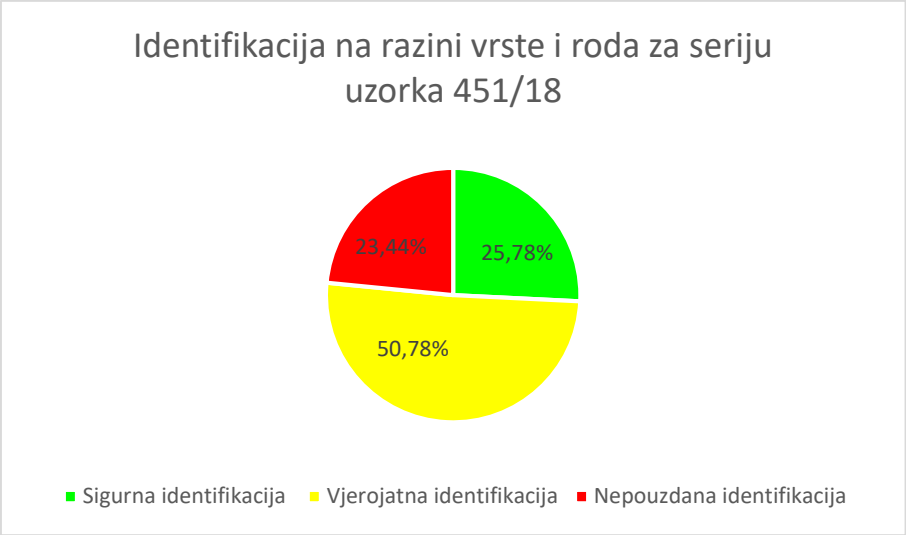
Na slici 5.2.4. zapaženo je podudaranje u izgledu i veličini izrasle kolonije pod brojem 3 i 6. Obje kolonije poprimaju okruglasti oblik i narančasto su obojene. Prema rezultatima identifikacije MALDI-TOF tehnike ustanovljeno je da se radi o istoj bakterijskoj vrsti *Microbacterium liquefaciens*. Kao što je vidljivo na slici 5.2.4. u uzorku prevladavaju sitne izrasle kolonije bijele boje koje su srasle u hranjivoj podlozi, a identifikacija MALDI-TOF tehnikom pokazala je da se radi se o bakterijskim vrstama roda *Lactococcus* spp.

Tablicom 5.2.1. prikazani su MALDI Biotyper rezultati za serije uzoraka 451/18, 464/18 i 494/18. Za seriju uzoraka 451/18 od ukupno 128 morfološki različitih kolonija, sigurnom identifikacijom ocjene od 2.000 do 3.000 utvrđeno je 33 rezultata, vjerojatnom identifikacijom ocjene od 1.700 do 1.999 utvrđeno je 65 rezultata i nepouzdanom identifikacijom ocjene manje od 1.699 utvrđeno je 30 rezultata. Za seriju uzoraka 464/18 od ukupno 182 morfološki različite kolonije sigurnom identifikacijom utvrđeno je 37 rezultata, vjerojatnom identifikacijom 77 te nepouzdanom identifikacijom 68 rezultata. Za seriju uzoraka 494/18 od ukupno 168 morfološki različitih kolonija sigurnom identifikacijom utvrđeno je 59 rezultata, vjerojatnom identifikacijom 53 te nepouzdanom identifikacijom 56 rezultata. Ukupno je snimljeno 478 kolonija MALDI-TOF spektrometrom masa.

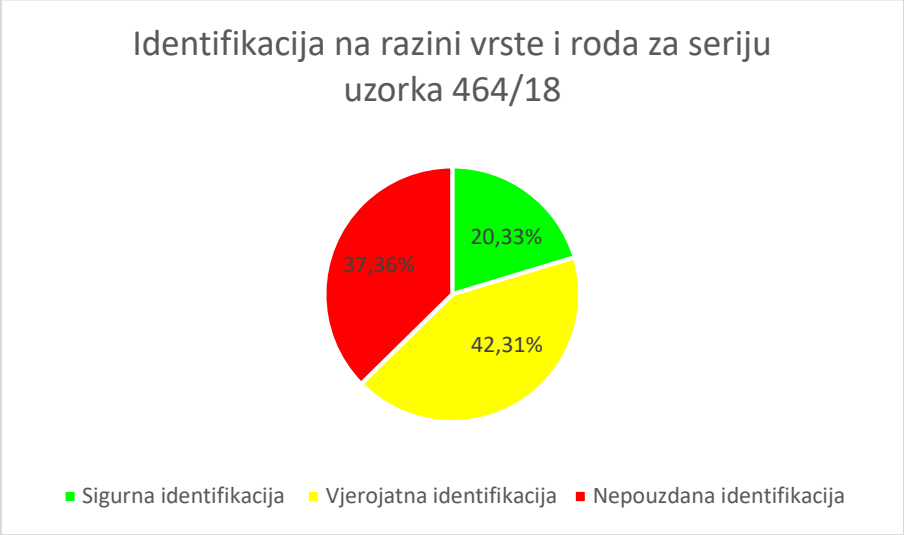
Tablica 5.2.1. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za serije uzoraka 451/18, 464/18 i 494/18

	451/18		**464/18**		**494/18**	
Ocjena		**%**		**%**		**%**
2.000-3.000	33	25,78	37	20,33	59	35,12
1.700-1.999	65	50,78	77	42,31	53	31,55
<1.699	30	23,44	68	37,36	56	33,33
Ukupno	128	100,00	182	100,00	168	100,00

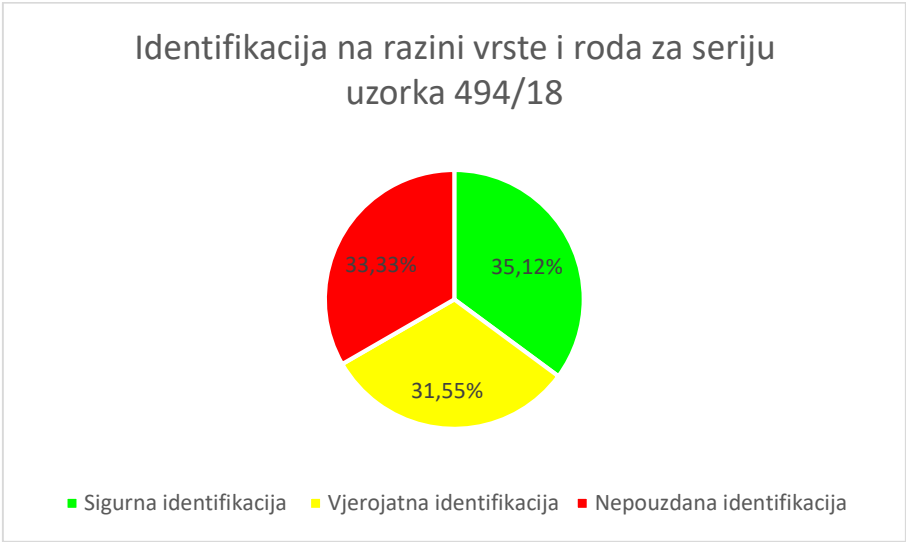
Grafikonima 5.2.5., 5.2.6. i 5.2.7. prikazani su MALDI Biotyper rezultati identifikacije bakterija na razini vrste i roda za serije 451/18, 464/18 i 494/18 izraženi u postocima (%). Upravo tim prikazom može se ukazati na raznolikost točnosti prikazanih rezultata dobivenih MALDI-TOF tehnikom za identifikaciju psihrotrofnih bakterija. U grafikonima je zelenom bojom označena sigurna identifikacija, žutom vjerojatna identifikacija te crvenom bojom nepouzdana identifikacija na razini vrste i roda.



Grafikon 5.2.5. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za seriju 451/18 (%)

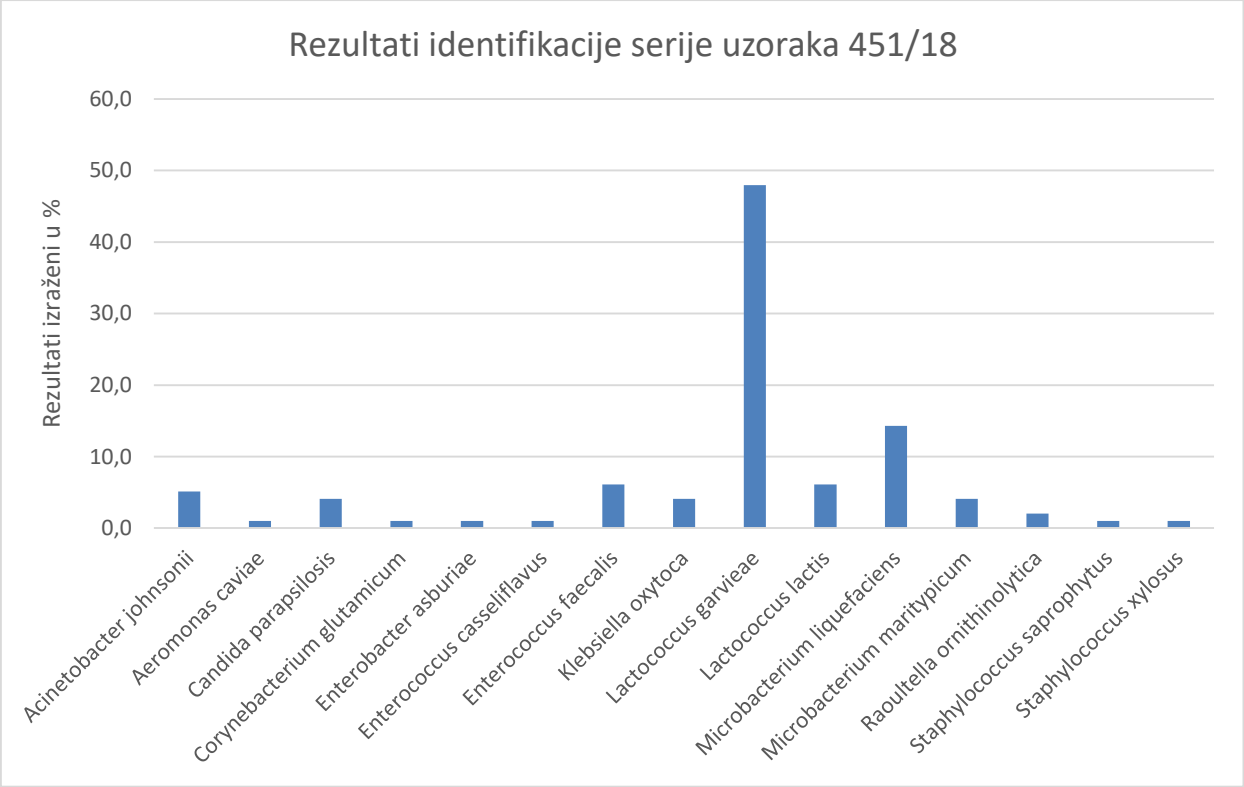


Grafikon 5.2.6. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za seriju 464/18 (%)



Grafikon 5.2.7. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za seriju 494/18 (%)

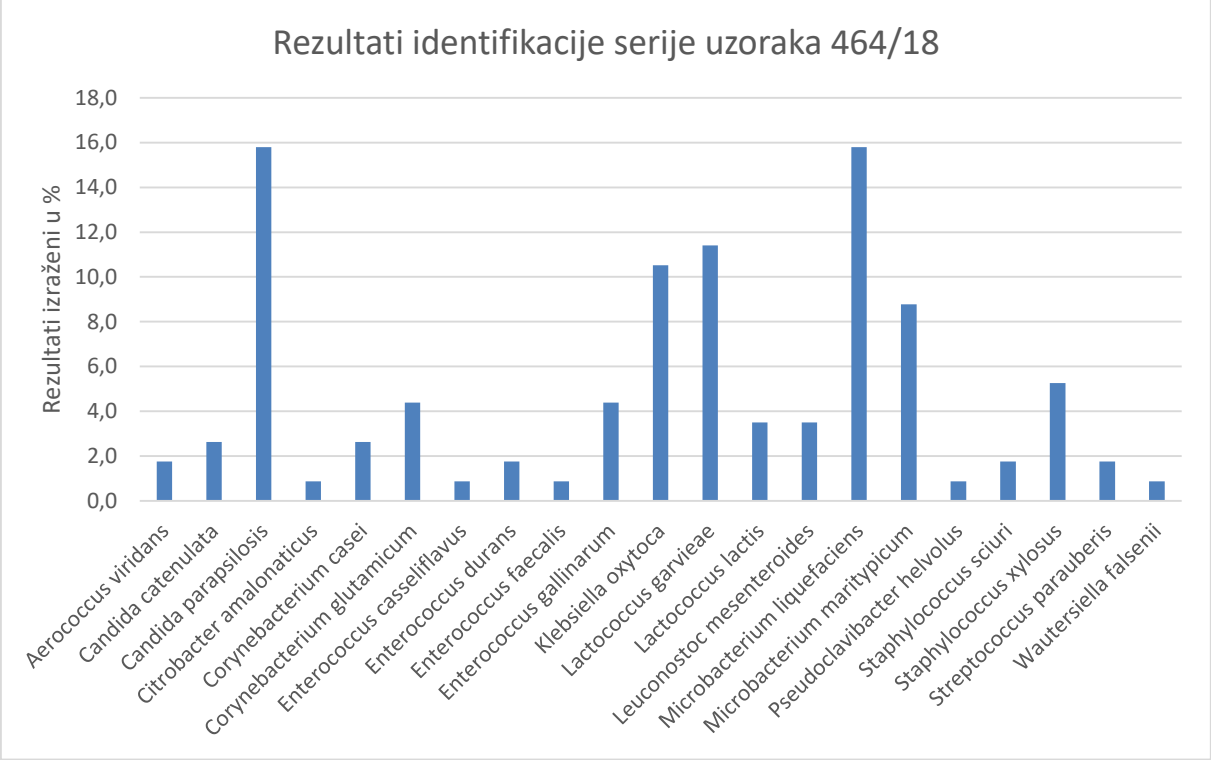
Od ukupno identificiranih 128 kolonija iz serije uzoraka 451/18, 33 rezultata je pouzdano identificirano i 65 vjerojatno identificirano (Tablica 5.2.1.) koje predstavljaju 15 bakterijskih vrsta. Grafikonom 5.2.8. prikazano je 15 bakterijskih vrsta i zastupljenost bakterija u uzorcima serije 451/18 izražena u postotnim udjelima (%).



Grafikon 5.2.8. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 451/18 izraženi u postocima (%)

Od ukupno identificiranih 15 bakterijskih vrsta iz serije uzoraka 451/18, najveći udio zauzima bakterija *Lactococcus garvieae* (48%). Sljedeća dominantna bakterijska vrsta je *Microbacterium liquefaciens* (14%), zatim *Lactococcus lactis* i *Enterococcus faecalis* (6%), *Acinetobacter johnsonii* (5%) te *Candida parapsilosis, Microbacterium maritypicum i Klebsiella oxytoca* (4%). Najmanju zastupljenost (< 4%) u uzorcima 451/18 imaju bakterije *Aeromonas caviae, Corynebacterium glutamicum, Enterobacter asburiae, Enterococcus casseliflavus, Raoultella ornithinolytica, Staphylococcus saprophytus* i *Staphylococcus xylosus*. Ovakva raspodjela rezultat je odabira kolonija bakterija na osnovu njihovih morfoloških osobina (izgled, boja, oblik).

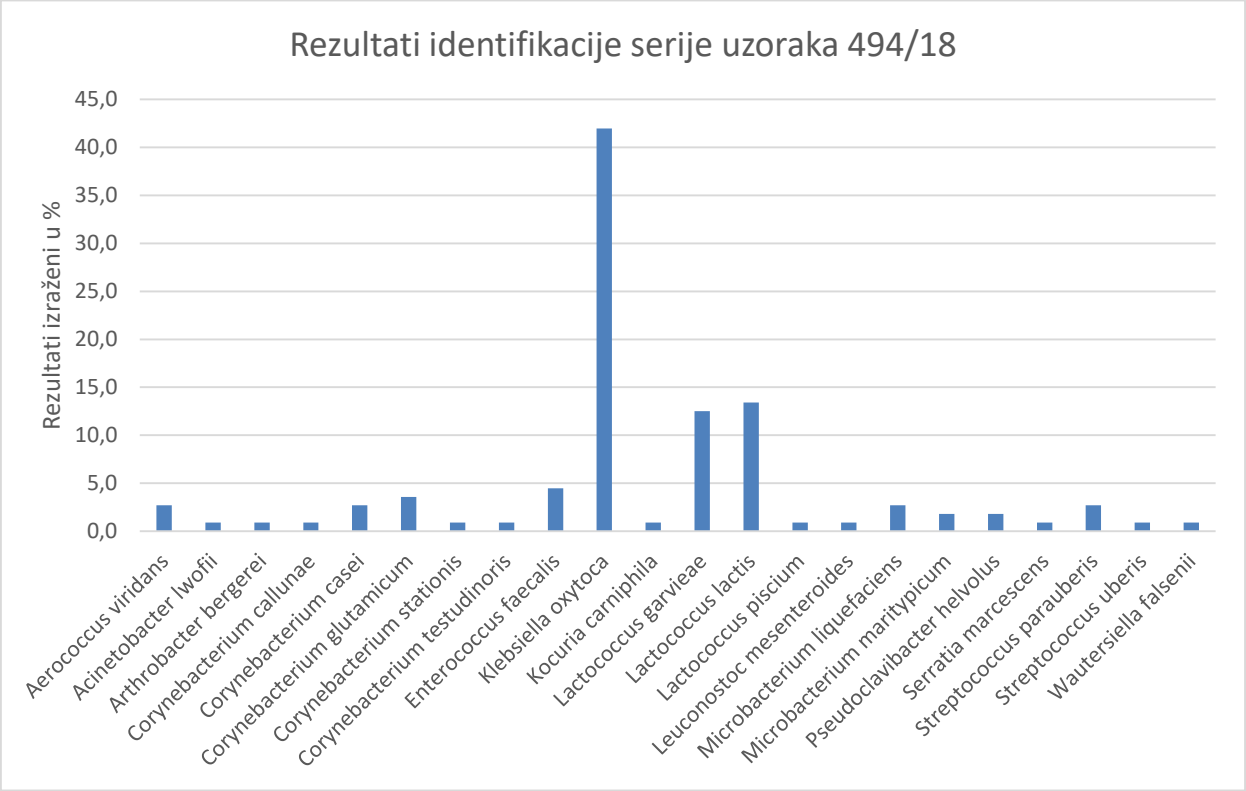
Rezultati serije 464/18 prikazani su grafikonom 5.2.9. Identificirana je 21 bakterijska vrste od 37 sigurno identificiranih i 77 vjerojatno identificiranih kolonija (Tablica 5.2.1.). Najveći udio zauzimaju *Candida parapsilosis i Microbacterium liquefaciens* (16%). Slijede bakterije prema raspodjeli: *Lactococcus garvieae* (11%), *Klebsiella oxytoca* (10%), *Microbacterium maritypicum* (9%), *Staphylococcus xylosus* (5%), *Enterococcus gallinarum i Corynebacterium glutamicum* (4%). Ostale bakterijske vrste kao što su *Aerococcus viridans, Citrobacter amalonaticus, Enterococcus casseliflavus, Enterococcus durans, Enterococcus faecalis, Pseudoclavibacter helvolus, Staphylococcus sciuri, Streptococcus parauberis i Wautersiella falsenii* rijeđe se pojavljuju u uzorcima i zauzimaju do 2% udjela bakterijskih vrsta iz serije 464/18.



Grafikon 5.2.9. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 464/18 izraženi u postocima (%)

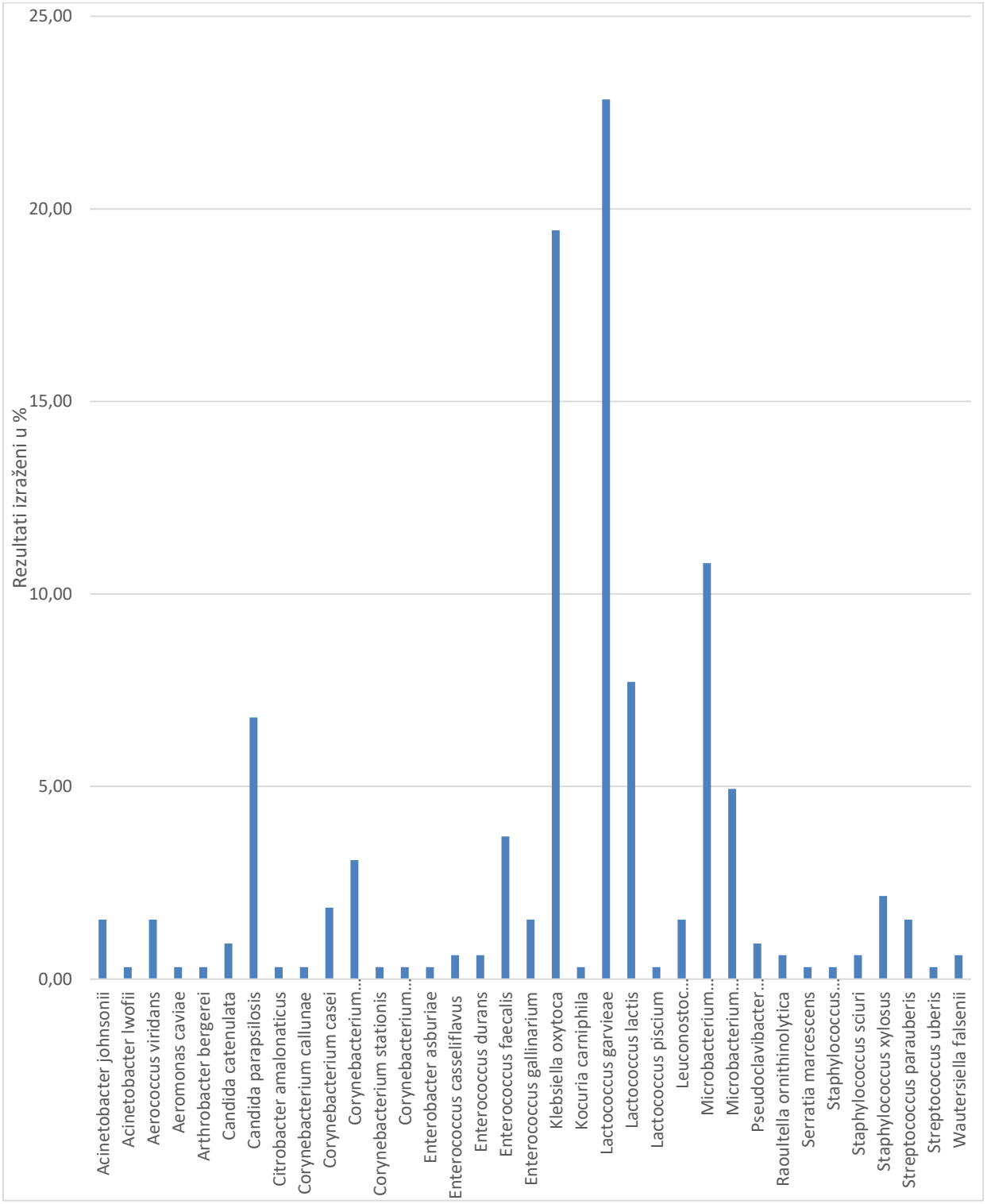
U grafikonu 5.2.10. prikazana je identifikacija 22 bakterijske vrste od 59 sigurno i 53 vjerojatno identificiranih kolonija (Tablica 5.2.1.), od kojih se najviše ističu vrijednosti bakterije *Klebsiella oxytoca* (42%) i *Lactococcus garvieae* (12%) iz serije uzoraka 494/18. Nadalje, pojavljuje se bakterija *Corynebacterium glutamicum* (3%) *te Aerococcus viridans,*

Acinetobacter lwofii, Arthrobacter bergerei, Corynebacterium callunae, Corynebacterium casei, Corynebacterium stationis, Corynebacterium testudinoris, Enterococcus faecalis, Kocuria carniphila, Lactococcus lactis, Lactococcus piscium, Leuconostoc mesenteroides, Microbacterium liquefaciens, Microbacterium maritypicum, Pseudoclavibacter helvolus, Serratia marcescens, Streptococcus parauberis, Streptococcus uberis i Wautersiella falsenii (< 3%) u seriji uzoraka 494/18. Zbog morfoloških karakteristika izraslih kolonija koje rastu na hranjivoj podlozi za određivanje ukupnog broja psihrotrofnih bakterija, prevladava bakterijska vrsta *Klebsiella oxytoca* (42%), što je rezultat odabira kolonija.



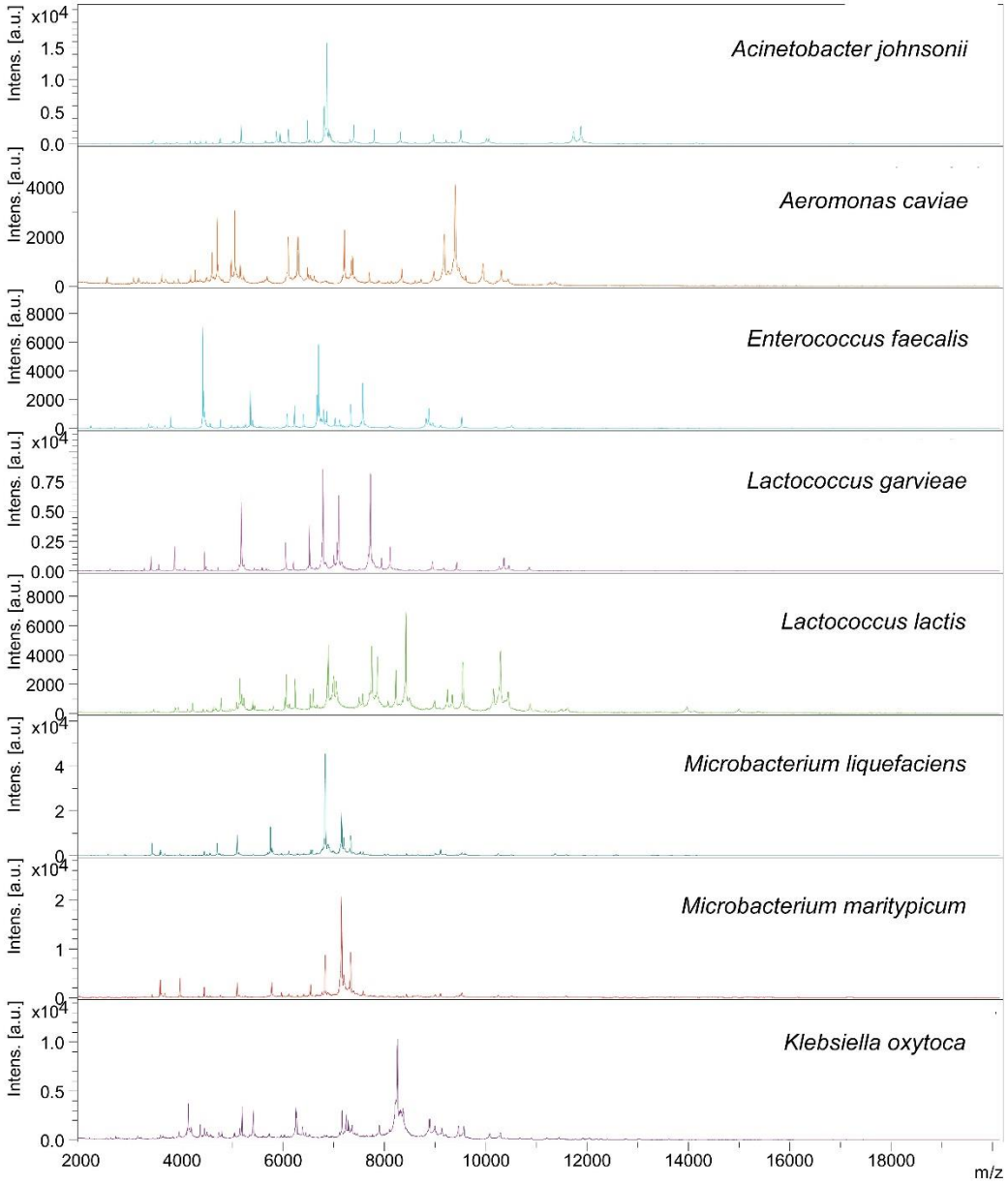
Grafikon 5.2.10. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 494/18 izraženi u postocima (%)

Prema navedenim podacima u grafikonu 5.2.11., najčešće i najzastupljenije bakterijske vrste u identifikaciji uzoraka su *Lactococcus garvieae* (23%), *Klebsiella oxytoca* (19%), *Microbacterium liquefaciens* (11%) te *Lactococcus lactis* (8%).



Grafikon 5.2.11. Rezultati identifikacije 35 bakterija iz serije uzoraka 451/18, 464/18 i 494/18 izraženi u postocima (%)

Kada bi se bakterijske vrste uspoređivale prema spektrima dobivenih MALDI-TOF masenim spektrometrom, slika 5.2.5. predstavljala bi idealan prikaz gdje se vrhovi (pikovi) svake pojedinačne bakterijske vrste razlikuju i posjeduju jedinstven „finger print“.



Slika 5.2.5. Prikaz MALDI-TOF spektra masa u identifikaciji različitih bakterijskih vrsta

Prema Vithanage i sur. (2016.) koristeći MALDI-TOF tehniku tri glavna razreda bakterija *Gammaproteobacteria, Bacilli i Actinobacteria* često su izolirani iz uzoraka, pri čemu je 94,8% bakterijskih rodova pripadalo tim razredima, a 30 vrsta činilo je 85% svih izolata. Međutim, rezultati dominantnih vrsta bakterija značajno su se razlikovali u uzorcima s različitih farmi. Razred *Gammaproteobacteria*, rod *Pseudomonas*, činio je prevladavajući dio mikrobiote sirovog mlijeka. U usporedbi s rezultatima prikazanim u grafikonu 5.2.10. dominantna bakterijska vrsta *Klebsiella oxytoca* isto tako pripada razredu *Gammaproteobacteria*. Drugi prevladavajući bakterijski razred koji se nalazi u sirovom mlijeku bio je *Bacili*, koji obuhvaća rodove *Bacillus, Paenibacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Enterococcus i Staphylococcus* spp. Treći dominantni bakterijski razred izoliran iz sirovog mlijeka bio je *Actinobacteria*, uglavnom bakterijske vrste roda *Microbacterium* spp. Sirovo mlijeko je također sadržavalo znatne količine bakterijskih vrsta rodova *Micrococcus, Rhodococcus, Aerococcus i Rothia* spp., koji su svrstani u razred *Actinobacteria* (Vithanage i sur. 2016.). Jednakim rasporedom prikazani su rezultati identifikacije MALDI-TOF tehnike grafikonom 5.2.9. gdje su bakterijske vrste roda *Lactococcus* spp. i *Microbacterium* spp. prevladavajuća mikrobiota sirovog mlijeka.

Zhang i sur. (2019.) su prikazali i taksonomski analizirali 24 uzorka mlijeka na razini roda i vrsta, za usporedbu razlika u mikrobnom sastavu sirovog mlijeka, pomoću 16S rDNA sekvenciranja s visokom propusnošću i MALDI-TOF MS tehnike. 16S rDNA sekvenciranje generirao je ukupno 4 334 304 rezultata iz 24 uzorka sirovog mlijeka, s najmanje 66 095 i maksimalno 296 169 očitanja. Identificirano je više od 11 rodova: *Acinetobacter, Carnobacterium, Chryseobacterium, Erwinia, Flavobacterium, Hafnia, Kluyvera, Lactococcus, Leuconostoc, Pseudomonas i Serratia* spp. Bakterijske vrste roda *Pseudomonas* spp. bile su prevladavajuća mikrobiota u 24 uzorka. *Serratia, Lactococcus i Acinetobacter* spp. bili su drugi najzastupljeniji rodovi u ostalim uzorcima, dok je preostalih 7 rodova predstavljalo manji udio svih rezultata. MALDI-TOF korišten je kao brza metoda za identifikaciju bakterije temeljene na spektrima dobivenim iz proteinskih ekstrakata. MALDI-TOF tehnikom identificirano je 127 psihrotrofnih bakterija koje predstavljaju 6 obitelji, 9 rodova i 20 vrsta. Analizom MALDI-TOF pokazale su se sličnosti u svim mikrobnim zajednicama s rezultatima 16S rDNA sekvenciranja gdje bakterijske vrste roda *Pseudomonas* spp. dominiraju s rezultatom od 93,68%. Među 21 bakterijskom vrstom koje pripadaju rodu *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas lundensis* bila je prevladavajuća vrsta (24,41%), a slijedila je *Pseudomonas krhki* (20,47%) i *Pseudomonas*

fluorescens (5,51%). Ukupno 28,33% (36/127) bakterijskih vrsta roda *Pseudomonas* spp. nije bilo moguće identificirati na razini vrste s ocjenom između 1,7 i 2,0 (Zhang i sur. 2019). Dobiveni rezultati prikazani u tablici 5.2.1. podudaraju se s rezultatima autora Zhang i sur. (2019.) gdje se u seriji uzoraka 451/18 nije moglo pouzdano identifirati na razini vrste 23,44% rezultata (30/128), u seriji 464/18 čak 37,36% rezultata (68/182) te u seriji 494/18 33,33% rezultata (56/168) koji su nepouzdano identifirani na razini vrste.

MALDI-TOF tehnikom te MALDI Biotyper rezultatima identifikacije bakterija na razini vrste i roda za seriju uzorka 451/18, 464/18 i 494/18; identificirano je 478 bakterijskih kolonija koje predstavljaju 20 rodova i 35 bakterijskih vrsta. Na temelju rezultata svih analiziranih serija (Grafikon 5.2.11.) može se zaključiti da rod *Lactococcus spp.* prevladava u ohlađenom mlijeku.

6. Zaključak

- Psihrotrofne bakterije glavni su mikrobni uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda i činjenica da se određene vrste svrstaju u patogene bakterije, kontrola prisutnosti psihrotrofnih bakterija u mljekarskoj industriji treba postati obaveznom redovitom rutinskom kontrolom.

- Prednost određivanja ukupnog broja psihrotrofnih bakterija metodom protočne citometrije je brza i automatizirana metoda koja može omogućiti mljekarskoj industriji brzi uvid u higijensku kvalitetu ohlađenog mlijeka.

- MALDI-TOF tehnika jednako se pokazala prikladnom za ocjenjivanje psihrotrofne populacije prisutne u sirovom mlijeku. Ova tehnika je jednostavna te visoko propusna u identifikaciji različitih bakterijskih vrsta.

- MALDI-TOF tehnikom u ohlađenom sirovom mlijeku identificirano je 20 rodova i 35 bakterijskih vrsta.

- Na temelju rezultata svih analiziranih serija može se zaključiti da rod *Lactococcus* spp. prevladava u ohlađenom mlijeku.

- Iako se MALDI-TOF metoda može koristiti za brzu i točnu identifikaciju psihrotrofnih bakterija uzgojenih na hranjivoj podlozi, u kombinaciji s metodom protočne citomerije dobiva se sveobuhvatniji uvid u mikrobiologiju sastava sirovog mlijeka.

7. Popis literature

1. Antunac, N., Havranek, J. (2013). Mlijeko. Kemija, fizika i mikrobiologija. Sveučilište u Zagrebu. Agronomski fakultet.
2. Bruker Daltonics (2011). MALDI Biotyper 3.0 User Manual. Software for Microorganism Identification and Classification. Revision 2, February 2011.
3. Bruker Daltonics (2004). MALDI Theory. Mass Spectrometry. Germany
4. Dobranić, V., Kazazić, S., Filipović, I., Mikulec, N., Zdolec, N. (2016). Composition of raw cow's milk microbiota and identification of enterococci by MALDI-TOF MS - short communication. Veterinarski arhiv. 86, 581-590.
5. HRN ISO (2010). Mlijeko - Brojenje jedinica psihrotrofnih mikroorganizama koji formiraju koloniju - Brojenje kolonija pri 6,5 °C. Broj 6730. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
6. HRN EN ISO (2013). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama – 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30°C tehnikom zalijevanja podloge. Broj 4833-1. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
7. Kazazić, S., Pečur, S., Srzić, D. (1999). Matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja. Institut Ruđer Bošković. 48 (5) 181-187.
8. Kim, H., Hardy, J., Novak, J., Ramet, J.P., Weber, F. (1983). Off-tastes in raw and reconstitued milk, FAO Animal Production and Health, Paper 35, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
9. Mikulec, N. (2017/18) Prezentacija iz kolegija Mlijeko i mliječni proizvodi (radna verzija). Mlijeko i mliječni proizvodi. Agronomski fakultet.
10. Samaržija, D. (2017). Patogeni mikroorganizmi povezani s mlijekom i mliječnim proizvodima (radna verzija teksta). Mljekarska mikrobiologija. Agronomski fakultet.
11. Samaržija, D., Antunac, N., Pogačić, T., Sikora, S. (2004). Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije. Mljekarstvo. 54(1): 39-51.
12. Samaržija, D., Zamberlin, Š., Pogačić, T. (2012). Psihrotrofne bakterije i kvaliteta mlijeka. Mljekarstvo. 62(2): 77-95.

13. Singal, N., Kumar, M., Kanaujia, K.P., Virdi, S.J. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging tehnology for microbial identification and diagnosis. Department of Microbiology. University of Delhi, New Delhi, India. Vol 6. Article 791.
14. Sorhaug, T., Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. Trends in Food Science and Tehnology. Vol 8.
15. Suhren, G. (1989). Enzymes of Psychrotrophic in Raw Food. Producer Microorganisms. McKellar, R.C CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 4-34.
16. Tamime, Y. A. (2009). Milk Processing and Quality Management. Society of Dairy Technology. Blackwell Publishing. Microbiology of Raw and Market Milks. Chapter 3. 48-51.
17. Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeratio conditions, seasonality and their spoilage potential. International Dairy Journal. Doi: 10.1016/j.idairyj.2016.02.042.n.
18. Vithanage, N. R., Yeager, T. R., Jadhav, S. R., Palombo, E. A., Datta, N. (2014). Comparison of identification systems for psychotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. International Journal of Food Microbiology. 189, 26-38.
19. Zhang, D., Palmer, J., Hoong Teh, K., Biggs, P., Flint, S. (2019.) 16rDNA high-throughput sequencing and MALDI-TOF MS are complementary when studying psychrotrophic bacterial diversity of raw cows' milk. International Dairy Journal 97. 86-91.

8. Prilog

Tablica prikaza MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 451/18

AnalyteName	AnalyteID	Organism(best match)	ScoreValue	Organism(second best match)	ScoreValue
B1(-) (C)	1-1	**not reliable identification**	1.249	**not reliable identification**	1.244
B2(+) (B)	1-2	Microbacterium liquefaciens	1.93	Microbacterium liquefaciens	1.825
B3(++) (A)	1-3	Microbacterium maritypicum	2.167	Microbacterium liquefaciens	1.922
B4(++) (B)	1-4	Microbacterium liquefaciens	2.093	Microbacterium maritypicum	2.021
B5(+) (B)	1-5	Lactococcus garvieae	1.922	Lactococcus garvieae	1.845
B6(+) (B)	1-6	Lactococcus garvieae	1.95	Lactococcus garvieae	1.929
B7(-) (C)	1-7	**not reliable identification** (Raoultella ornithinolytica)	1.695	**not reliable identification**	1.68
B8(++) (B)	1-8	Microbacterium maritypicum	2.066	Microbacterium liquefaciens	2.044
B9(++) (A)	1-9	Lactococcus garvieae	2.017	Lactococcus garvieae	1.986
B10(+) (B)	1-10	Lactococcus garvieae	1.935	Lactococcus garvieae	1.828
B11(+) (B)	1-11	Staphylococcus saprophyticus	1.711	not reliable identification	1.7
B12(-) (C)	1-12	**not reliable identification** (Acinetobacter johnsonii)	1.506	**not reliable identification**	1.398
C1(+) (B)	2-1	Microbacterium liquefaciens	1.992	Microbacterium liquefaciens	1.791

C2(++) (A)	2-2	Microbacterium liquefaciens	2.078	Microbacterium liquefaciens	1.931
C3(+) (B)	2-3	Staphylococcus xylosus	1.909	Staphylococcus xylosus	1.768
C4(+) (C)	2-4	Klebsiella oxytoca	1.92	Raoultella ornithinolytica	1.917
C5(++) (A)	2-5	Microbacterium liquefaciens	2.147	Microbacterium maritypicum	1.941
C6(+) (C)	2-6	Klebsiella oxytoca	1.906	Raoultella ornithinolytica	1.786
C7(-) (C)	2-7	**not reliable identification**	1.352	**not reliable identification**	1.248
C8(+) (B)	2-8	Candida parapsilosis	1.886	Candida parapsilosis	1.765
C9(-) (C)	2-9	**not reliable identification**	1.122	**not reliable identification**	1.122
C10(+) (B)	2-10	Lactococcus garvieae	1.932	Lactococcus garvieae	1.919
C11(-) (C)	2-11	**not reliable identification**	1.376	**not reliable identification**	1.334
C12(-) (C)	2-12	**not reliable identification**	1.146	**not reliable identification**	1.077
D1(-) (C)	2-13	**not reliable identification**	1.054	**not reliable identification**	0.957
D2(++) (A)	2-14	Microbacterium liquefaciens	2.053	Microbacterium maritypicum	1.911
D3(++) (A)	1b-1	Microbacterium liquefaciens	2.048	Microbacterium maritypicum	1.947
D4(-) (C)	1b-2	**not reliable identification**	1.227	**not reliable identification**	1.17
D5(++) (A)	1b-3	Microbacterium liquefaciens	2.041	Microbacterium liquefaciens	1.884
D6(+) (B)	1b-4	Raoultella ornithinolytica	1.788	**not reliable identification**	1.669
D7(++) (A)	1b-5	Acinetobacter johnsonii	2.142	Acinetobacter johnsonii	2.077

D8(++) (A)	1b-6	Enterococcus faecalis	2.181	Enterococcus faecalis	2.113
D9(-) (C)	1b-7	**not reliable identification**	1.286	**not reliable identification**	1.132
D10(++) (A)	1b-8	Enterococcus faecalis	2.213	Enterococcus faecalis	2.194
D11(-) (C)	1b-9	**not reliable identification**	1.316	**not reliable identification**	1.248
D12(++) (A)	1b-10	Lactococcus garvieae	2.103	Lactococcus garvieae	1.992
E1(+) (C)	3-1	Klebsiella oxytoca	1.79	Raoultella ornithinolytica	1.76
E2(++) (A)	3-2	Microbacterium liquefaciens	2.1	Microbacterium liquefaciens	1.822
E3(++) (A)	3-3	Lactococcus garvieae	2.101	Lactococcus garvieae	2.009
E4(++) (A)	3-4	Lactococcus lactis	2.021	Lactococcus lactis	1.881
E5(++) (A)	3-5	Enterococcus faecalis	2.222	Enterococcus faecalis	2.154
E6(-) (C)	3-6	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.638	**not reliable identification**	1.606
E7(+) (B)	3-7	Lactococcus garvieae	1.926	Lactococcus garvieae	1.843
E8(-) (C)	3-8	**not reliable identification**	1.141	**not reliable identification**	1.141
E9(+) (B)	3-9	Lactococcus lactis	1.79	Lactococcus lactis	1.715
E10(+) (B)	3-10	Lactococcus garvieae	1.785	Lactococcus garvieae	1.771
E11(++) (A)	3-11	Lactococcus garvieae	2.021	Lactococcus garvieae	1.986
E12(+) (B)	3-12	Lactococcus garvieae	1.814	Lactococcus garvieae	1.803

F1(++) (A)	4-1	Microbacterium liquefaciens	2.017	Microbacterium maritypicum	1.859
F2(++) (A)	4-2	Aeromonas caviae	2.09	Aeromonas caviae	2.039
F3(+) (C)	4-3	Raoultella ornithinolytica	1.822	Klebsiella oxytoca	1.714
F4(+) (B)	4-4	Enterobacter asburiae	1.927	Enterobacter cloacae	1.887
F5(+) (B)	4-5	Acinetobacter johnsonii	1.905	Acinetobacter johnsonii	1.864
F6(++) (A)	4-6	Enterococcus faecalis	2.23	Enterococcus faecalis	2.168
F7(-) (C)	4-7	**not reliable identification**	1.32	**not reliable identification**	1.304
F8(-) (C)	4-8	**not reliable identification**	1.397	**not reliable identification**	1.133
F9(++) (A)	4-9	Corynebacterium glutamicum	2.118	Corynebacterium glutamicum	2.064
F10(-) (C)	4-10	**not reliable identification**	1.155	**not reliable identification**	1.152
F11(++) (A)	4-11	Enterococcus casseliflavus	2.164	Enterococcus casseliflavus	2.082
F12(+) (B)	4-12	Candida parapsilosis	1.905	Candida parapsilosis	1.841
G1(++) (A)	5-1	Acinetobacter johnsonii	2.079	Acinetobacter johnsonii	1.995
G2(+) (B)	5-2	Lactococcus garvieae	1.843	Lactococcus garvieae	1.782
G3(+) (B)	5-3	Lactococcus garvieae	1.928	Lactococcus garvieae	1.903
G4(+) (B)	5-4	Lactococcus garvieae	1.942	Lactococcus garvieae	1.814
G5(++) (A)	5-5	Lactococcus garvieae	2.014	Lactococcus garvieae	1.977
G6(+) (B)	5-6	Lactococcus garvieae	1.766	**not reliable identification**	1.571

G7(+) (B)	5-7	Lactococcus garvieae	1.92	Lactococcus garvieae	1.828
G8(+) (B)	5-8	Microbacterium maritypicum	1.899	**not reliable identification**	1.577
G9(-) (C)	5-9	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.432	**not reliable identification**	1.413
G10(+) (B)	5-10	Lactococcus garvieae	1.9	Lactococcus garvieae	1.837
G11(+) (B)	5-11	Lactococcus garvieae	1.987	Lactococcus garvieae	1.966
G12(+) (B)	5-12	Lactococcus garvieae	1.968	Lactococcus garvieae	1.927
H1(++) (A)	6-1	Microbacterium maritypicum	2.144	**not reliable identification**	1.538
H2(-) (C)	6-2	**not reliable identification**	1.332	**not reliable identification**	1.219
H3(++) (C)	6-3	Klebsiella oxytoca	2.09	Klebsiella oxytoca	1.997
H4(+) (B)	6-4	Lactococcus garvieae	1.914	Lactococcus garvieae	1.857
H5(+) (B)	6-5	Lactococcus garvieae	1.799	Lactococcus garvieae	1.755
H6(+) (B)	6-6	Lactococcus garvieae	1.902	Lactococcus garvieae	1.883
H7(+) (B)	6-7	Lactococcus lactis	1.873	Lactococcus lactis	1.854
H8(-) (C)	6-8	**not reliable identification** (Staphylococcus equorum)	1.669	**not reliable identification**	1.252
H9(+) (B)	6-9	Lactococcus garvieae	1.887	Lactococcus garvieae	1.811
H10(-) (C)	6-10	**not reliable identification**	1.346	**not reliable identification**	1.138

H11(+) (B)	6-11	Lactococcus garvieae	1.957	Lactococcus garvieae	1.89
H12(+) (B)	6-12	Lactococcus garvieae	1.933	Lactococcus garvieae	1.887
E1(++) (A)	7-1	Microbacterium liquefaciens	2.056	Microbacterium maritypicum	1.75
E2(+) (B)	7-2	Microbacterium liquefaciens	1.956	Microbacterium liquefaciens	1.863
E3(+) (B)	7-3	Microbacterium liquefaciens	1.849	Microbacterium maritypicum	1.773
E4(-) (C)	7-4	**not reliable identification**	1.27	**not reliable identification**	1.025
E5(++) (A)	7-5	Acinetobacter johnsonii	2.005	Acinetobacter johnsonii	1.948
E6(-) (C)	7-6	**not reliable identification** (Acinetobacter johnsonii)	1.663	**not reliable identification**	1.398
E7(+) (B)	7-7	Lactococcus garvieae	1.831	Lactococcus garvieae	1.731
E8(+) (B)	7-8	Candida parapsilosis	1.855	**not reliable identification**	1.606
E9(-) (C)	7-9	**not reliable identification** (Arthrobacter sp)	1.625	**not reliable identification**	1.464
E10(-) (C)	7-10	**not reliable identification** (Staphylococcus sciuri)	1.649	**not reliable identification**	1.563
E11(+) (B)	7-11	Candida parapsilosis	1.741	**not reliable identification**	1.471
E12(-) (C)	7-12	**not reliable identification**	1.323	**not reliable identification**	1.103
F1(+) (B)	8-1	Acinetobacter johnsonii	1.909	Acinetobacter johnsonii	1.877

F2(-) (C)	8-2	**not reliable identification**	1.265	**not reliable identification**	1.225
F3(+) (B)	8-3	Lactococcus garvieae	1.781	**not reliable identification**	1.546
F4(+) (B)	8-4	Lactococcus garvieae	1.881	Lactococcus garvieae	1.795
F5(++) (A)	8-5	Enterococcus faecalis	2.108	Enterococcus faecalis	2.084
F6(+) (B)	8-6	Lactococcus garvieae	1.865	Lactococcus garvieae	1.704
F7(++) (A)	8-7	Enterococcus faecalis	2.184	Enterococcus faecalis	2.153
F8(-) (C)	8-8	**not reliable identification** (Enterococcus faecalis)	1.425	**not reliable identification**	1.258
F9(+) (B)	8-9	Lactococcus garvieae	1.917	Lactococcus garvieae	1.836
F10(+) (B)	8-10	Lactococcus garvieae	1.767	Lactococcus garvieae	1.751
F11(+) (B)	8-11	Lactococcus garvieae	1.927	Lactococcus garvieae	1.8
F12(+) (B)	8-12	Lactococcus garvieae	1.916	Lactococcus garvieae	1.754
G1(+) (B)	9-1	Lactococcus garvieae	1.792	**not reliable identification**	1.623
G2(+) (B)	9-2	Lactococcus garvieae	1.872	Lactococcus garvieae	1.756
G3(+) (B)	9-3	Lactococcus garvieae	1.962	Lactococcus garvieae	1.804
G4(+) (B)	9-4	Lactococcus garvieae	1.706	**not reliable identification**	1.637
G5(-) (C)	9-5	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.548	**not reliable identification**	1.153

G6(+) (B)	9-6	Lactococcus garvieae	1.726	**not reliable identification**	1.362
G7(+) (B)	9-7	Lactococcus garvieae	1.802	**not reliable identification**	1.567
G8(-) (C)	9-8	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.612	**not reliable identification**	1.429
G9(-) (C)	9-9	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.684	**not reliable identification**	1.407
G10(+) (B)	9-10	Lactococcus garvieae	1.824	**not reliable identification**	1.567
G11(++) (A)	9-11	Microbacterium liquefaciens	2.004	Microbacterium maritypicum	1.903
G12(+) (B)	9-12	Lactococcus garvieae	1.856	Lactococcus garvieae	1.805
H1(+) (B)	10-1	Lactococcus garvieae	1.73	**not reliable identification**	1.498
H2(++) (A)	10-2	Lactococcus lactis	2.171	Lactococcus lactis	2.107
H3(+) (B)	10-3	Lactococcus lactis	1.954	Lactococcus lactis	1.882
H4(+) (B)	10-4	Lactococcus garvieae	1.84	Lactococcus garvieae	1.724
H5(+) (B)	10-5	Lactococcus lactis	1.961	Lactococcus lactis	1.925
H6(+) (B)	10-6	Lactococcus garvieae	1.877	Lactococcus garvieae	1.87
H7(+) (B)	10-7	Lactococcus garvieae	1.861	Lactococcus garvieae	1.793
H8(+) (B)	10-8	Lactococcus garvieae	1.73	**not reliable identification**	1.591

Tablica prikaza MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 464/18

AnalyteName	AnalyteID	Organism(best match)	ScoreValue	Organism(second best match)	ScoreValue
A1(+) (B)	1. 2-1	Staphylococcus xylosus	1.767	**not reliable identification**	1.573
A2(+) (B)	1. 2-2	Staphylococcus xylosus	1.755	Staphylococcus xylosus	1.74
A3(-) (C)	1. 2-3	**not reliable identification**	1.309	**not reliable identification**	1.28
A4(++) (A)	1. 2-4	Corynebacterium glutamicum	2.134	Corynebacterium glutamicum	2.058
A5(++) (A)	1. 2-5	Microbacterium liquefaciens	2.213	Microbacterium maritypicum	1.965
A6(+) (B)	1. 2-6	Staphylococcus xylosus	1.944	Staphylococcus xylosus	1.853
A7(++) (A)	1. 2-7	Corynebacterium glutamicum	2.324	Corynebacterium glutamicum	2.281
A8(-) (C)	1. 2-8	**not reliable identification**	1.275	**not reliable identification**	1.143
A9(+) (B)	1. 2-9	Candida parapsilosis	1.826	Candida parapsilosis	1.702
A10(+) (B)	1. 2-10	Candida parapsilosis	1.799	Candida parapsilosis	1.741
A11(+) (B)	1. 2-11	Candida parapsilosis	1.856	Candida parapsilosis	1.84
A12(+) (B)	1. 2-12	Enterococcus gallinarum	1.994	Enterococcus gallinarum	1.947
B1(-) (C)	2. 2-13	**not reliable identification** (Candida parapsilosis)	1.52	**not reliable identification**	1.496
B2(+) (B)	2. 2-14	Candida parapsilosis	1.849	Candida parapsilosis	1.775
B3(+) (B)	2. 2-15	Candida parapsilosis	1.882	Candida parapsilosis	1.802

B9(-) (C)	1. 2-13	**not reliable identification**	1.062	**not reliable identification**	1.056
B10(-) (C)	1. 2-14	**not reliable identification**	1.113	**not reliable identification**	0.909
B11(+) (B)	1. 2-15	Candida parapsilosis	1.849	Candida parapsilosis	1.792
B12(+) (B)	1. 2-16	Enterococcus gilvus	2.018	**not reliable identification**	1.27
C1(-) (C)	2. 2-1	**not reliable identification**	1.176	**not reliable identification**	1.092
C2(++) (A)	2. 2-2	Staphylococcus xylosus	2.005	Staphylococcus xylosus	1.882
C3(+) (B)	2. 2-3	Staphylococcus xylosus	1.715	**not reliable identification**	1.696
C4(+) (B)	2. 2-4	Staphylococcus xylosus	1.792	**not reliable identification**	1.688
C5(++) (A)	2. 2-5	Microbacterium liquefaciens	2.149	Microbacterium liquefaciens	1.905
C6(++) (A)	2. 2-6	Corynebacterium glutamicum	2.072	Corynebacterium glutamicum	1.985
C7(+) (B)	2. 2-7	Enterococcus gallinarum	1.995	Enterococcus gallinarum	1.971
C8(+++) (A)	2. 2-8	Corynebacterium glutamicum	2.322	Corynebacterium glutamicum	2.23
C9(+) (B)	2. 2-9	Aerococcus viridans	1.728	**not reliable identification**	1.324
C10(+) (B)	2. 2-10	Candida parapsilosis	1.993	Candida parapsilosis	1.932
C11(++) (A)	2. 2-11	Leuconostoc mesenteroides	2.008	Leuconostoc mesenteroides	1.752
C12(+) (B)	2. 2-12	Candida parapsilosis	1.928	Candida parapsilosis	1.889
D1(+) (B)	1. 7-1	Candida parapsilosis	1.849	Candida parapsilosis	1.811
D2(-) (C)	1. 7-2	**not reliable identification**	1.505	**not reliable identification**	1.441

		(Leuconostoc mesenteroides)			
D3(-) (C)	1. 7-3	Candida parapsilosis	1.815	**not reliable identification**	1.678
D4(-) (C)	1. 7-4	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.603	**not reliable identification**	1.327
D5(+) (B)	1. 7-5	Lactococcus garvieae	1.939	**not reliable identification**	1.683
D6(-) (C)	1. 7-6	**not reliable identification**	1.315	**not reliable identification**	1.25
E1(+) (B)	2. 7-1	Klebsiella oxytoca	1.793	**not reliable identification**	1.439
E2(+) (B)	2. 7-2	Candida parapsilosis	1.959	Candida parapsilosis	1.919
E3(+) (B)	2. 7-3	Candida parapsilosis	1.746	Candida parapsilosis	1.727
E4(+) (B)	2. 7-4	Candida parapsilosis	1.956	Candida parapsilosis	1.914
E5(-) (C)	2. 7-5	**not reliable identification** (Lactococcus lactis)	1.626	**not reliable identification**	1.521
E6(-) (C)	2. 7-6	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.537	**not reliable identification**	1.45
E7(++) (A)	2. 7-7	Leuconostoc mesenteroides	2.139	Leuconostoc mesenteroides	1.923
E8(-) (C)	2. 7-8	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.485	**not reliable identification**	1.32
E9(-) (C)	2. 7-9	**not reliable identification**	0.94	**not reliable identification**	0.907
E10(-) (C)	2. 7-10	**not reliable identification**	1.197	**not reliable identification**	1.159

E11(+) (B)	2. 7-11	Corynebacterium casei	1.819	**not reliable identification**	1.37
F1(-) (C)	1. 8-1	**not reliable identification**	1.284	**not reliable identification**	1.268
F2(+) (B)	1. 8-2	Candida parapsilosis	1.868	Candida parapsilosis	1.827
F3(+) (B)	1. 8-3	Enterococcus gallinarum	1.994	Enterococcus gallinarum	1.819
F4(-) (C)	1. 8-4	**not reliable identification**	1.11	**not reliable identification**	1.06
F5(+) (B)	1. 8-5	Leuconostoc mesenteroides	1.86	Leuconostoc mesenteroides	1.816
F6(-) (C)	1. 8-6	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.44	**not reliable identification**	1.251
F7(-) (C)	1. 8-7	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.576	**not reliable identification**	1.524
G1(+) (B)	2. 8-1	Lactococcus lactis	1.77	**not reliable identification**	1.679
G2(-) (C)	2. 8-2	**not reliable identification**	1.392	**not reliable identification**	1.19
G3(+) (B)	2. 8-3	Corynebacterium glutamicum	1.988	Corynebacterium glutamicum	1.9
G4(-) (C)	2. 8-4	**not reliable identification**	1.325	**not reliable identification**	1.245
G5(+) (B)	2. 8-5	Candida parapsilosis	1.945	Candida parapsilosis	1.86
G6(+) (B)	2. 8-6	Leuconostoc mesenteroides	1.944	Leuconostoc mesenteroides	1.774
G7(+) (B)	2. 8-7	Candida parapsilosis	1.836	Candida parapsilosis	1.79
G8(++) (A)	2. 8-8	Enterococcus durans	2.001	**not reliable identification**	1.571

G9(-) (C)	2. 8-9	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.513	**not reliable identification**	1.264
C1(-) (C)	3-1	**not reliable identification** (Microbacterium liquefaciens)	1.578	**not reliable identification**	1.442
C2(++) (B)	3-2	Microbacterium liquefaciens	2.067	Microbacterium maritypicum	2.054
C3(+) (B)	3-3	Candida catenulata	1.908	Candida catenulata	1.79
C4(-) (C)	3-4	**not reliable identification**	1.162	**not reliable identification**	1.133
C5(+) (B)	3-5	Lactococcus garvieae	1.823	**not reliable identification**	1.61
C6(++) (A)	3-6	Microbacterium maritypicum	2.013	Microbacterium liquefaciens	1.971
C7(+) (B)	3-7	Microbacterium maritypicum	1.951	**not reliable identification**	1.896
C8(+) (B)	3-8	Lactococcus garvieae	1.893	Lactococcus garvieae	1.856
C9(+) (B)	3-9	Lactococcus lactis	1.815	Lactococcus lactis	1.72
C10(++) (A)	3-10	Microbacterium maritypicum	2.013	Microbacterium liquefaciens	1.958
C11(+) (B)	3-11	Lactococcus garvieae	1.824	**not reliable identification**	1.637
D1(-) (C)	3-1	**not reliable identification** (Staphylococcus succinus)	1.508	**not reliable identification**	1.105
D2(++) (B)	3-2	Microbacterium maritypicum	2.067	Microbacterium liquefaciens	2.023
D3(+) (B)	3-3	Microbacterium liquefaciens	1.911	Microbacterium liquefaciens	1.765

D4(+) (B)	3-4	Lactococcus lactis	1.951	Lactococcus lactis	1.934
D5(-) (C)	3-5	**not reliable identification**	1.444	**not reliable identification**	1.272
D6(++) (B)	3-6	Microbacterium liquefaciens	2.205	Microbacterium maritypicum	2.087
D7(+) (B)	3-7	Lactococcus garvieae	1.895	Lactococcus garvieae	1.753
E1(+) (B)	4-1	Streptococcus parauberis	1.981	Streptococcus parauberis	1.905
E2(++) (A)	4-2	Microbacterium liquefaciens	2.01	Microbacterium maritypicum	1.767
E3(-) (C)	4-3	**not reliable identification**	1.308	**not reliable identification**	1.243
E5(-) (C)	4-1	**not reliable identification**	1.082	**not reliable identification**	1.033
E6(-) (C)	4-2	**not reliable identification**	1.047	**not reliable identification**	1.011
E7(+) (B)	4-3	Klebsiella oxytoca	1.723	**not reliable identification**	1.404
B3(++) (B)	10-1	Microbacterium liquefaciens	2.081	Microbacterium maritypicum	2.077
B4(+) (B)	10-2	Klebsiella oxytoca	1.968	Klebsiella oxytoca	1.908
B5(+) (B)	10-3	Pseudoclavibacter helvolus	1.712	**not reliable identification**	1.166
B6(+) (B)	10-4	Microbacterium liquefaciens	1.939	Microbacterium maritypicum	1.869
B7(++) (C)	10-5	Klebsiella oxytoca	2.048	Klebsiella oxytoca	2
B8(-) (C)	10-6	**not reliable identification**	1.223	**not reliable identification**	1.174
B9(-) (C)	10-1	**not reliable identification**	0.978	**not reliable identification**	0.926
B10(-) (C)	10-2	**not reliable identification**	1.164	**not reliable identification**	1.123

B11(-) (C)	10-3	**not reliable identification** (Klebsiella oxytoca)	1.599	**not reliable identification**	1.555
B12(++) (A)	10-4	Microbacterium liquefaciens	2.099	Microbacterium liquefaciens	1.887
D8(++) (B)	10-5	Microbacterium liquefaciens	2.165	Microbacterium maritypicum	2.107
D9(-) (C)	10-6	**not reliable identification**	1.372	**not reliable identification**	1.259
D10(+) (B)	10-7	Klebsiella oxytoca	1.708	**not reliable identification**	1.686
D11(+) (B)	10-8	Klebsiella oxytoca	1.838	**not reliable identification**	1.654
D12(+) (B)	10-9	Microbacterium liquefaciens	1.835	**not reliable identification**	1.572
E8(++) (B)	9-1	Microbacterium maritypicum	2.253	Microbacterium liquefaciens	2.078
E9(+) (B)	9-2	Microbacterium liquefaciens	1.892	**not reliable identification**	1.53
E10(++) (B)	9-3	Microbacterium maritypicum	2.063	Microbacterium liquefaciens	2.001
E11(++) (C)	9-4	Klebsiella oxytoca	2.11	Klebsiella oxytoca	2.092
E12(++) (A)	9-5	Microbacterium liquefaciens	2.039	Microbacterium liquefaciens	1.768
F1(-) (C)	9-6	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.621	**not reliable identification**	1.493
F2(++) (A)	9-7	Lactococcus garvieae	2.07	Lactococcus garvieae	1.915
F3(+) (B)	9-8	Lactococcus garvieae	1.998	Lactococcus garvieae	1.933
F4(-) (C)	9-1	**not reliable identification**	1.467	**not reliable identification**	1.464

		(Microbacterium liquefaciens)			
F5(-) (C)	9-2	**not reliable identification** (Klebsiella oxytoca)	1.696	**not reliable identification**	1.363
F6(-) (C)	9-3	**not reliable identification** (Microbacterium liquefaciens)	1.659	**not reliable identification**	1.381
F7(++) (A)	9-4	Lactococcus garvieae	2.015	Lactococcus garvieae	1.987
F8(++) (C)	9-5	Klebsiella oxytoca	2.139	Klebsiella oxytoca	2.115
F9(+) (B)	9-6	Lactococcus garvieae	1.914	Lactococcus garvieae	1.816
G1(-) (C)	5-1	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.669	**not reliable identification**	1.315
G2(+) (B)	5-2	Lactococcus garvieae	1.759	Lactococcus garvieae	1.751
G3(-) (C)	5-3	**not reliable identification**	1.376	**not reliable identification**	1.315
G4(+) (B)	5-4	Lactococcus garvieae	1.746	**not reliable identification**	1.653
G5(+) (B)	5-1	Microbacterium liquefaciens	1.859	**not reliable identification**	1.524
G6(-) (C)	5-2	**not reliable identification**	1.439	**not reliable identification**	0.967
G7(+) (B)	5-3	Klebsiella oxytoca	1.998	Klebsiella oxytoca	1.713
G8(+) (B)	5-4	Lactococcus garvieae	1.81	Lactococcus garvieae	1.776
G9(++) (B)	5-5	Microbacterium maritypicum	2.097	Microbacterium liquefaciens	2.065

G10(+) (B)	5-6	Microbacterium maritypicum	1.988	Microbacterium liquefaciens	1.72
C1(-) (C)	A 1-1	**not reliable identification** (Enterococcus gallinarum)	1.691	**not reliable identification**	1.638
C2(-) (C)	A 1-2	**not reliable identification**	1.272	**not reliable identification**	1.1
C3(++) (A)	A 1-3	Enterococcus durans	2.009	**not reliable identification**	1.643
C4(+) (B)	A 1-4	Lactococcus lactis	1.903	Lactococcus lactis	1.876
C5(-) (C)	A 1-5	**not reliable identification** (Lactobacillus sp)	1.361	**not reliable identification**	1.282
C7(+) (B)	B 1-1	Enterococcus casseliflavus	1.865	Enterococcus casseliflavus	1.843
C8(+) (B)	B 1-2	Enterococcus gallinarum	1.84	Enterococcus gallinarum	1.745
D1(-) (C)	A 4-1	**not reliable identification**	1.274	**not reliable identification**	1.172
D2(+) (B)	A 4-2	Corynebacterium casei	1.872	**not reliable identification**	1.068
D3(++) (B)	A 4-3	Microbacterium maritypicum	2.168	Microbacterium liquefaciens	2.073
D4(-) (C)	A 4-4	**not reliable identification**	1.401	**not reliable identification**	1.299
D5(-) (C)	A 4-5	**not reliable identification**	1.098	**not reliable identification**	0.982
D6(+) (B)	A 4-6	Candida parapsilosis	1.885	Candida parapsilosis	1.795
D7(-) (C)	A 4-7	**not reliable identification**	1.01	**not reliable identification**	1.002
D8(+) (B)	A 4-8	Candida parapsilosis	1.895	Candida parapsilosis	1.862
D9(-) (C)	A 4-9	**not reliable identification**	1.492	**not reliable identification**	1.316

		(Aerococcus viridans)			
D10(-) (C)	A-10	**not reliable identification**	1.278	**not reliable identification**	1.211
D11(-) (C)	A 4-11	**not reliable identification**	1.204	**not reliable identification**	1.165
D12(+) (B)	A 4-12	Streptococcus parauberis	1.981	Streptococcus parauberis	1.902
E1(+) (C)	B 4-1	Klebsiella oxytoca	1.964	Klebsiella oxytoca	1.939
E2(+) (B)	B 4-2	Klebsiella oxytoca	1.856	**not reliable identification**	1.646
E3(++) (A)	B 4-3	Enterococcus faecalis	2.261	Enterococcus faecalis	2.212
E4(-) (C)	B 4-4	**not reliable identification**	1.17	**not reliable identification**	1.004
E5(-) (C)	B 4-5	**not reliable identification**	1.135	**not reliable identification**	1.029
E6(+) (B)	B 4-6	Wautersiella falsenii	1.998	Wautersiella falsenii	1.869
E7(+) (B)	B 4-7	Corynebacterium casei	1.748	**not reliable identification**	1.186
E8(-) (C)	B 4-8	**not reliable identification**	1.254	**not reliable identification**	1.155
E9(-) (C)	B 4-9	**not reliable identification** (Arthrobacter sp)	1.56	**not reliable identification**	1.339
E10(-) (C)	B 4-10	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.563	**not reliable identification**	1.21
E11(-) (C)	B 4-11	**not reliable identification**	1.083	**not reliable identification**	1.068
E12(+) (B)	B 4-12	Aerococcus viridans	1.86	**not reliable identification**	1.662
F1(+) (B)	A 6-1	Staphylococcus sciuri	1.765	**not reliable identification**	1.659

F2(-) (C)	A 6-2	**not reliable identification**	1.321	**not reliable identification**	1.156
F3(-) (C)	A 6-3	**not reliable identification**	1.31	**not reliable identification**	1.219
F4(++) (A)	A 6-4	Microbacterium liquefaciens	2.052	Microbacterium maritypicum	1.79
F5(+) (C)	A 6-5	Klebsiella oxytoca	1.953	Klebsiella oxytoca	1.845
F6(++) (A)	A 6-6	Microbacterium liquefaciens	2.036	Microbacterium maritypicum	1.968
F7(-) (C)	A 6-7	**not reliable identification**	1.115	**not reliable identification**	1.079
F8(+) (B)	A 6-8	Candida catenulata	1.921	Candida catenulata	1.886
F9(-) (C)	A 6-9	**not reliable identification**	1.287	**not reliable identification**	1.243
F10(+) (B)	A 6-10	Staphylococcus sciuri	1.836	**not reliable identification**	1.584
F11(+) (B)	A 6-11	Microbacterium maritypicum	1.999	Microbacterium liquefaciens	1.964
F12(+) (B)	A 6-12	Lactococcus garvieae	1.769	**not reliable identification**	1.658
G1(++) (A)	B 6-1	Microbacterium liquefaciens	2.03	Microbacterium liquefaciens	1.838
G2(++) (A)	B 6-2	Microbacterium liquefaciens	2.098	Microbacterium liquefaciens	1.848
G3(-) (C)	B 6-3	**not reliable identification** (Pseudoclavibacter sp)	1.544	**not reliable identification**	1.112
G4(-) (C)	B 6-4	**not reliable identification**	1.262	**not reliable identification**	1.212
G5(-) (C)	B 6-5	**not reliable identification**	1.208	**not reliable identification**	1.189
G6(-) (C)	B 6-6	**not reliable identification**	1.695	**not reliable identification**	1.1

		(Microbacterium lacticum)			
G7(-) (C)	B 6-7	**not reliable identification**	1.385	**not reliable identification**	1.198
G8(-) (C)	B 6-8	**not reliable identification**	1.053	**not reliable identification**	1.028
G9(-) (C)	B 6-9	**not reliable identification**	1.166	**not reliable identification**	1.109
G10(+) (B)	B 6-10	Candida catenulata	1.897	Candida catenulata	1.819
G11(-) (C)	B 6-11	**not reliable identification**	1.286	**not reliable identification**	1.119
G12(++) (B)	B 6-12	Citrobacter amalonaticus	2.267	Citrobacter amalonaticus	2.265

Tablica prikaza MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 494/18

AnalyteName	AnalyteID	Organism(best match)	ScoreValue	Organism(second best match)	ScoreValue
A1(+) (B)	1-1	Klebsiella oxytoca	1.715	**not reliable identification**	1.549
A2(+) (B)	1-2	Klebsiella oxytoca	1.997	Klebsiella oxytoca	1.871
A3(++) (A)	1-3	Lactococcus lactis	2.064	Lactococcus lactis	1.963
A4(++) (A)	1-4	Lactococcus lactis	2.177	Lactococcus lactis	2.094
A5(+) (B)	1-5	Lactococcus lactis	1.996	Lactococcus lactis	1.781
A6(-) (C)	1-6	**not reliable identification**	1.286	**not reliable identification**	1.116
A7(+) (B)	1-7	Lactococcus piscium	1.774	**not reliable identification**	1.126
A8(-) (C)	1-8	**not reliable identification**	1.181	**not reliable identification**	1.15
A9(+) (B)	1-9	Klebsiella oxytoca	1.8	**not reliable identification**	1.592
B1(++) (C)	1-1	Klebsiella oxytoca	2.211	Klebsiella oxytoca	2.172
B2(+) (C)	1-2	Klebsiella oxytoca	1.974	Klebsiella oxytoca	1.923
B3(+) (C)	1-3	Klebsiella oxytoca	1.949	Raoultella ornithinolytica	1.775
B4(-) (C)	1-4	**not reliable identification**	1.176	**not reliable identification**	1.144
B5(+) (B)	1-5	Leuconostoc mesenteroides	1.909	Leuconostoc mesenteroides	1.77
B6(++) (A)	1-6	Lactococcus lactis	2.08	Lactococcus lactis	1.984
B7(-) (C)	1-7	**not reliable identification**	1.148	**not reliable identification**	1.031

B8(++) (A)	1-8	Lactococcus lactis	2.044	Lactococcus lactis	1.856
C1(-) (C)	2-1	**not reliable identification**	1.27	**not reliable identification**	1.232
C2(+) (B)	2-2	Microbacterium lacticum	1.702	**not reliable identification**	1.167
C3(-) (C)	2-3	**not reliable identification** (Acinetobacter sp)	1.416	**not reliable identification**	1.314
C4(-) (C)	2-4	**not reliable identification** (Microbacterium lacticum)	1.632	**not reliable identification**	1.114
C5(+) (B)	2-5	Lactococcus garvieae	1.973	Lactococcus garvieae	1.949
C6(+) (B)	2-6	Klebsiella oxytoca	1.712	**not reliable identification**	1.687
C7(++) (A)	2-7	Lactococcus lactis	2.07	Lactococcus lactis	1.826
C8(-) (C)	2-8(2-2)	**not reliable identification**	0.927	**not reliable identification**	0.923
C9(-) (C)	2-9	**not reliable identification**	1.186	**not reliable identification**	1.135
C10(+) (B)	2-10	Lactococcus garvieae	1.938	Lactococcus garvieae	1.864
C11(-) (C)	2-11	**not reliable identification** (Microbacterium lacticum)	1.605	**not reliable identification**	1.219
C12(+) (B)	2-12	Lactococcus garvieae	1.832	Lactococcus garvieae	1.799
D1(++) (A)	2-1	Microbacterium maritypicum	2.08	**not reliable identification**	1.678
D2(-) (C)	2-2	**not reliable identification** (Acinetobacter sp)	1.332	**not reliable identification**	1.314

D3(+) (C)	2-3	Klebsiella oxytoca	1.96	Klebsiella oxytoca	1.902
D4(++) (A)	2-4	Lactococcus lactis	2.127	Lactococcus lactis	2.12
D5(+) (B)	2-5	Lactococcus garvieae	1.728	**not reliable identification**	1.648
D6(-) (C)	2-6	**not reliable identification** (Acinetobacter sp)	1.36	**not reliable identification**	1.256
D7(++) (A)	2-7	Lactococcus lactis	2.103	Lactococcus lactis	1.87
D8(++) (A)	2-8	Lactococcus garvieae	2.05	Lactococcus garvieae	1.903
D9(-) (C)	2-9	**not reliable identification**	1.16	**not reliable identification**	1.134
D10(+) (B)	2-10	Lactococcus garvieae	1.991	Lactococcus garvieae	1.934
D11(++) (A)	2-11	Lactococcus lactis	2.217	Lactococcus lactis	2.007
D12(++) (A)	2-12	Lactococcus garvieae	2.057	Lactococcus garvieae	2.006
E1(-) (C)	3-1	**not reliable identification** (Arthrobacter sp)	1.527	**not reliable identification**	1.517
E2(++) (C)	3-2	Klebsiella oxytoca	2.156	Klebsiella oxytoca	2.016
E3(++) (C)	3-3	Klebsiella oxytoca	2.215	Klebsiella oxytoca	2.133
E4(++) (C)	3-4	Klebsiella oxytoca	2.014	Klebsiella oxytoca	1.929
E5(-) (C)	3-5	**not reliable identification** (Klebsiella oxytoca)	1.69	**not reliable identification**	1.547
E6(++) (A)	3-6	Streptococcus parauberis	2.186	Streptococcus parauberis	1.997

E7(+) (C)	3-7	Klebsiella oxytoca	1.994	Klebsiella oxytoca	1.975
E8(-) (C)	5-1	**not reliable identification**	1.218	**not reliable identification**	1.212
E9(+) (B)	5-2	Klebsiella oxytoca	1.825	**not reliable identification**	1.561
E10(+) (C)	5-3	Klebsiella oxytoca	1.876	Klebsiella oxytoca	1.84
E11(-) (C)	5-4	**not reliable identification**	1.223	**not reliable identification**	1.122
E12(-) (C)	5-5	**not reliable identification**	1.58	**not reliable identification**	1.458
F1(-) (C)	3-1	**not reliable identification**	0.946	**not reliable identification**	0.928
F2(++) (C)	3-2	Klebsiella oxytoca	2.093	Klebsiella oxytoca	1.87
F3(+) (C)	3-3	Klebsiella oxytoca	1.884	Raoultella ornithinolytica	1.727
F4(-) (C)	3-4	**not reliable identification**	1.151	**not reliable identification**	1.108
F5(+) (B)	3-5	Streptococcus parauberis	1.96	Streptococcus parauberis	1.751
F6(+) (B)	3-6	Aerococcus viridans	1.734	**not reliable identification**	1.657
F7(++) (A)	3-7	Acinetobacter lwoffii	2.172	Acinetobacter lwoffii	1.936
F8(-) (C)	3-8	**not reliable identification**	1.225	**not reliable identification**	1.185
F9(-) (C)	5-1	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.685	**not reliable identification**	1.588
F10(+) (C)	5-2	Klebsiella oxytoca	1.954	Klebsiella oxytoca	1.927
F11(+) (B)	5-3	Aerococcus viridans	1.789	Aerococcus viridans	1.753

F12(++) (C)	5-4	Klebsiella oxytoca	2.167	Klebsiella oxytoca	2.166
G1(-) (C)	4-1	**not reliable identification**	1.11	**not reliable identification**	1.014
G2(+) (B)	4-2	Klebsiella oxytoca	1.822	**not reliable identification**	1.641
G3(+) (C)	4-3	Klebsiella oxytoca	1.948	Klebsiella oxytoca	1.839
G4(+) (B)	4-4	Pseudoclavibacter helvolus	1.841	**not reliable identification**	1.188
G5(+++) (C)	4-5	Klebsiella oxytoca	2.317	Klebsiella oxytoca	2.159
G6(++) (A)	4-6	Corynebacterium glutamicum	2.281	Corynebacterium glutamicum	2.19
G7(++) (A)	4-7	Lactococcus lactis	2.017	Lactococcus lactis	1.999
G8(-) (C)	4-8	**not reliable identification**	1.173	**not reliable identification**	1.123
G9(-) (C)	4-9	**not reliable identification** (Klebsiella oxytoca)	1.65	**not reliable identification**	1.517
G10(++) (A)	4-10	Enterococcus faecalis	2.19	Enterococcus faecalis	2.059
G11(+) (B)	4-11	Klebsiella oxytoca	1.854	Klebsiella oxytoca	1.74
G12(++) (C)	4-13	Klebsiella oxytoca	2.075	Klebsiella oxytoca	2.06
H1(++) (A)	4-1	Arthrobacter bergerei	2.028	Arthrobacter ardleyensis	1.97
H2(-) (C)	4-2	**not reliable identification**	1.326	**not reliable identification**	1.204
H3(-) (C)	4-3	**not reliable identification**	1.396	**not reliable identification**	1.001
H4(-) (C)	4-4	**not reliable identification**	1.522	**not reliable identification**	1.142

		(Pseudoclavibacter helvolus)			
H5(++) (C)	4-5	Klebsiella oxytoca	2.037	Klebsiella oxytoca	2
H6(+) (B)	4-6	Klebsiella oxytoca	1.934	**not reliable identification**	1.649
H7(-) (C)	4-7	**not reliable identification**	1.281	**not reliable identification**	1.228
H8(++) (C)	4-8	Klebsiella oxytoca	2.172	Raoultella ornithinolytica	2.105
H9(+) (B)	4-9	Lactococcus lactis	1.997	Lactococcus lactis	1.944
H10(+) (B)	4-10	Pseudoclavibacter helvolus	1.799	**not reliable identification**	1.203
H11(++) (A)	4-11	Enterococcus faecalis	2.239	Enterococcus faecalis	2.15
H12(++) (C)	4-12	Klebsiella oxytoca	2.14	Klebsiella oxytoca	2.052
A1(+) (B)	6-1	Corynebacterium testudinoris	1.791	**not reliable identification**	1.061
A2(-) (C)	6-2	**not reliable identification** (Staphylococcus saprophyticus)	1.692	**not reliable identification**	1.433
A3(++) (C)	6-3	Klebsiella oxytoca	2.125	Klebsiella oxytoca	1.942
A4(-) (C)	6-4	**not reliable identification**	1.153	**not reliable identification**	0.995
A5(+) (C)	6-5	Klebsiella oxytoca	1.979	Raoultella ornithinolytica	1.76
A6(-) (C)	6-6	**not reliable identification**	1.146	**not reliable identification**	1.026
A7(++) (C)	6-7	Klebsiella oxytoca	2.032	Raoultella ornithinolytica	1.894
A8(-) (C)	6-8	**not reliable identification**	1.174	**not reliable identification**	1.024

A9(-) (C)	6-9	**not reliable identification** (Corynebacterium casei)	1.576	**not reliable identification**	1.325
A10(+) (B)	6-10	Corynebacterium casei	1.864	**not reliable identification**	1.257
A11(-) (C)	6-11	**not reliable identification**	1.129	**not reliable identification**	1.112
B1(-) (C)	6-1	**not reliable identification**	1.191	**not reliable identification**	1.142
B2(+) (B)	6-2	Klebsiella oxytoca	1.905	Klebsiella oxytoca	1.738
B3(-) (C)	6-3	**not reliable identification**	1.242	**not reliable identification**	1.02
B4(+) (B)	6-4	Corynebacterium casei	1.724	**not reliable identification**	1.159
B5(++) (C)	6-5	Klebsiella oxytoca	2.042	Klebsiella oxytoca	2.01
B6(+) (B)	6-6	Klebsiella oxytoca	1.965	Klebsiella oxytoca	1.75
B7(-) (C)	6-7	**not reliable identification**	1.056	**not reliable identification**	1.056
B8(+) (B)	6-8	Corynebacterium casei	1.857	**not reliable identification**	1.357
B9(++) (A)	6-9	Lactococcus lactis	2.029	Lactococcus lactis	2.006
B10(++) (C)	6-10	Klebsiella oxytoca	2.185	Klebsiella oxytoca	2.163
B11(+) (B)	9-6	Lactococcus garvieae	1.776	Lactococcus garvieae	1.768
B12(+) (B)	9-7	Lactococcus garvieae	1.824	Lactococcus garvieae	1.741
C1(-) (C)	7-1	**not reliable identification** (Pseudoclavibacter helvolus)	1.581	**not reliable identification**	1.218

C2(++) (C)	7-2	Klebsiella oxytoca	2.073	Raoultella ornithinolytica	1.903
C3(+) (B)	7-3	Klebsiella oxytoca	1.942	Klebsiella oxytoca	1.751
C4(+++) (A)	7-4	Corynebacterium glutamicum	2.344	Corynebacterium glutamicum	2.32
C5(-) (C)	7-5	**not reliable identification**	1.2	**not reliable identification**	1.085
C6(-) (C)	7-6	**not reliable identification**	1.245	**not reliable identification**	1.01
C7(-) (C)	7-7	**not reliable identification**	1.219	**not reliable identification**	1.14
C8(++) (A)	7-8	Corynebacterium glutamicum	2.235	Corynebacterium glutamicum	2.207
C9(++) (A)	7-9	Enterococcus faecalis	2.17	Enterococcus faecalis	2.126
C12(-) (C)	7-13	**not reliable identification**	1.181	**not reliable identification**	1.154
D1(++) (A)	7-1	Corynebacterium callunae	2.117	**not reliable identification**	1.196
D2(++) (A)	7-2	Microbacterium maritypicum	2.05	Microbacterium liquefaciens	1.701
D3(++) (C)	7-3	Klebsiella oxytoca	2.022	Klebsiella oxytoca	1.915
D4(+) (C)	7-4	Klebsiella oxytoca	1.949	Klebsiella oxytoca	1.947
D5(++) (C)	7-5	Klebsiella oxytoca	2.02	Klebsiella oxytoca	1.836
D6(++) (A)	7-6	Lactococcus lactis	2.227	Lactococcus lactis	2.135
D7(-) (C)	7-7	**not reliable identification**	1.332	**not reliable identification**	1.188
D8(+++) (A)	7-8	Corynebacterium glutamicum	2.351	Corynebacterium glutamicum	2.33
D9(++) (A)	7-9	Streptococcus parauberis	2.083	Streptococcus parauberis	1.892

D10(++) (A)	7-10	Enterococcus faecalis	2.196	Enterococcus faecalis	2.195
D11(-) (C)	7-11	**not reliable identification**	1.145	**not reliable identification**	1.128
D12(-) (C)	7-12	**not reliable identification**	1.228	**not reliable identification**	1.145
E1(+) (B)	8-1	Kocuria carniphila	1.957	**not reliable identification**	1.073
E2(-) (C)	8-2	**not reliable identification**	1.014	**not reliable identification**	0.968
E3(+) (B)	8-3	Corynebacterium stationis	1.852	**not reliable identification**	1.577
E4(+) (B)	8-4	Aerococcus viridans	1.826	Aerococcus viridans	1.759
E5(++) (C)	8-5	Klebsiella oxytoca	2.019	Klebsiella oxytoca	1.943
E6(-) (C)	8-6	**not reliable identification** (Aerococcus viridans)	1.551	**not reliable identification**	1.454
E7(-) (C)	8-7	**not reliable identification**	1.075	**not reliable identification**	1.027
E8(-) (C)	9-1	**not reliable identification**	1.077	**not reliable identification**	0.98
E9(++) (A)	9-2	Microbacterium liquefaciens	2.061	Microbacterium liquefaciens	1.73
E10(++) (A)	9-3	Serratia marcescens	2.022	Serratia ureilytica	1.931
E11(++) (A)	9-4	Lactococcus lactis	2.236	Lactococcus lactis	2.055
E12(+) (B)	9-5	Lactococcus garvieae	1.879	Lactococcus garvieae	1.707
F1(-) (C)	8-1	**not reliable identification**	1.076	**not reliable identification**	1.075
F2(+) (B)	8-2	Wautersiella falsenii	1.735	**not reliable identification**	1.695

F3(++) (A)	8-3	Lactococcus lactis	2.15	Lactococcus lactis	2.012
F4(+) (B)	8-4	Klebsiella oxytoca	1.914	Klebsiella oxytoca	1.768
F5(++) (C)	8-5	Klebsiella oxytoca	2.154	Klebsiella oxytoca	2.129
F6(-) (C)	8-6	**not reliable identification**	1.499	**not reliable identification**	1.498
F7(-) (C)	8-7	**not reliable identification**	1.097	**not reliable identification**	1.051
F8(-) (C)	8-8	**not reliable identification**	1.215	**not reliable identification**	1.004
F10(+) (B)	10-1	Klebsiella oxytoca	1.79	**not reliable identification**	1.686
F11(++) (C)	10-2	Klebsiella oxytoca	2.053	Klebsiella oxytoca	2.021
F12(++) (A)	10-3	Streptococcus uberis	2.131	Streptococcus uberis	2.094
G1(+) (B)	9-1	Microbacterium liquefaciens	1.996	Microbacterium maritypicum	1.771
G2(++) (C)	9-2	Klebsiella oxytoca	2.096	Klebsiella oxytoca	2.043
G3(++) (C)	9-3	Klebsiella oxytoca	2.033	Raoultella ornithinolytica	1.98
G4(++) (A)	9-4	Enterococcus faecalis	2.123	Enterococcus faecalis	2.03
G5(-) (C)	9-5	**not reliable identification** (Lactococcus garvieae)	1.681	**not reliable identification**	1.592
G6(++) (A)	9-6	Lactococcus garvieae	2.044	Lactococcus garvieae	1.866
G7(-) (C)	9-7	**not reliable identification**	1.361	**not reliable identification**	1.195
G8(+) (B)	9-8	Lactococcus garvieae	1.932	**not reliable identification**	1.678

G9(+) (B)	9-9	Lactococcus garvieae	1.902	Lactococcus garvieae	1.879
G11(+) (B)	10-1	Klebsiella oxytoca	1.758	**not reliable identification**	1.592
G12(++) (A)	10-2	Lactococcus garvieae	2.032	Lactococcus garvieae	1.944

Životopis

Dora Pavičić rođena je 4. veljače 1996. godine u Zagrebu. Pohađala je osnovnu školu Šestine s kojom je stekla osnovna znanja i vještine kontinuiranog učenja. Nakon osnovne škole 2010. godine upisuje XVI. jezičnu gimnaziju u Zagrebu gdje započinje upoznavanje i usavršavanje engleskog i talijanskog jezika. Usporedno je pohađala školu stranih jezika gdje je završila C.3 stupanj engleskog jezika. Pri završetku gimnazije 2014. godine, nastavlja svoje obrazovanje na Agronomskog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Na Agronomskom fakultetu završava 3 godine preddiplomskog studija smjer Biljne znanosti. Ovim radom završit će sveučilišno obrazovanje diplomskog studija Proizvodnja i prerada mlijeka. Svakodnevnim radom na računalu odlično se upoznala sa Microsoft Office programskim paketom. U slobodno vrijeme voli se družiti s prijateljima i obitelji. Osam godina je aktivno trenirala latinoameričke i standarne plesove dok trenutno vježba cross-fit u teretani s prijateljicama. Osim treniranja voli šetati i uživati u prirodi.