

Određivanje broja i zastupljenosti vrsta aerobno mezofilnih bakterija u sirovom nekonzerviranom i konzerviranom mlijeku

Lovrić, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:887837>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



ODREĐIVANJE BROJA I ZASTUPLJENOSTI VRSTA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA U SIROVOM NEKONZERVIRANOM I KONZERVIRANOM MLIJEKU

DIPLOMSKI RAD

Nina Lovrić

Zagreb, rujan 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

ODREĐIVANJE BROJA I ZASTUPLJENOSTI VRSTA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA U SIROVOM NEKONZERVIRANOM I KONZERVIRANOM MLIJEKU

DIPLOMSKI RAD

Nina Lovrić

Mentor: Doc. dr. sc. Nataša Mikulec

Komentor: Dr. sc. Snježana Kazazić

Zagreb, rujan 2020.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Nina Lovrić**, JMBAG 0178100068, rođena 14.01.1996 u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

ODREĐIVANJE BROJA I ZASTUPLJENOSTI VRSTA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA U SIROVOM NEKONZERVIRANOM I KONZERVIRANOM MLIJEKU

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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 s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Nina Lovrić**, JMBAG 0178100068, naslova

ODREĐIVANJE BROJA I ZASTUPLJENOSTI VRSTA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA U SIROVOM NEKONZERVIRANOM I KONZERVIRANOM MLIJEKU

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpis:

1. Doc. dr. sc. Nataša Mikulec, mentor

2. Dr. sc. Snježana Kazazić, komentor

3. Prof. dr. sc. Neven Antunac, član

4. Prof. dr. sc. Samir Kalit, član

Zahvala

Iznimnu zahvalnost dugujem mojoj mentorici doc. dr. sc. Nataši Mikulec na pruženoj prilici izrade istraživačkog rada, savjetima i pomoći bez čega ovaj rad ne bi bio izvediv. Isto tako, zahvaljujem mojoj neposrednoj voditeljici dr. sc. Snježani Kazazić koja je svojim radom, pomoći i savjetima uvelike pridonijela izradi i olakšala mi pisanje ovog rada i odrađivanje analiza. Hvala Vam na pomoći, strpljenju i mentorstvu!

Htjela bi zahvaliti i Franu koji je uz mene od početka mog studiranja. Hvala na velikoj podršci, pomoći i neizmjerne ljubavi!

Na kraju, htjela bi ovaj rad i zahvalu posebno posvetiti mojoj obitelji bez čije pomoći, usmjeravanja i podrške nikada ne bi stigla do ove stepenice obrazovanja. Najveću zahvalnost zasigurno dugujem mojim roditeljima koji su me niz godina nesebično usmjeravali, podizali, odgajali i omogućili mi sve što danas imam. Hvala Vam na strpljenju, nesebičnoj ljubavi i podršci.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Cilj rada.....	2
2.	Aerobno mezofilne bakterije u sirovom mlijeku	3
2.1.	Gram-pozitivne aerobno mezofilne bakterije.....	4
2.1.1.	Rod <i>Lactococcus</i>	4
2.1.2.	Rod <i>Streptococcus</i>	4
2.1.3.	Rod <i>Lactobacillus</i>	5
2.1.4.	Rod <i>Micrococcus</i>	5
2.1.5.	Rod <i>Enterococcus</i>	6
2.1.6.	Rod <i>Leuconostoc</i>	6
2.1.7.	Rod <i>Pediococcus</i>	6
2.1.8.	Rod <i>Bifidobacterium</i>	7
2.2.	Gram-negativne aerobno mezofilne bakterije.....	7
2.2.1.	Rod <i>Serratia</i>	7
2.2.2.	Rod <i>Acinetobacter</i>	8
2.3.	Prisutnost aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku.....	8
2.4.	Izvori kontaminacije	9
2.4.1.	Životinja i staja	10
2.4.2.	Muzna oprema za životinju	10
2.4.3.	Pohrana i transport	11
2.5.	Metode određivanja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku.....	11
2.5.1.	Klasična metoda određivanja broja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku	12
2.5.2.	Metoda protočne citometrije	13
2.6.	MALDI-TOF tehnika identifikacije aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku.....	14
3.	Konzerviranje sirovog mlijeka	16
3.1.	Bakteriostatski konzervansi	18
3.1.1.	Azidiol	18
3.1.2.	Vodikov peroksid (H ₂ O ₂).....	19

3.1.3. Natrijev azid.....	20
3.2. Bakteriocidni konzervansi	20
3.2.1. Bronopol.....	20
3.2.2. Borna kiselina	21
3.2.3. Živin klorid	21
3.2.4. Kalijev dikromat.....	21
3.2.5. Formaldehid	22
4. Materijali i metode rada	23
4.1. Uzrokovanje mlijeka.....	23
4.2. Određivanje broja bakterija u mlijeku metodom protočne citometrije.....	23
4.3. Klasična metoda određivanja broja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku.....	24
4.4. Postupak uzorkovanja i identifikacija MALDI-TOF tehnikom.....	26
5. Rezultati i rasprava.....	28
5.1. Rezultati protočne citometrije i klasične metode određivanja ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija	28
5.2. Rezultati MALDI-TOF tehnike u identifikaciji aerobno mezofilnih bakterija	37
6. Zaključak.....	51
7. Popis literature.....	52
8. Prilog	55
Životopis.....	71

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Nina Lovrić**, naslova

ODREĐIVANJE BROJA I ZASTUPLJENOSTI VRSTA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA U SIROVOM NEKONZERVIRANOM I KONZERVIRANOM MLIJEKU

Broj aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku jedan je od pokazatelja higijenske kvalitete mlijeka. Njihova identifikacija je za modernu mljekarsku industriju od velike važnosti pa je tako i prioritet što brže i efikasnije dobivanje rezultata. Danas se uz klasične metode njihova određivanja javljaju i novije, brže metode kao što je MALDI-TOF tehnika čija se primjena u identifikaciji aerobno mezofilnih bakterija ispitivala u sklopu ovog rada. U 40 uzoraka sirovog i konzerviranog mlijeka azidiolom određivao se ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija metodom protočne citometrije i klasičnom metodom brojanja kolonija na hranjivoj podlozi prema međunarodnoj normi HRN EN ISO 4833-1:2013. Na temelju rezultata uočen je trend smanjenja broja izraslih kolonija u mlijeku konzerviranom azidiolom, ali je broj uzoraka premali da bi se mogao zaključiti negativni utjecaj azidiola na ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku. Identifikacija bakterija provodila se usporedbom MALDI-TOF spektra masa s referentnim spektrima pohranjenim u biblioteci mikroorganizama i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa. MALDI-TOF tehnikom uspješno je identificirano 298 bakterijskih kolonija u uzorcima sirovog mlijeka i 243 kolonije u uzorcima konzerviranog mlijeka. U uzorcima sirovog mlijeka identificirano je 29 rodova i 45 bakterijskih vrsta, a u konzerviranim uzorcima 25 rodova i 36 bakterijskih vrsta.

Ključne riječi: aerobno mezofilne bakterije, MALDI-TOF, mlijeko

Summary

Of the master's thesis – student **Nina Lovrić**, entitled

DETERMINATION OF THE NUMBER AND PRESENCE OF AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA SPECIES IN RAW UNPRESERVED AND PRESERVED MILK

The number of aerobic mesophilic bacteria in milk is one of the indicators of the hygienic quality of milk. Their identification is of great importance for the modern dairy industry, so it is a priority to get the results as quickly and efficiently as possible. Today, in addition to the classical methods of their determination, newer, faster methods appeared, such as the MALDI-TOF technique whose use in identifying of aerobic mesophilic bacteria was being determined within this thesis. In 40 samples of raw and preserved milk with azidiol, the total number of aerobic mesophilic bacteria was determined by flow cytometry and the classical method of counting colonies on a nutrient medium according to the international standard HRN EN ISO 4833-1: 2013. Based on the results, a decreasing trend of the number of grown colonies in milk preserved with azidiol was observed, but the number of samples was too small to conclude the negative impact of azidiol on the total number of aerobic mesophilic bacteria in milk. Bacterial identification was performed by comparing the MALDI-TOF mass spectra with reference spectra stored in a database and processing using a MALDI Biotyper computer program. The MALDI-TOF technique successfully identified 298 bacterial colonies in raw milk samples and 243 colonies in preserved milk samples. In raw milk samples, 29 strains and 45 bacterial species were identified, and in preserved samples 25 strains and 36 bacterial species.

Keywords: aerobic mesophilic bacteria, MALDI-TOF, milk

1. Uvod

Mlijeko zbog svog bogatog kemijskog sastava i fizikalnih svojstava koji su za većinu mikroorganizama povoljni predstavlja idealan medij za rast i razmnožavanje raznih vrsta bakterija. Osnovni sastojci mlijeka – proteini, laktoza i mliječna mast imaju veliku biološku i hranjivu vrijednost. Uz kemijski sastav, mlijeko svojim fizikalnim svojstvima također pridonosi brzom rastu i razmnožavanju velikog broja bakterijskih vrsta. Fizikalna svojstva mlijeka pogoduju rastu mikroorganizama pa tako se može izdvojiti neutralan pH (6,8) koji je za većinu bakterijskih vrsta optimalan, oksidoredukcijski potencijal od +200 mV te aktivitet vode koji je veći od 0,98. Jedna od bitnijih karakteristika mlijeka je i visoki udio vode (87,5%) što je isto tako važno u metabolizmu bakterijskih stanica (Antunac i Havranek, 2013.). Na osnovu temperaturnog raspona rasta bakterije se dijele na: psihrofilne, psihrotrofne, mezofilne i termofilne. Mezofilne bakterije su one za čiji je rast i razmnožavanje optimalna temperatura između 20-45°C, a aerobne bakterije su one za čiji je rast potreban kisik. Velikom broju mezofilnih bakterija optimalna temperatura rasta je 37°C pa većina patogenih bakterija pripada upravo ovoj skupini (Samaržija, 2018.). Mlijeko je od trenutka mužnje te kroz cijeli proces transporta i prerade izloženo raznim izvorima kontaminacije. Kontaminirana stelja, ruke radnika ili nečista oprema za mužnju najčešći su izvori kontaminacije mlijeka bakterijama koje kasnije tijekom prerade mogu uzrokovati razne tehnološke, a krajnje i zdravstvene probleme kod potrošača. Ukupna kvaliteta sirovog mlijeka određena je kemijskim i fizikalnim svojstvima te higijenskom kvalitetom mlijeka. Kako navode Antunac i Havranek (2013.) higijenska kvaliteta mlijeka određena je ukupnim brojem aerobno mezofilnih bakterija te ukupnim brojem somatskih stanica prisutnih u mlijeka. Sirovo mlijeko zdravih životinja dobiveno pravilnom i higijenski ispravnom mužnjom koje ne sadrži više od 10^{-4} CFU mL⁻¹ bakterija i ima manje od 250.000 somatskih stanica nema negativan utjecaj na ukupnu kvalitetu mlijeka. Ukoliko se provodi nehigijenska mužnja te je mlijeko kasnije izloženo nehigijenskoj opremi i postupcima i u slučaju bakterijske upale broj aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku može biti i veći od 10^7 CFU mL⁻¹. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija i broj somatskih stanica u mlijeku su usvojeni kao najefikasniji higijenski kriteriji na nacionalnoj i internacionalnoj razini. Kako je broj mezofilnih bakterija jedan od pokazatelja higijenske kvalitete mlijeka, njihovo brzo i efikasno određivanje u modernom mljekarstvu je prioritet. U tu svrhu koristi se metoda protočne citometrije kao kvantitativna metoda. Danas sve poznatija, ekonomična metoda koja nalazi primjenu i u brzom identifikaciji mikroorganizama (bakterije, gljivice (kvasci) i plijesni) je matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja - analizator masa s vremenom proleta (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight; MALDI-TOF). MALDI-TOF je znanstveno dokazana instrumentalna metoda za identifikaciju bakterija u hrani. Spomenutom tehnikom na osnovi dobivenih rezultata koristeći se MALDI Biotyper računalnim programom procijenit će se utjecaj konzervansa na broj i zastupljenost aerobno mezofilnih bakterija u sirovom nekonzerviranom i konzerviranom mlijeku.

1.1. Cilj rada

Cilj rada je utvrditi broj aerobno mezofilnih bakterija metodom protočne citometrije i klasičnom metodom brojanja kolonija i određivanja vrsta bakterija MALDI-TOF tehnikom u sirovom nekonzerviranom mlijeku i mlijeku konzerviranom s azidolom.

2. Aerobno mezofilne bakterije u sirovom mlijeku

Mezofilne bakterije skupina su različitih bakterijskih vrsta koje rastu u temperaturnom rasponu od 20 do 45°C. Važna karakteristika ove skupine bakterija je nemogućnost rasta na niskim temperaturama, a najviša temperatura na kojoj mogu rasti je oko 52°C. Na osnovu potreba za kisikom, bakterije se dijele na: aerobne, za čiji je rast potreban kisik, anaerobne koji u prisutnosti kisika odumiru i fakultativne anaerobe koji mogu rasti u prisutnosti kisika ili bez njega (Antunac i Havranek, 2013.). Šira podjela bakterija, prema zahtjevu za kisikom je slijedeća: (1) obligatno aerobne bakterije koje mogu rasti jedino u prisutnosti kisika, (2) obligatno anaerobne koje mogu rasti jedino u odsutnosti kisika, (3) mikroaerofilne koje rastu u mediju gdje koncentracija kisika ne prelazi 20%, (4) fakultativno-aerobne bakterije koje mogu rasti u prisutnosti ili odsutnosti kisika i (5) kisik neovisne bakterije koje mogu rasti u mediju neovisno o prisutnosti kisika (Samaržija, 2018.). Skupina aerobno mezofilnih bakterija su one koje rastu jedino u prisutnosti kisika na temperaturama od 20-45°C. Ova skupina bakterija jedna je od najopćenitijih mikrobioloških pokazatelja kvalitete hrane koja ukazuje na adekvatnost kontrole temperature i postupaka sanitacije tijekom prerade, transporta i skladištenja i otkriva izvore kontaminacije tijekom proizvodnje (Herrera, 2001.). Mnoge aerobno mezofilne vrste bakterija imaju optimalnu temperaturu rasta oko 37°C, što je ujedno i temperatura ljudskog tijela (Samaržija, 2018.). Bakterije koje pripadaju ovoj skupini česti su uzročnici kvarenja mlijeka ili pripadaju skupini patogenih mikroorganizama.

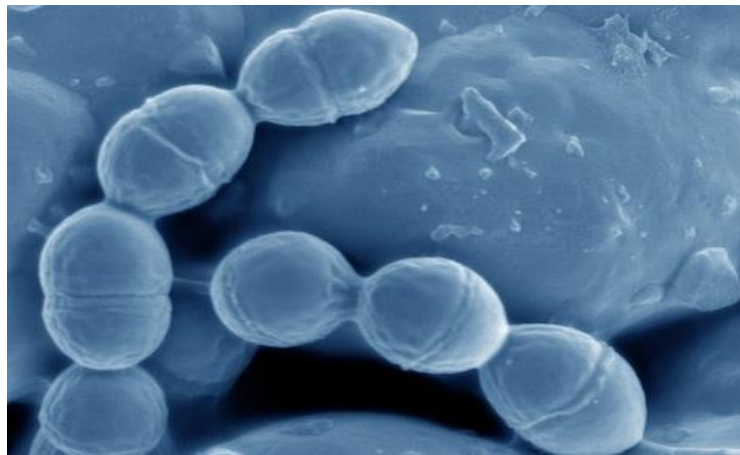
U aerobne mezofilne bakterije koje nalazimo u sirovom mlijeku ubrajaju se rodovi: *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* i ostale (Weisglass, 1989.). Smatraju se univerzalnim pokazateljima higijene. Njihova prisutnost u sirovom mlijeku je neizbježna jer je većina ovih rodova prisutna u vimenu, na rukama mužača, površini opreme i u zraku. Na broj mezofilnih bakterija u mlijeku izravno utječu uvjeti u kojima se mlijeko nalazi nakon mužnje. Sirovo mlijeko s ukupnim brojem aerobno mezofilnih bakterija većim od 5.0 log₁₀ CFU/mL ukazuje na lošu higijenu tijekom mužnje i proizvodnje, dok broj aerobno mezofilnih bakterija manji od 3.0 log₁₀ CFU/mL ukazuje na dobru proizvođačku praksu. Adekvatno hlađenje, dobra proizvođačka praksa i higijena tijekom mužnje učinkovite su mjere kojima se uspješno sprječava naknadna kontaminacija mlijeka ovom skupinom bakterija (Luana i sur., 2019.).

Glavni tipovi aerobno mezofilnih bakterija koje nalazimo u sirovom mlijeku su: mikrokoki, streptokoki, asporogene Gram-pozitivne bakterije iz roda *Mycobacterium* i *Corynebacterium* i sporogene bakterije iz roda *Bacillus* (Antunac i Havranek, 2013.).

2.1. Gram-pozitivne aerobno mezofilne bakterije

2.1.1. Rod *Lactococcus*

Bakterijske vrste roda *Lactococcus* su Gram-pozitivne bakterije koje nalazimo u sirovom mlijeku. Ovaj rod se sastoji od 7 opisanih vrsta: *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raddiolactis*, *L. fujiensis* i *L. chungangensis*. Od navedenih opisanih vrsta za mljekarsku industriju jedino je značajna *Lactococcus lactis*. Laktokoki su obično sfernog oblika (Slika 2.1.1.1.), veličine 1,2-1,5 μm . Javljaju se u parovima ili tvore kratke lance. Nesporogeni su, a prirodno stanište su im zelene biljke. *Lactococcus lactis* fermentira laktozu u mliječnu kiselinu. Upravo iz tog razloga vrlo je važna za mljekarsku industriju zbog široke primjene u preradi mlijeka. U mljekarskim istraživanjima navode se 2 podvrste laktokoka: *L. lactis* subsp. *cremoris* i *L. lactis* subsp. *lactis* (Samaržija, 2015.).



Slika 2.1.1.1 *Lactococcus lactis*

(Izvor: http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html- pristupljeno 15.2.2020.)

2.1.2. Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* sastoji se od 97 vrsta i 17 podvrsta. U sirovom mlijeku često nalazimo *Streptococcus agalactiae*, *S. lactis*, *S. cremoris*. U ovu grupu ubrajaju se i mnoge patogene bakterije. *Streptococcus agalactiae* u sirovo mlijeko dospijeva preko vimena krava koje imaju mastitis i uzrokuje smanjenje kvalitete mlijeka jer se u njemu povećava broj leukocita i alkalitet mlijeka. *Streptococcus faecalis* u sirovo mlijeko dospijeva iz okoline, odnosno fekalnog je porijekla, što znači da u mlijeko dospijeva pri nehigijenskoj mužnji i čuvanjem mlijeka u nečistim kantama. *S. pyogenes* je isto tako patogena jer kod ljudi izaziva gnojne upale, septikemiju i groznicu. Streptokoki su Gram-pozitivne bakterije, okruglog oblika, raspoređuju se u obliku lanca ili niti. S obzirom na potrebu za kisikom pripadaju skupini fakultativno anaerobnih bakterija i nepokretne su. Bakterije ovog roda rastu na temperaturama 10-45°C te time pripadaju skupini mezofilnih bakterija. Mnogi streptokoki koje nalazimo u sirovom mlijeku uzrokuju mastitis (npr. *S. uberis*). Patogeni streptokoki

povezani s mastitisom obično nastane sisni kanal i u mlijeko dopijevaju tijekom mužnje. Prisutnost ovih mikroorganizama narušava kvalitetu mlijeka i kvalitetu mliječnih proizvoda (Luana i sur., 2019.).

2.1.3. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je vrlo raznolik i prema najnovijim procjenama sastoji se od 174 različite vrste i 27 podvrsta. Laktobacilli su Gram-pozitivne, nesporotvorne bakterije štapičastog oblika te tvore mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije. Ovaj rod je unutar skupine bakterija mliječne kiseline najbrojniji i najvažniji za mljekarsku industriju. Bakterije ovog roda su široko rasprostranjene u prirodi i nalazimo ih u hrani, respiratornom, genitalnom i gastrointestinalnom sustavu ljudi i životinja, u biljkama i silaži. Tolerantni su na kiselost te sudjeluju u fermentaciji silaže i povrća. S obzirom na prisutnost ili odsutnost enzima fruktoza-1,6-difosfat aldolaze i fosfoketolaze dijele se u 3 skupine: obligatno homofermentativni, fakultativno heterofermentativni i obligatno heterofermentativni. U sastavu mikrobnih kultura često se koriste *L. delbrueckii* subsp. *lactis* i *L. helveticus* jer mogu rasti na višim temperaturama i vrlo su tolerantne na kiselost. Važno je spomenuti i *L. acidophilus* zbog njenog probiotičkog djelovanja (Samaržija, 2015.). Bakterija *L. acidophilus* pripada skupini bakterija koje imaju funkciju promotora zdravlja i koristi se za proizvodnju slatkog i kiselog acidofilnog mlijeka. Njeno prirodno stanište je intestinalni sustav ljudi i životinja, a mlijeko joj nije optimalan medij. Svojom rastom i razmnožavanjem u mlijeku sintetizira niacin, folnu kiselinu, tiamin, riboflavin, piridoksin i vitamin K, a kod nekih sojeva primjećena je tvorba bakteriocina. Za proizvodnju acidofilnog mlijeka ova bakterija inokulira se u formi monokulture, a zbog njene velike osjetljivosti na fag infekciju i slabe kompetitivnosti mlijeko zahtijeva visoku toplinsku obradu.

2.1.4. Rod *Micrococcus*

Mikrokoki su aerobni, Gram-pozitivni koki veličine od 0,5 do 2,0 μm u promjeru. Javljuju se u parovima, tetradama ili grozdovima, ali ne u lancima. Oni su pozitivni na katalazu i često su oksidaza pozitivni. Formiraju pigmentirane crvene ili žute kolonije i imaju optimalnu temperaturu rasta od 25 do 37°C. Mikrokoki su halotolerantni, odnosno podnose visoku koncentraciju soli te mogu rasti u koncentracijama soli od 5% (Betts, 2006.).

2.1.5. Rod *Enterococcus*

Bakterije roda *Enterococcus* Gram-pozitivne su bakterije kuglastog oblika. Rod *Enterococcus* sadržava više od 40 vrsta, a prirodno stanište im je gastrointestinalni trakt ljudi i životinja. Pojavljuju se u parovima ili kratkim lancima, fakultativno su anaerobni i katalaza negativni organizmi. Pokazuju značajnu otpornost na toplinu, dezinfekcijska sredstva i isušivanje. Prema temperaturi rasta pripadaju skupini mezofilnih bakterija, podnose visoke koncentracije soli (6,5%) te rastu na pH vrijednosti između 4,0-9,6. Rastu u temperaturnom rasponu od 10 do 45°C i preživljavaju temperaturu od 60°C 30 min (Samaržija, 2015.).

2.1.6. Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* sastoji se od 23 vrste i 4 podvrste. Ovaj rod bakterija često se povezuje s biljkama, ali neke, posebno vrste *Mesenteroides* i *Pseudomesenteroides* nalaze se i u mlijeku. Vrste roda *Leuconostoc* imaju sposobnost preživljavanja na površinama, alatima i pasterizatorima dugi period vremena i odupirati se toplinskoj obradi i temperaturama hlađenja. Slabo rastu u mlijeku zbog nedostatka dovoljne proteolitičke aktivnosti i stoga zahtjevaju dodavanje ili stvaranje aminokiselina ili peptida drugih mikroorganizama kako bi se potaknuo njihov rast. Imaju sposobnost stvaranja plina (CO₂) koji je odgovoran za nastajanje oči kod nekih vrsta sireva, metaboliziraju laktozu i citrat te proizvode laktat, acetat, etanol, acetaldehid, diacetil, acetoin i 2,3-butilen glikol koji doprinose organoleptičkim svojstvima fermentiranih mliječnih proizvoda (Luana i sur., 2019.). Bakterije ovog roda iz glukoze stvaraju D(-) laktat, mezofilne su i Gram-pozitivne. Također su nepokretne, fakultativno anaerobne i vankomicin rezistentne. Neki sojevi imaju sposobnost tvorbe egzopolisharida. Što se tiče izgleda, mogu se pojavljivati u obliku bacila ili tvoriti nakupine. Energiju potrebnu za rast i razmnožavanje dobivaju fermentacijom šećera te pritom uz mliječnu kiselinu stvaraju CO₂, etanol i acetat. Za mljekarsku industriju su značajne *L. lactis* i 2 podvrste *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* i *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* zbog sposobnosti fermentacije citrata.

2.1.7. Rod *Pediococcus*

Bakterije ovog roda su homofermentativne i gotovo sve vrste iz glukoze stvaraju DL izomer mliječne kiseline. Dosta slabo rastu u sirovom mlijeku jer im laktoza ne predstavlja dobar izvor ugljika. Nikada ne tvore lance već se pojavljuju u obliku parova ili tetradara. Okruglog su oblike te su iznimno otporne na pH, temperaturu i soli u mediju. Bakterije roda *Pediococcus* su katalaza negativne i s obzirom na potrebe za kisikom pripadaju skupini mikroaerofilnih bakterija (Samaržija, 2015.).

2.1.8. Rod *Bifidobacterium*

Rod *Bifidobacterium* ima više od 40 opisanih vrsta od kojih su 10 humanog podrijetla, 17 animalnog podrijetla, 2 vrste su izolirane iz otpadnih voda, a 1 vrsta iz fermentiranog mlijeka. Sve vrste su Gram-pozitivne, nesporotvorne i ne stvaraju plinove. Štapičastog su ili "Y" oblika, razgrađuju laktozu fruktoza-6-fosfatnim putem čime nastaju 3 molekule octene kiseline kao glavni produkt i 2 molekule mliječne kiseline. Neke vrste ovog roda pokazuju malu toleranciju na kisik iako su sve ostale striktni anaerobi. Optimalan temperaturni raspon za rast im je 36-46°C i slabije podnose niži pH i mogu rasti jedino u mediju pH \geq 4,6. Mlijeko kao medij im nije optimalna sredina za rast i razmnožavanje. Prema svom izvornom staništu do sada opisane vrste se mogu podijeliti u 6 različitih niša: humani i animalni intestinalni sustav, usna šupljina, hrana, probavni sustav insekata i otpadne vode. U mljekarskoj industriji značajni su sojevi vrsta *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* i *B. longum*. Kako bi navedeni sojevi preživjeli u proizvodu nužna je prisutnost bakterija jogurtne kulture ili drugih laktobacila (Samaržija, 2015.).

2.2. Gram-negativne aerobno mezofilne bakterije

2.2.1. Rod *Serratia*

Rod *Serratia* čine Gram-negativne štapičaste bakterije. Većina je pokretna, zahvaljujući prisustvu flagela. Neki sojevi posjeduju kapsulu. Prisustvo kapsule je karakteristika koja bitno utječe na virulenciju ovih bakterija. Do danas je opisano oko 20 vrsta bakterija ovog roda, a izdvajaju se *Serratia marcescens* i *Serratia liquefaciens* koje su sveprisutne u okolišu i mogu izazvati infekcije kod ljudi i mnogih životinjskih vrsta uključujući i mastitis kod krava. Ovaj rod bakterija izoliran je iz vode, tla, iz raznih vrsta biljaka i insekata, nalazimo ih i u okolišu staje, posebice na ležištu i na muznoj opremi te u fecesu krava. Imaju sposobnost tvorbe biofilma na teško dostupnim površinama mljekarske opreme. Isto tako imaju sposobnost tvorbe termorezistentnih enzima i smatraju se čestim uzročnicima kvarenja mlijeka u fazi proizvodnje i prerade. Iako ovaj rod često uzrokuje probleme u mljekarskoj industriji, podvrsta *S. liquefaciens* može biti bitna za zrenje sireva od sirovog mlijeka zbog svoje preteolitičke aktivnosti (Friman i sur., 2019.). Vrsta *S. marcescens* uzrokuje bolesti kod ljudi. Ova vrsta je aerobna Gram-negativna bakterija koja uzrokuje dječju upalu pluća, posebno kod djece s oslabljenim imunskim sustavom. Prema Friman i sur. (2019.) povezuje se i s još nekim bolestima kao što su infekcija mokraćnog trakta ili respiratornog sustava pri čemu često uzrokuje i apscese na plućima. Može biti uzročnik meningitisa, sepse i endokarditisa. Gram-negativne bakterije ne izlučuju toksine kao što to čine Gram-pozitivne bakterije. Njihovi endotoksini dio su lipopolisaharida bakterije. Većina se oslobađa tek tijekom lize stanica, ali neki se mogu osloboditi tijekom stanične diobe. Kao i kod infekcija uzrokovanih stafilokokom, infekcije uzrokovane ovim rodnom bakterija ne mogu se izliječiti antibioticima.

2.2.2. Rod *Acinetobacter*

Rod *Acinetobacter* čine Gram-negativni kokobacili koji su striktni aerobi. Katalaza su pozitivni i oksidaza negativni. Vrlo dobro rastu na temperaturama između 20-30°C što ih čini mezofilima. Rastu na medijima s prisustvom acetata, laktata ili piruvata što koriste kao izvor energije za rast i razmnožavanje. Ovaj rod čine štapičaste bakterije veličine 1-2,5 µm. Obično formiraju parove ili duge lance različitih duljina. Boja kolonija je obično bez pigmenta, bijela ili žućkasto bijela veličine 1-2 mm. Rod *Acinetobacter* je heterogena skupina bakterija koje žive kao saprofiti i mogu se naći gotovo svugdje u okolišu. Određene vrste roda povezuju se s raznim staništima kao što je tlo, voda, kanalizacija, čovjek, hrana i životinje. Ovaj rod smatra se normalnom florom ljudske kože i ljudskih respiratornih sekreta. Bakterije ovog roda često se povezuju s raznim bolestima kao što su pneumonija i septikemija. U studiji koju su proveli Seifert i sur. (1997.) *Acinetobacter* spp. bile su izolirane s različitih mjesta na tijelu zdravih pojedinaca, uključujući čelo, nos, uši, grlo, ruke, ženski spolni sustav, nastanjujući vlažna područja, poput prepona i područja između nožnih prstiju. Vrsta *A. baumannii* otkrivena je u različitim prehrambenim proizvodima, kao što su svježije voće i povrće te sirovo mlijeko i mliječni proizvodi te se povezuje s raznim urinarnim i respiratornim infekcijama i meningitisom (Saad, 2018.).

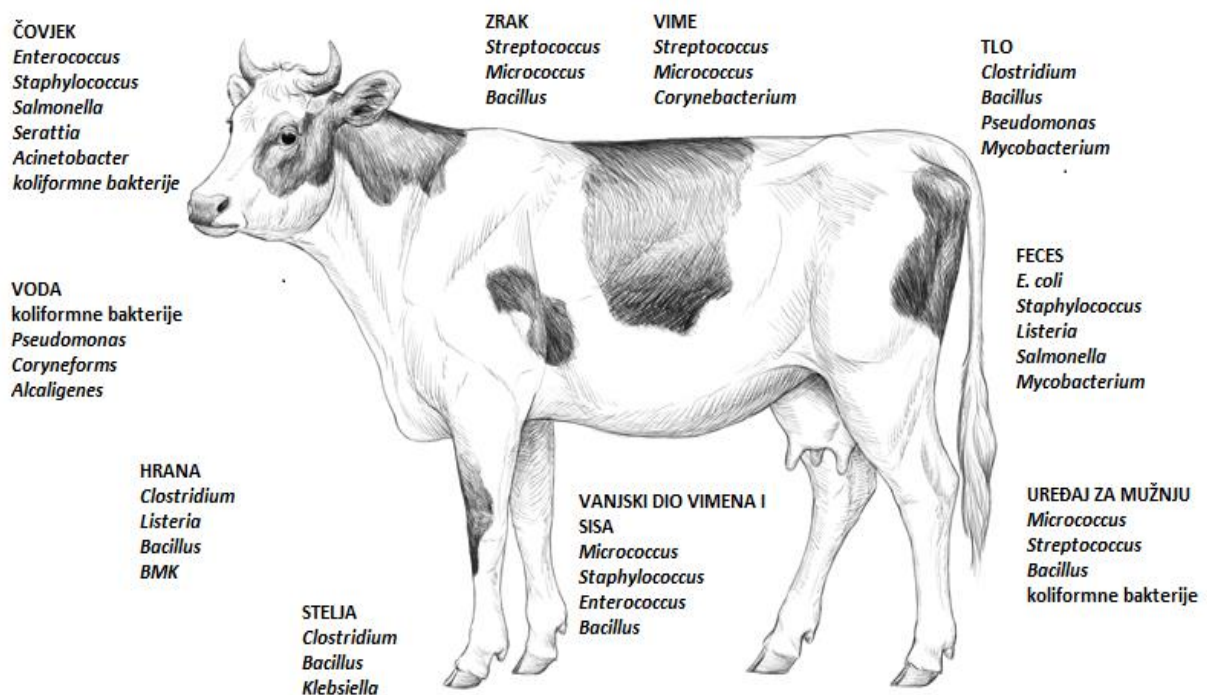
2.3. Prisutnost aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Ukoliko se provodi higijenski ispravna mužnja sirovo mlijeko sadrži početnu mikrobnu populaciju koja se uglavnom sastoji od rodova *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactococcus* i *Corynebacterium* spp. i njihova količina ne prelazi 5.000 CFU/mL (Samaržija, 2018.). Ovisno o uvjetima nakon mužnje određena je i vrsta mikrobnog kvarenja. Čimbenik koji najviše utječe na prisutnost dominantne mikrobne populacije je temperatura. Ukoliko se sirovo mlijeko 2 sata nakon mužnje ne preradi i ne ohladi ispod sobne temperature, uzrok njegovog mikrobnog kvarenja biti će mezofilne Gram-pozitivne bakterije mliječne kiseline. Bakterije mliječne kiseline fermentacijom laktoze stvaraju mliječnu kiselinu koja smanjuje pH mlijeka čime se smanjuju preradbena svojstva sirovog mlijeka. Smanjenje pH mlijeka uzrokuje koagulaciju proteina i prekomjernu sinerezu. Osim mliječne kiseline, heterofermentativne vrste bakterija mliječne kiseline stvaraju i CO₂. Posljedično tome dolazi do senzornih pogrešaka koje se karakteriziraju kao kiseli, sirasti, mišji, sladni, zasitni i teški masni miris i okus. Neke vrste bakterija mliječne kiseline kao što su *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sposobne su tvoriti egzopolisaharide koji uzrokuju sluzavu konzistenciju mlijeka (Samaržija, 2018.). Vrste roda *Enterococcus* mogu kontaminirati sirovo mlijeko i mliječne proizvode iz zagađene vode, fecesa, dlake životinja, opreme, insekata i s ruku radnika. Osim toga, ti organizmi mogu rasti na opremi zbog svoje sposobnosti preživljavanja nepovoljnih uvjeta. S obzirom da su homofermentativni, njihova povećana količina u mlijeku također uzrokuje povećanje kiselosti sirovog mlijeka. Prisutnost rodova

Serratia i *Acinetobacter* u mlijeku predstavlja zdravstvenu opasnost s obzirom da su često povezane s raznim bolestima kao što su upala pluća, infekcije mokraćnog sustava, meningitis, septikemija i ostale. Količina aerobno mezofilnih bakterija veća od propisane ukazuje na neadekvatnu higijenu tijekom mužnje i prerade, predstavlja potencijalnu zdravstvenu opasnost i negativno utječe na kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda. Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 27/2017) maksimalna dopuštena količina aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku je 100.000 CFU/mL.

2.4. Izvori kontaminacije

Mlijeko i mliječni proizvodi zbog svojeg kemijskog sastava, te velike količine vode i povoljnih fizikalnih svojstava često su podložni fizikalno kemijskim promjenama i rastu raznih mikroorganizama (bakterije, kvasci i plijesni). Razni su načini i izvori kontaminacije sirovog mlijeka počevši od same životinje, vimena, okoliša, opreme, radnika itd. (Slika 2.4.1.). Za kontrolu kontaminacije mlijeka u cijelom proizvodnom lancu važno je provoditi dobru higijensku praksu i poznavati potencijalne izvore kontaminacije kako bi se osigurala njegova sigurnost i kvaliteta. Velike su mogućnosti kontaminacije sirovog mlijeka jer je dug put od mužnje do prerade.



Slika 2.4.1. Izvori kontaminacije sirovog mlijeka
(po uzoru na Antunac, 2013.)

Sirovo mlijeko se može kontaminirati u bilo kojoj fazi proizvodnog procesa uključujući životinju, mužnju, sabirne postaje, transport, mljekaru kao i tijekom procesa prerade. Potencijalni izvori kontaminacije su sve površine koje dolaze u dodir sa sirovim mlijekom tijekom mužnje, hlađenja, pohrane i transporta. Primjenom postupka održavanja, pranja, čišćenja i dezinfekcije takvih površina osigurava se eliminacija izvora kontaminacije. Kako navodi Tratnik (1998.) sirovo mlijeko zdrave krave, osim primarne mikroflore vimena, može biti izvor mikroorganizama koji potječu iz okoline s kojom sirovo mlijeko dolazi u dodir tijekom i nakon mužnje. Ti naknadno dospjeli organizmi čine "sekundarnu" mikrofloru koja onečišćuje sirovo mlijeko. Najčešće su to bakterije, u manjem postotku kvasci, a najrjeđe plijesni. Kao glavna 3 izvora kontaminacije smatraju se vanjski dijelovi vimena i sisa, pribor i oprema kao izravni izvori kontaminacije te infektivno vime kao neizravan izvor kontaminacije. Zdravo vime nakon mužnje već sadrži određeni broj mikroorganizama koji potječu iz unutrašnjosti sisnog kanala te je njihov broj otprilike 5.000 CFU/mL (Samaržija, 2015.). Bitno je spomenuti važno svojstvo mlijeka koje nazivamo baktericidnost mlijeka koje 2-4 h nakon mužnje ne dozvoljava nikakav mikrobni rast. Ona populacija mikroorganizama koja kontaminira sirovo mlijeko odmah nakon mužnje naziva se početna mikrobna populacija.

2.4.1. Životinja i staja

Muzne krave su vrlo čest izvor mikrobne kontaminacije sirovog mlijeka. Kontaminacija sirovog mlijeka započinje trenutkom mužnje, a ukoliko je životinja bolesna, mlijeko se kontaminira već u vimenu. Patogeni mikroorganizmi inficiraju vime i šire kontaminaciju sirovim mlijekom, na taj način se kontaminira oprema za mužnju, ruke radnika, krpe kojima se vime briše i druga oprema te okolina bolesne krave. Najčešći uzročnici mastitisa koje krava na navedeni način može prenijeti u sirovo mlijeko su *Staphylococcus aureus* i koliformne bakterije. Ostali uzročnici mastitisa koji se mogu izolirati iz mlijeka su *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus agalactiae* i *Streptococcus uberis* (Luana i sur., 2019.). Kako navodi Tratnik (1998.) hrana i stelja mogu biti izvor raznih mikroorganizama, ali najveću štetu čine termostabilne bakterije roda *Bacillus* i *Clostridium*. Feces stoke je najveći izvor enteropatogenih bakterija roda *Salmonella* i *Campylobacter* koje mogu onečistiti stelju, vime, kožu i sve što dolazi u doticaj sa sirovim mlijekom. Stočna hrana često je inficirana enteropatogenom bakterijom *L. monocytogenes*, koja ako ikad dospije u sirovo mlijeko, predstavlja veliku opasnost za mljekarsku industriju jer može rasti u hladno pohranjenom mlijeku pa i pri temperaturi ledišta vode.

2.4.2. Muzna oprema za životinju

Oprema za mužnju često može biti izvor kontaminacije Gram-negativnim psihrotrofnim bakterijama kvarenja. Sam čovjek može biti izvor raznih kontaminanata, a najveća opasnost

koja potječe od ljudskog fecesa ili raznih kliničkih infekcija su vrste rodova *Salmonella* i *Campylobacter* te *Protozoa* patogeni *Cryptosporidium*. Voda je vrlo česti izvor bakterijskih vrsta iz roda *Aeromonas* i *Campylobacter*, ali i izvor bakterijskih vrsta iz roda *Salmonella*. Veliku pažnju potrebno je pridavati higijeni opreme za mužnju koja bi se trebala dezinficirati prije svake upotrebe. *Listeria monocytogenes* ukoliko kontaminira tankove za pohranu sirovog mlijeka, predstavlja veliki mikrobiološki problem jer je sposobna stvarati biofilm te je vrlo otporna na dezinficijense (Luana i sur., 2019.).

2.4.3. Pohrana i transport

Prije nego se sirovo mlijeko transportira u mljekaru ukoliko je držano u kantama i cisternama bez hlađenja, mlijeko može sadržavati brojne vrste bakterija iz rodova *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* i brojne vrste koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*. Glavna metode kontrole kontaminacije sirovog mlijeka je adekvatno i brzo hlađenje nakon mužnje i higijena tankova za prihvatanje sirovog mlijeka do njegovog transporta. Transport mlijeka se ne smije odgađati te mlijeko tijekom transporta treba konstantno hladiti. Nakon prijema mlijeka u mljekaru, mlijeko je potrebno odmah preraditi. Ukoliko to nije moguće, mlijeko je potrebno pohraniti na temperaturi oko 4°C. Svako mlijeko dopremljeno u mljekaru potrebno je termički obraditi kako bi se uništili svi patogeni mikroorganizmi potencijalno prisutni u njemu (Antunac i Havranek, 2013.).

2.5. Metode određivanja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Ukupna kvaliteta sirovog mlijeka određena je kemijskim sastavom i higijenskom kvalitetom mlijeka. Ukupan broj bakterija u sirovom mlijeku i broj somatskih stanica su parametri koji određuju higijensku kvalitetu mlijeka. Kontrola higijenske kvalitete sirovog mlijeka je nužna za osiguranje zdravstvene ispravnosti mlijeka i mliječnih proizvoda. Prema Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN 27/2017.), mlijeko svakog proizvođača se procjenjuje na temelju higijenske kvalitete sirovog mlijeka. Na osnovu higijenske kvalitete sirovog mlijeka ono se svrstava u 4 razreda: ekstra(E), prvi (I), drugi (II) i treći (III) razred. Za svrstavanje u navedene razrede uzima se za broj somatskih stanica geometrijska sredina rezultata analiza u posljednja 3 mjeseca, a za ukupan broj bakterija uzima se geometrijska sredina u posljednja 2 mjeseca. Postoje direktne i indirektne metode određivanja ukupnog broja bakterija. U direktne metode pripadaju brojanje bakterija na čvrstom hranilištu i mikroskopske metode. Druga podjela ovih metoda je na kvantitativne i kvalitativne. Kvalitativnim metodama određuje se samo prisutnost određenih bakterijskih vrsta, a kvantitativnim metodama određuje se broj prisutnih bakterija (Samaržija i sur., 2004.).

2.5.1. Klasična metoda određivanja broja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Određivanje ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku provodi se brojanjem bakterijskih kolonija izraslih na hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama nakon inkubacije od 72h pri 30°C prema međunarodnoj normi HRN EN ISO 4833-1:2013, metodi za određivanje broja kolonija odnosno mikroorganizama tehnikom zalijevanja podloge. Dogovoreno je da svaka kolonija predstavlja jednu bakterijsku stanicu kako bi se olakšalo uspoređivanje rezultata. Klasična metoda pripada kvantitativnoj metodi kojom se određuje broj prisutnih bakterija u analiziranom uzorku. Nedostatci ove metode su dugo vrijeme izvođenja i neprikladnost prilikom analize velikog broja uzoraka. Ovom metodom određuje se broj prisutnih bakterija, ali ne i podatak koji su rodovi bakterija prisutni u analiziranom uzorku.

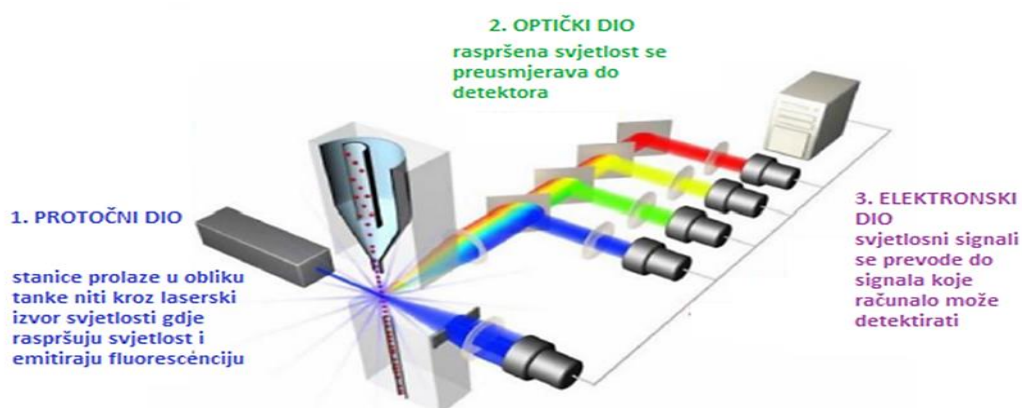
Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija u uzorku izračunava se na osnovi broja izraslih kolonija prema slijedećoj formuli (Samaržija i sur., 2004.):

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0.1 \times n2) \times d}$$

gdje su: $\sum C$ - suma svih kolonija na svim izbrojanim Petrijevim zdjelicama
n1 – broj izbrojanih zdjelica u prvom razrjeđenju
n2 – broj izbrojanih zdjelica u drugom razrjeđenju
d – prvo izbrojivo razrjeđenje

2.5.2. Metoda protočne citometrije

Protočna citometrija je suvremena metoda koja istovremeno mjeri, a zatim analizira mnoštvo fizikalnih karakteristika pojedinih čestica, obično stanica, kako one prolaze kroz cijev koju osvjetljava laserski izvor svjetlosti. Izmjerena svojstva uključuju veličinu stanice, relativnu granuliranost ili unutarnju složenost i relativni intenzitet fluorescencije. Te se karakteristike određuju korištenjem sustava koji bilježi kako stanica ili čestica raspršuju upadnu lasersku svjetlost i emitiraju fluorescenciju. Ova metoda u primjeni je u bakteriologiji od 1960. godine, a za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku prva generacija koristi se od 1980., a treća generacija od 2000. godine. Instrument za protočnu citometriju sastoji se od 3 glavna dijela: protočnog, optičkog i elektronskog dijela (Slika 2.5.2.1.). Protočni dio transportira čestice do lasera u obliku tanke niti, optički dio se sastoji od lasera koji osvjetljava čestice i optičkih filtera koji preusmjeravaju svjetlosne signale do njihovih detektora. Elektronski dio prevodi detektirane svjetlosne signale do elektroničkih signala koje računalo može procesirati. Za analizu su pogodne stanice veličine 0,2 - 150 μm . Metoda je u potpunosti automatizirana pa je tako u jednom satu moguće analizirati do 150 uzoraka (Samaržija i sur., 2004.) dok se klasičnom metodom mali broj uzoraka analizira više dana zbog potrebe inkubacije uzoraka (72 sata). Instrument filtrira uzorak mlijeka, miješa ga sa specifičnim reagensom koji iz uzorka izdvaja sve komponente osim bakterijskih stanica. Uzorak zatim protječe u obliku tanke niti kroz cijev koju osvjetljava laser. Fluorescencijski obojena DNK bakterijske stanice stvara fluorescentne svjetlosne impulse koje očitava detektor što predstavlja pojedinačnu bakterijsku stanicu (*eng.* IBC-Individual Bacterial Count). Ukupan broj bakterija u mlijeku izražava se kao broj kolonija utvrđen klasičnom metodom (*eng.* CFU - Colony Forming Units) pomoću linearne regresije, rezultati ukupnog broja bakterija određenih metodom protočne citometrije preračunavaju u jedinicu klasične metode, pojedinačnu bakterijsku stanicu što se naziva konverzijom rezultata (Samaržija i sur., 2004.).

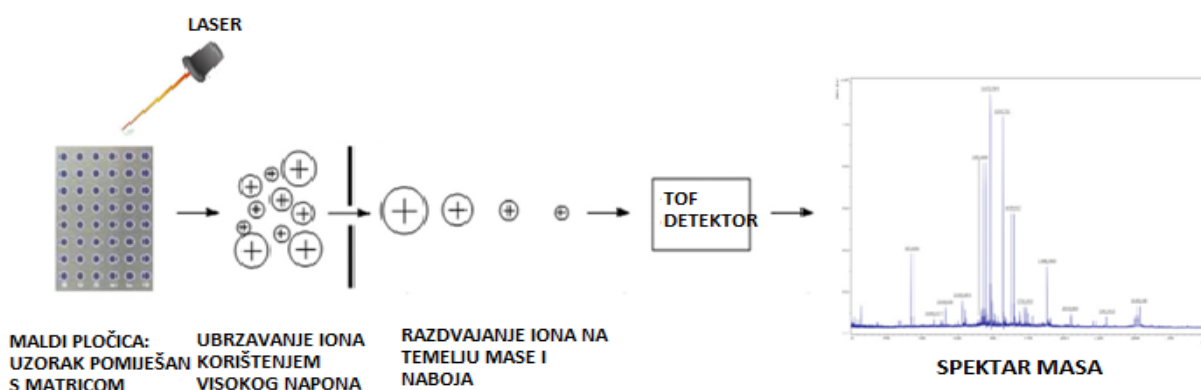


Slika 2.5.2.1. Princip rada instrumenta za protočnu citometriju s glavnim dijelovima (Izvor: <https://www.iitk.ac.in/che/pdf/resources/Flow-Cytometry-reading-material.pdf> - pristupljeno 20.3.2020.)

2.6. MALDI-TOF tehnika identifikacije aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Spektrometrija masa je analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju nepoznatih spojeva, za određivanje strukturnih i kemijskih svojstava molekula te za kvantitativna mjerenja poznatih spojeva. Temelj spektrometrije masa je razdvajanje iona uzorka koji se analiziraju prema odnosu mase i naboja (m/z) u vakuumu. Osnovni dijelovi spektrometra masa su izvor iona, analizator i detektor. Do danas su razvijena različita instrumentalna rješenja koja se temelje na kombiniranju različitih sustava ionizacije (elektronskim udarom (EI), brzim atomima/ionima (FAB/FIB), elektroraspršenjem (ESI), kemijska (CI), desorpcijom laserskim zračenjem (LDI), matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja (MALDI)) s različitim sustavima analizatora masa (magnetski sektorski, kvadrupolni, ionska stupica (IT), ionsko-ciklotronskom rezonancijom (ICR), s vremenom proleta (TOF)).

MALDI-TOF tehnika razvijena je 1987. godine što je omogućilo analizu termički nestabilnih biomolekula velikih masa (Karas i sur., 1987.).



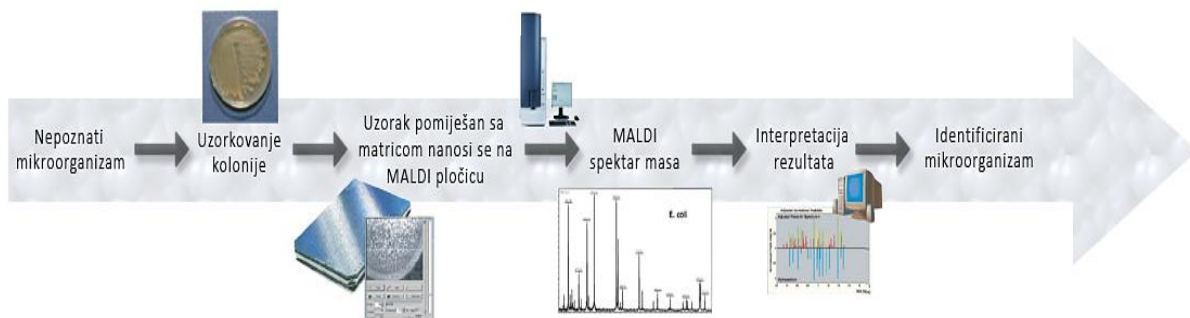
Slika 2.6.1. Dijagram tijeka rada MALDI TOF instrumenta

(Izvor: Singhal i sur. (2015.))

Uzorak za analizu priprema se miješanjem analita s otopinom organskog spoja koji apsorbira energiju laserskog zračenja, a naziva se matrica. Matrice koje se najčešće koriste su: α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina, 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, sinapinska kiselina i nikotinska kiselina. Otopina u kojoj se matrica otapa sastoji se od vode, organskog otapala (acetonitril, metanol ili etanol) i jake kiseline poput trifluorooctene kiseline. Uzorak unutar matrice ionizira se pomoću laserskog snopa što uzrokuje brzo zagrijavanje uzorka i prelazak u plinovitu fazu (Slika 2.6.1.). Desorpcija i ionizacija laserskim snopom uglavnom generira

pojedinačno protonirane ione iz analita u uzorku. Protonirani ioni potom se ubrzavaju u električnom polju s fiksnim potencijalom, pri čemu se oni međusobno odvajaju na osnovi njihovog omjera mase i naboja. Detektor bilježi broj iona pri svakoj vrijednosti m/z što rezultira stvaranjem spektra masa (Singhal i sur., 2015.).

Ova tehnika uspješno se koristi u istraživanjima za određivanje mase proteina i peptida te identifikaciju dosad nepoznatih proteina. Identifikaciju i klasifikaciju mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice (kvasci) i plijesni danas je moguće provesti brzo i jednostavno uz MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) sistem koji se sastoji od MALDI-TOF spektrometra masa, MALDI Biotyper računalnog programa za rad i analizu, biblioteke mikroorganizama i jednostavne metode za pripremu uzorka. Postupak identifikacije MALDI-TOF tehnikom počinje nanošenjem kolonije mikroorganizma kojeg želimo identificirati na MALDI pločicu, slijedi dodavanje matrice i unos u instrument gdje snimanje rezultira karakterističnim spektrima masa proteina za svaki mikroorganizam (*eng.* „fingerprint“). Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama provodi se usporedbom spektra uzorka s referentnim spektrom iz biblioteke mikroorganizama i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa (Slika 2.6.2.). Računalni program uspoređuje pikove (*eng.* „peak“) neidentificiranog uzorka s referentnim spektrom. Ovisno o podudarnosti dvaju spektara, rezultati su prikazani ocjenama 2.300 do 3.000 što ukazuje na pouzdanu i vrlo vjerojatnu identifikaciju na razini vrste, 2.000 do 2.299 što ukazuje na sigurnu identifikaciju roda s mogućom identifikacijom vrste, 1.700 do 1.999 ukazuje na vjerojatnu identifikaciju na razini roda i rezultat manji od 1.700 ukazuje na nepouzdanu identifikaciju.



Slika 2.6.2. Postupak identifikacije MALDI-TOF tehnikom
(Izvor: Kazazić S., 2020.)

Posljednjih godina ova tehnika je implementirana u laboratorijima i koristi kao inovativna metoda za identifikaciju bakterija, kvasaca i plijesni u medicinskoj dijagnostici, kontroli vode i hrane te istraživanju okoliša. Razne genetske metode za identifikaciju mikroorganizama su pouzdan alat u epidemiološkim studijama i znanstvenom radu, ali ih je teško primijeniti u rutinskom radu u laboratorijima koji rade s hranom.

3. Konzerviranje sirovog mlijeka

Prema Upadhyay i sur. (2014.) konzervans za mlijeko može se definirati kao svaki kemijski spoj koji, kada se koristi u mlijeku, sprječava promjene uzrokovane kontaminacijom, rastom i razmnožavanjem mikroorganizama. Idealni uvjeti pohrane mlijeka su postupci hlađenja na što nižim temperaturama. Hlađenje minimizira rast bakterija i sprječava sve kemijske i fizikalne promjene koje mogu uslijediti zbog kontaminacije mlijeka raznim mikroorganizmima. Posljedice hlađenja mlijeka na vrlo niskim temperaturama su poremećaj strukture masne globule u mlijeku što kasnije otežava provođenje analiza sirovog mlijeka. Idealan konzervans osigurava zaštitu od mehaničkog oštećenja masnih globula. Danas se različiti konzervansi koriste u laboratorijima za kontrolu kvalitete mlijeka te je njihova primjena imperativ u modernoj analitici mlijeka. Konzervansi se koriste kako bi se spriječila kontaminacija sirovog mlijeka na putu od farme do laboratorija i njegovo prebrzo kvarenje čime se mogu ugroziti rezultati analiza. Konzervansi svojim bakteriostatskim i baktericidnim djelovanjem osiguravaju da kvaliteta mlijeka ostane nepromijenjena usred mogućih previsokih temperatura transporta i pohrane ili neadekvatnog rukovanja s uzorcima. S obzirom da uzorci mlijeka vrlo često dolaze s ruralnih područja gdje higijena okoline nije vrhunska česte su naknadne kontaminacije uzoraka mlijeka, posebice u ljetnim mjesecima kada više temperature pogoduju rastu i razmnožavanju raznih vrsta bakterija. Upravo zbog činjenice da je mlijeko medij pogodan za rast i razmnožavanje bakterija, kvasaca i plijesni, u laboratorijima za analizu mlijeka uvedeno je korištenje konzervansa kojima se osigurava da sastav mlijeka ostane nepromijenjen i stalan od farme do laboratorija. Kako navode Antunac i sur (2010.) danas na tržištu nalazimo razne vrste konzervansa među kojima se najčešće koriste Azidiol i Bronopol, dok se K-dikromat rjeđe koristi.

U prošlosti su najčešće korišteni konzervansi hidrogen peroksid (vodikov peroksid), formaldehid, kalijev dikromat, živin klorid, borna kiselina ili njihove kombinacije. U posljednje vrijeme najčešće se koriste bronopol i azidiol. Uzorci sirovog mlijeka ne smiju se konzervirati za određivanje ukupnog broja mikroorganizama metodom brojanja na hranjivoj podlozi, pri određivanju točke ledišta krioscopskom metodom te prilikom određivanja inhibitornih tvari u mlijeku (antibiotika). U navedenim slučajevima uzorci se moraju ohladiti na +4°C i dovesti do laboratorija u roku 24h od mužnje. Uzorci se konzerviraju u slučajevima određivanja suhe tvari, mliječne masti, proteina i laktoze, prilikom određivanja broja somatskih stanica te kod određivanja ukupnog broja mikroorganizama metodom protočne citometrije (Antunac i sur., 2010.). Antimikrobno djelovanje konzervansa ostvaruje se slijedećim procesima: inhibicija sinteze proteina, inhibicija enzimske aktivnosti i oštećenje stanične membrane.

Razlikuju se razne poželjne karakteristike konzervansa koji se koriste za konzerviranje mlijeka. Primarna karakteristika koju konzervans mora imati je da se njegovim korištenjem ne mijenja sastav mlijeka, odnosno da se spriječi bilo kakav utjecaj konzervansa na krajnji rezultat analize. Samaržija (2004.) navodi kako se korištenjem azidiola ne mijenja kemijski

sastav, ni mikrobna populacija u uzorcima mlijeka, ali da se broj bakterija može smanjiti ako se mlijeko analizira drugog ili trećeg dana od uzimanja uzorka. Prema navodima Upadhyay i sur. (2014.) ostale poželjne karakteristike su slijedeće:

- (1) Širok spektar djelovanja - konzervans mora imati širok spektar djelovanja kako bi djelovao na što je više moguće mikroorganizama koji se potencijalno mogu naći u mlijeku.
- (2) Učinkovitost pri minimalnim koncentracijama - konzervans bi trebao biti učinkovit u niskim koncentracijama u mlijeku kako bi se minimiziralo razrjeđivanje uzoraka, smanjili troškovi i ubrzali postupci rukovanja.
- (3) Visoka topljivost u vodi - kako mlijeko ima 87% vode u svom sastavu, konzervans mora imati sposobnost djelovanja protiv mikroorganizama u fazi vodene otopine; visoka topljivost u vodi također osigurava lakše miješanje s mlijekom bez pretjeranog mehaničkog rada.
- (4) Stabilnost – konzervans mora biti stabilan u skoro svim uvjetima skladištenja i transporta.
- (5) Prisutnost boje - za razliku od konzervansa koji se koriste u kozmetičkoj industriji, poželjna karakteristika mliječnog konzervansa je da oboji uzorak u kojem se koristi zbog identifikacije i sigurnosti.
- (6) Kompatibilnost - dobar konzervans mlijeka trebao bi biti podjednako učinkovit u skupnim uzorcima mlijeka kao i u svježim uzorcima pojedinih krava ili drugih sisavaca te biti prikladan za uzorke mlijeka s visokim udjelom mliječne masti i za mlijeko bez mliječne masti.
- (7) Rok trajanja - konzervans mlijeka trebao bi biti učinkovit u mlijeku u razdoblju od 6 mjeseci do 1 godine.
- (8) Toksičnost i zbrinjavanje - konzervans ne bi trebao uzrokovati alergije i ne biti toksičan prema ljudima koji ga koriste odnosno rukovode s njime. Unatoč potrebnom biocidnom svojstvu, nakon zbrinjavanja ne bi trebao postati toksičan za okoliš.
- (9) Ekonomičnost - trošak konzervansa treba biti minimalan, a konzervans bi trebao biti lako dostupan.
- (10) Sposobnost proizvodnje u obliku tableta - lakše je rukovanje s konzervansima koji se nalaze u krutom obliku te je veća preciznost prilikom njihovog doziranja.

Prema mehanizmu djelovanja konzervansa dijele se na bakteriostatske (inhibitorno djelovanje na bakterije) i baktericidne konzervanse (antibakterijsko djelovanje).

Kako navode Zajác i sur. (2016.) točna analiza sastojaka mlijeka vrlo je važna za mljekarsku industriju. Najveći ekonomski problem uzrokovan korištenjem konzervansa događa se kada mlijeko korišteno za umjeravanje i referentnu analizu ne sadrži isti konzervans ili kada je mlijeko za umjeravanje konzervirano, a mlijeko za ispitivanje nije. Ovi učinci mogu rezultirati pogreškama u plaćanju analiza za velike pogone mljekarske industrije

u rasponu od nekoliko stotina tisuća do preko milijun dolara godišnje. Konzervansi mogu utjecati na reakciju infracrvenog instrumenta na uzorke, kao i na rezultate referentne analize. Učinci mogu biti različiti za različite komponente i konfiguracije instrumenta. Zbog toga je važno da se ovi specifični učinci ispituju prije provođenja bilo kakvog konzerviranja uzoraka. Ukoliko hlađenje uzorka nije moguće, moraju se upotrijebiti kemijski konzervansi. Minimalni zahtjev za kemijski konzervans mlijeka je da mora osigurati točno provođenje analiza. Uzorak mlijeka mora zadržati svoj izvorni sastav od vremena mužnje do vremena analize, a konzervans ne smije utjecati na rezultat ispitivanja. U studiji koju su proveli Zajac i sur. (2016.) otkriven je značajan utjecaj koncentracije konzervansa na određivanje sastojaka sirovog kravljeg mlijeka metodom infracrvene spektrometrije. Konačne koncentracije kalijevog dikromata, azidiola, bronopola i microtabsa II u uzorku sirovog kravljeg mlijeka trebale bi biti oko 0,01–0,02%. Niža koncentracija od 0,005%, nije dovoljna za učinkovito konzerviranje mlijeka. Uporaba većih koncentracija, 0,1%, 0,5% i 1%, dovela je do značajnih odstupanja i mogla bi značajno utjecati na rezultate analiza. Općenito, smanjenje udjela masti i povećanje proteina, laktoze i suhe tvari bez masti utvrđeno je kada su konzervansi korišteni u koncentraciji od 0,01%. Navedeno istraživanje ukazalo je na pravilno korištenje i doziranje konzervansa prije provođenja analiza i umjeravanja instrumenata ukoliko ne bi došlo do njihovog negativnog utjecaja na rezultate analiza.

3.1. Bakteriostatski konzervansi

Bakteriostatski konzervansi su oni koji svojim djelovanjem inhibitorno djeluju na bakterije te zaustavljaju rast i razmnožavanje u mediju.

3.1.1. Azidiol

Azidiol (natrijev azid i kloramfenikol) je bakteriostatski konzervans koji se vrlo često koristi u laboratorijima za kontrolu kvalitete mlijeka. Najčešće dolazi u obliku plavih tableta (Slika 3.1.1.1.). Komponente azidiola natrijev azid i kloramfenikol inhibitorno djeluju na metaboličku aktivnost bakterija. Koliformne bakterije i stafilokoki osjetljivi su na natrijev azid, dok su *Salmonella* spp., *E. coli*, *Listeria* spp. i *S. aureus* osjetljiviji na kloramfenikol. Uzorci za kemijsku analizu s azidiolom mogu se čuvati više od 15 dana na 4°C i najmanje tjedan dana na sobnoj temperaturi (oko 20°C) (Upadhyay i sur., 2014.).

Prema Singh i sur. (2015.) azidiol je konzervans koji se najčešće koristi u svim laboratorijima za ispitivanje mlijeka za kemijska i bakteriološka ispitivanja. Kloramfenikol, jedan od aktivnih sastojaka azidiola je bakteriostatski antibiotik. Upotreba azidiola kao konzervansa prije zamrzavanja i zagrijavanje mlijeka na 60°C nakon odmrzavanja rezultiralo je značajnim smanjenjem broja somatskih stanica u mlijeku. U sirovom mlijeku učinkovitost azidiola kao bakteriostatskog sredstva ovisi o temperaturi pohrane uzorka i nije ovisna o početnoj razini kontaminacije. Konzervirani uzorci mlijeka mogu se analizirati do tjedan dana

nakon konzerviranja ukoliko su pohranjeni pri temperaturi 1-4°C. Natrijev azid je toksični spoj i ne razgrađuje se u okolišu. Upravo iz tog razloga azidol se ne koristi u prehrambenoj industriji kao konzervans već samo u laboratorijima za konzerviranje uzoraka.



Slika 3.1.1.1. Azidol u obliku tableta

3.1.2. Vodikov peroksid (H_2O_2)

Vodikov peroksid (H_2O_2) kao snažno oksidacijsko i antibakterijsko sredstvo uvelike se koristi kao konzervans u mlijeku i mliječnim proizvodima zbog poznatog potencijala inhibiranja rasta i razmnožavanja bakterija, te produljuje rok trajanja mlijeka. Smatra se učinkovitim i sigurnim konzervansom. Prema američkoj agenciji za hranu i lijekove prepoznat je kao sigurno antimikrobno sredstvo. Njegovo antimikrobno djelovanje u mlijeku ovisi o koncentraciji i na njega utječu čimbenici poput pH i temperature. Kod upotrebe vodikovog peroksida u mlijeku njegova količina ne smije prelaziti 0,05% količine mlijeka kako bi se smanjili štetni učinci na ljudsko zdravlje (Singh i sur., 2015.).

Kemijska svojstva H_2O_2 prepoznao je francuski kemičar Thenarda 1818. Prvi pokusi u očuvanju mlijeka s H_2O_2 izvedeni su već 1883. Vodikov peroksid tradicionalni je konzervans za inhibiciju proliferacije mikroorganizama i kvarenja mlijeka. Jedan mililitar 23%-tne otopine H_2O_2 u 300 mL sirovog mlijeka može održavati smanjenje broja bakterija tijekom 6 dana skladištenja na 8-10°C. Međutim, budući se H_2O_2 nalazi u obliku tekućine ima relativno kratkotrajnu učinkovitost, pa nije pogodan za dugotrajno čuvanje uzoraka. Antimikrobna učinkovitost H_2O_2 u velikoj mjeri ovisi o vrsti kontaminacije i početnoj kvaliteti sirovog mlijeka (tj. razini kontaminacije bakterijama i broju somatskih stanica). Općenito, Gram-

pozitivne bakterije mliječne kiseline otpornije su na H_2O_2 od Gram-negativnih bakterija. Također, antimikrobno djelovanje H_2O_2 određeno je korištenom koncentracijom i temperaturom. Količina H_2O_2 potrebna za značajnu inhibiciju rasta bakterija je mala i ne donosi značajnu promjenu u ukupnoj količini mlijeka što znači da nema nikakav utjecaj na udio masti i proteina. Većina dodanog H_2O_2 razgrađuje se mikroorganizmima koji su pozitivni na katalazu. Njegovim raspadanjem dobivaju se voda i kisik. U razrijeđenim otopinama H_2O_2 smanjuje se i oksidacijski učinak. Općenito, utjecaj H_2O_2 kao konzervansa na mlijeko pojačan je porastom temperature i produljenjem razdoblja konzerviranja. Za konzerviranje mlijeka, otopina H_2O_2 mora biti vrhunske kvalitete i bez ikakvih nečistoća (Upadhyay i sur., 2014.).

3.1.3. Natrijev azid

Prema navodima Upadhyay i sur. (2014.) natrijev azid (NaN_3) je bezbojna, kristalna kruta tvar ili otopina. Topljiv je u vodi ili tekućem amonijaku, a slabo topljiv u alkoholima. Koliformne bakterije i stafilokoki osjetljivi su na natrijev azid. Učinkovit je u stabiliziranju uzoraka mlijeka koji se koriste za mjerenje sadržaja masti i proteina. Sierra i sur. (2009.) otkrili su da povećana razina natrijevog azida uzrokuje smanjivanje točke ledišta uzoraka mlijeka. Glavni problem koji se odnosi na natrijev azid jest taj što je sposoban reagirati s metalima u cijevima otpadnog sustava unutar laboratorijskih zgrada i u kanalizacijskim sustavima, stvarajući spontane eksplozije.

3.2. Bakteriocidni konzervansi

Bakteriocidni konzervansi su oni koji imaju antibakterijsko djelovanje te svojim prisustvom u mlijeku uništavaju trenutno prisutne bakterije.

3.2.1. Bronopol

Singh i sur. (2015.) navode da je bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) vodotopljivi bakteriocidni konzervans koji se koristi u raznim higijenskim proizvodima, kozmetici, farmaceutskim proizvodima, tekstilnoj industriji, tvornicama papira i sustavima za hlađenje i u mlijeku i mliječnim proizvodima. Biocidno djelovanje bronopola pripisuje se katalitičkoj oksidaciji tiola unutar mikrobnih membrana i stvaranje slobodnih radikala koji vode do lize bakterijskih stanica, što potencijalno utječe na koncentracije određenih masnih kiselina prisutnih u mlijeku. Dodan u mlijeko, čisti bronopol ne mijenja boju mlijeka. Kod ljudi može izazvati alergijske reakcije i dermatitis prilikom izlaganja.

3.2.2. Borna kiselina

Borna kiselina (H_3BO_3) je antimikrobno sredstvo koje se koristi kada je sirovo mlijeko loše mikrobiološke kvalitete. Ponekad se dodaje u prehrambene proizvode za kontrolu želatinizacije škroba, poboljšanja boje, teksture i okusa hrane. Upotreba ovog konzervansa zabranjena je u mnogim zemljama uključujući Ujedinjeno Kraljevstvo, Tajland, Kinu i Maleziju. Smatra se štetnim za ljudsko zdravlje te se njegova upotreba ne preporučuje. Smrtonosne doze za dojenčad su 3-6 g, a za odrasle 15-20 g. Borna kiselina može prouzročiti mučninu, povraćanje, krvavi proljev, jake grčeve, otkazivanje bubrega, konvulzije i ostala zdravstvene probleme (Singh i sur. 2015.).

3.2.3. Živin klorid

Živin klorid ($HgCl_2$) je u prošlosti odobren u SAD-u kao konzervans za uzorke sirovog mlijeka. Otrovan je i korozivan, ali učinkovit konzervans. Često je prodavan u obliku tableta koje su bile kombinacija živinog klorida i drugih oksidirajućih sredstava. Tablete su dolazile u dvije doze: 0,5 g i 1 g. Oko 46,7% tablete čini $HgCl_2$, ostatak je inertni materijal za punjenje i vezivni materijal kao što su natrijev klorid, akacija i mineralno ulje. Danas se živin klorid više ne koristi kao konzervans jer je do kraja 1960. zabranjen za upotrebu zbog štetnog utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje. Nadalje, njegova korozivna priroda doprinosi trošenju materijala u laboratorijima koji obavljaju instrumentalnu analizu (Upadhyay i sur., 2014.).

3.2.4. Kalijev dikromat

Nakon zabrane korištenja živinog klorida, kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$) je prihvaćen kao konzervans za uzorke mlijeka. Relativno je nekorozivan i pojavljuje se u narančasto-crvenoj boji zbog formiranja dikromatnog iona. U farmaceutskoj industriji se isključivo koristi kao oksidirajuće sredstvo. Prosječna veličina tableta ovog konzervansa je 100 mg u kojima se nalazi 41 mg aktivnog sastojka. U 100 mL mlijeka dodaje se 0,04% kalijevog dikromata. Problemi vezani uz ovaj konzervans su da uzorci mlijeka s vremenom postaju kiseli i koaguliraju. Mijenja se i boja mlijeka koja postaje sivkasto zelena. Iako se kalijev dikromat pokazao kao dobar konzervans, često se ističe kao problematičan. Njegova molekularna struktura sadrži šesterovalentni krom koji je poznati uzročnik nadraživanja sluznice nosa, krvarenja nosa i rinitisa. Kod ljudi koji su bili u kontaktu s ovim konzervansom zabilježeni su različiti stupnjevi ekcema. Također, s obzirom da je biocidan uzrokuje okolišne probleme vezane uz zbrinjavanje (Upadhyay i sur., 2014.).

3.2.5. Formaldehid

Formaldehid (CH_2O) je komercijalno dostupan kao 37–40% vodena otopina poznata kao formalin. Prilikom skladištenja može tvoriti polimere, točnije paraformaldehid $(\text{CH}_2\text{O})_n$, koji je uglavnom u obliku trimera, poznatih kao meta-formaldehid ili trioksimetilen. Kako bi se inhibirala polimerizacija formaldehida, u komercijalno dostupan formalin dodaje se 10–15% metanola. Formalin, kao skladišni antiseptik i dezinficijens, koristi se u očuvanju različitih prehrambenih proizvoda. Kao poznati karcinogen zabranjena je njegova upotreba u prehrambenim proizvodima za konzumaciju. U Indiji je dopušteno konzerviranje mlijeka i mliječnih proizvoda namijenjenih kemijskoj analizi u količini od 0,1 mL/25 mL. Formaldehid djeluje alkiliranjem amino, karboksilne ili hidroksilne skupine i vjerojatno oštećuje nukleinske kiseline. Inaktivira sve mikroorganizme, uključujući spore. Upotreba formalina na takvoj razini pokazala je promjenjive rezultate u pogledu njegove sposobnosti očuvanja uzoraka. Za objašnjenje ove varijabilnosti predlagani su različiti razlozi, kao što su upotreba formalina lošije kvalitete, razdoblje skladištenja, temperatura skladištenja i svojstva uzorka. Pokazalo se da utječe na različita fizikalno-kemijska svojstva, kao i na sadržaj masti, proteina, laktoze i ukupne suhe tvari tijekom skladištenja (Upadhyay i sur., 2014.).

4. Materijali i metode rada

4.1. Uzrokovanje mlijeka

Od ožujka do srpnja 2020. godine prikupljeno je 40 uzoraka sirovog mlijeka koji su analizirani u više serija. Ukupno je prikupljeno i analizirano 3 serije mlijeka (uzorci serije 1 prikupljeni su 02.03.2020., uzorci serije 2 - 15.06.2020., te uzorci serije 3 - 10.07.2020.).

4.2. Određivanje broja bakterija u mlijeku metodom protočne citometrije

Ukupan broj bakterija u uzorcima sirovog mlijeka određivan metodom protočne citometrije na instrumentu „Bactoscan FC“ (Foss, Danska) (Slika 4.2.1.) u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode, Zavoda za mljekarstvo, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Ovaj instrument služi za brzo određivanje higijenske kvalitete uzoraka sirovog mlijeka brojanjem ukupnog broja bakterija u uzorku. Bakterije se u inkubacijskoj jedinici boje fluorescentnom bojom: etidij bromid. Inkubiranja mješavina uzorka i reagensa se uvodi u obliku vrlo tankog sloja u protočnu stanicu. Kod protočne stanice smješten je modul s detektorima fluorescencije koji detektiraju svjetlo koje emitiraju obojene bakterije. Na temelju intenziteta svjetla iz različitih detektora, svjetlosni signali se analiziraju i konvertiraju u električne impulse. Modul za brojanje sumira električne impulse i rezultat se prikazuje na monitoru računala. Kako bi se iz uzorka izolirale sve čestice kao npr. kazeinske micelle, masne globule i somatske stanice – uzorak se kemijski tretira čime se sve navedene čestice osim bakterijske stanice unište. Na kraju instrument metodom linearne regresije preračunava rezultate iz pojedinačnih bakterija (*eng.* IBC) u broj živih bakterija koje formiraju kolonije (*eng.* CFU).

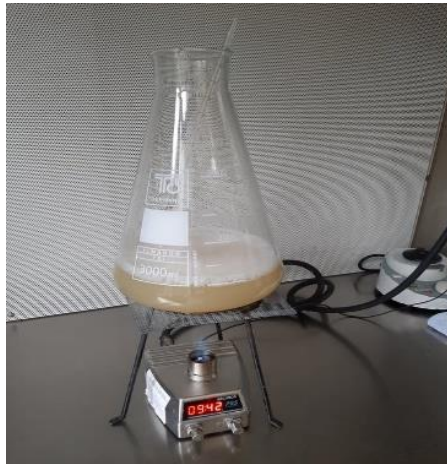


Slika 4.2.1. Bactoscan FC instrument za protočnu citometriju

(Izvor: <https://www.fossanalytics.com/en/products/bactoscan> - pristupljeno 16.05.2020.)

4.3. Klasična metoda određivanja broja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Određivanje broja aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku temelji se na međunarodnoj normi HRN EN ISO 4833:2003. Metoda određivanja broja bakterija na hranjivoj podlozi sastoji se od pripreme otopine peptona i hranjive podloge. Za pripremu otopine peptona potrebno je odvagati 1 g peptona i nadopuniti do 1000 mL s destiliranom vodom. Po 9 mL pripremljene otopine peptona se zatim uz pomoć automatske birete pipetira u epruvete i zatvara čepovima. Epruvete napunjene peptonom steriliziraju se u autoklavu pri temperaturi od 121°C u trajanju od 22 minute. Nakon pripreme peptona slijedi priprema hranjive podloge. Potrebno je odvagati 24,5 g hranjive podloge (Trypton-5 g, ekstrakt kvasca-2,5 g, glukoza-1 g, mlijeko u prahu-1 g, Agar BIOS LL-15 g) i nadopuni do 1000 mL destilirane vode. Hranjiva podloga se zagrijava na plameniku do vrenja uz neprestano miješanje (Slika 4.3.1.), prebacuje u vatrostalne bočice s navojem i sterilizira na isti način kao otopina peptona.



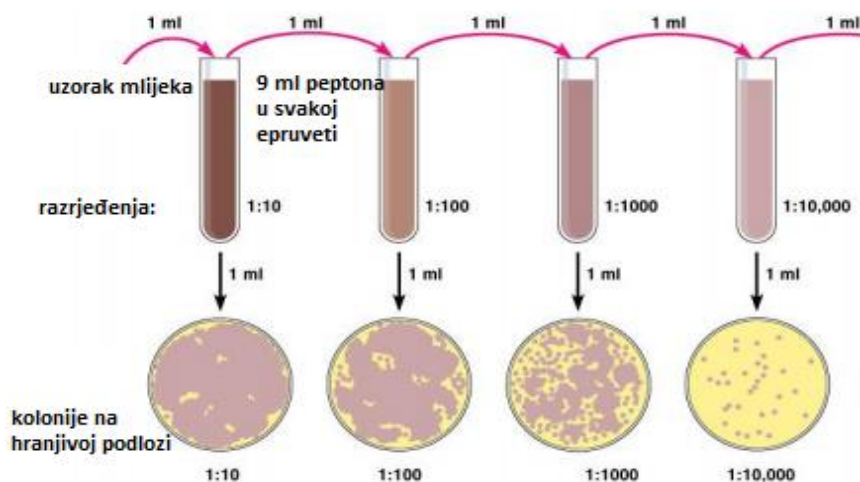
Slika 4.3.1. Kuhanje hranjive podloge na plameniku

Za određivanje broja bakterija u mlijeku potrebno je prirediti uzorke mlijeka koji su prethodno analizirani u instrumentu „Bactoscan FC“ kako bi se lakše odabrala potrebna razrijeđenja. Dodatni potrebni pribor za provođenje analize su sterilizirane Petrijeve zdjelice, sterilizirani nastavci za pipete, sterilizirana automatska pipetu i vibracijska mješalica za homogeniziranje uzoraka. Radnu površinu je prije početka analize potrebno dezinficirati 70%-tnim etilnim alkoholom.



Slika 4.3.2. Radna površina s potrebnim priborom za određivanja ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku klasičnom metodom HRN EN ISO 4833-1:2013

Uzorke mlijeka prije analize potrebno je promiješati na vibracijskoj mješalici. Za pripremu uzorka mlijeka razrjeđenja 10^{-1} sterilno se pipetira 1 mL mlijeka u epruvetu s 9 mL sterilne otopine peptona (Slika 4.3.3.). Za pripremu uzorka mlijeka razrjeđenja 10^{-2} iz priređenog uzorka mlijeka razrjeđenja 10^{-1} se pipetira 1 mL suspenzije u epruvetu s 9 mL sterilne otopine peptona. Isti postupak se ponavlja do potrebnog razrjeđenja. U praznu Petrijevu zdjelicu pipetira se 1 mL uzorka odgovarajućeg razrjeđenja. Uzorak se zatim preljeva s 12-15 mL hranjive podloge prethodno zagrijane na 45°C . Nakon što se hranjiva podloga stvrdne, Petrijeve zdjelice stavljaju se na inkubaciju pri 30°C u trajanju od 72h.



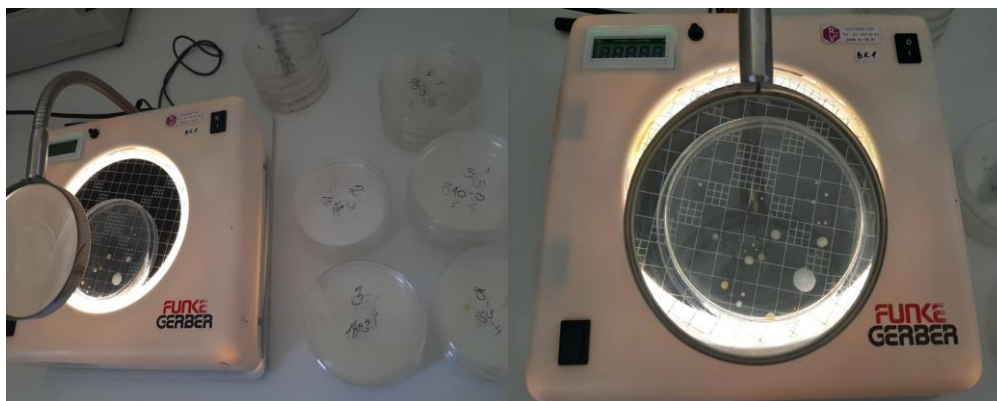
Slika 4.3.3. Postupak dobivanja potrebnog decimalnog razrjeđenja uzorka

(Izvor: https://classconnection.s3.amazonaws.com/845/flashcards/4237845/png/screen_shot_2013-11-16_at_93054_am-14261532A1E483696F6.png - pristupljeno 20.3.2020.)

Preostali volumen uzoraka sirovog mlijeka konzervira se dodatkom azidiola (Slika 4.3.4.) te se sutradan opisana procedura ponavlja s konzerviranim uzrocima mlijeka. Nakon 72 h inkubacije provodi se brojanje izraslih kolonija na hranjivoj podlozi (Slika 4.3.5.). Kolonije su zatim označene i identificirane pomoću MALDI-TOF tehnike na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za fizičku kemiju.



Slika 4.3.4. Uzorci konzervirani azidolom

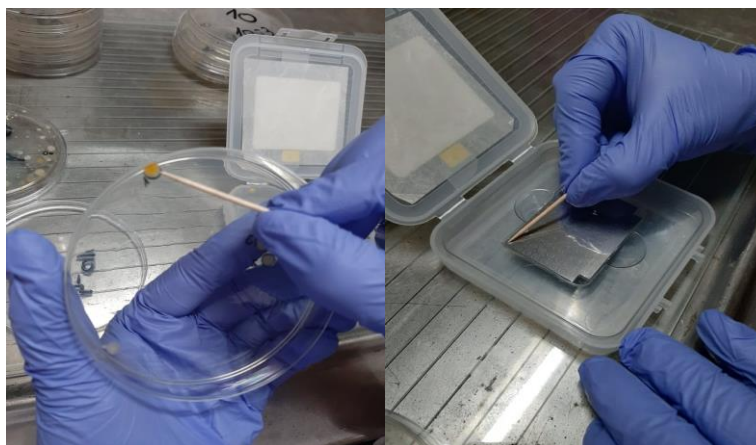


Slika 4.3.5. Brojanje kolonija bakterija izraslih na hranjivoj podlozi

4.4. Postupak uzorkovanja i identifikacija MALDI-TOF tehnikom

Za identifikaciju izraslih kolonija na Petrijevim zdjelicama korištena je MALDI-TOF tehnika na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Za provođenje analize potrebne su: sterilne čačkalice, uzorci sa označenim kolonijama, mravlja kiselina, automatska pipeta namještena na 1 μ L, MALDI matrica, MALDI-TOF instrument i softverski program MALDI Biotyper 3.0 koji sadrži biblioteku mikroorganizama.

Prvi korak je uzimanje uzorka kolonije s Petrijeve zdjelice sterilnom čačalicom (Slika 4.4.1). Uzeti uzorak se nanosi na MALDI pločicu na što se onda nanosi 1 μ L mravlje kiseline i 1 μ L MALDI matrice nakon što se nanosena mravlja kiselina osuši (Slika 4.4.2).



Slika 4.4.1. Uzimanje uzorka kolonije i nanošenje na MALDI pločicu



Slika 4.4.2. MALDI pločica sa nanesenim uzorcima, mravljom kiselinom i MALDI matricom

Nakon što se svi uzorci nanesu na MALDI pločicu i osuše, MALDI pločica se stavlja u MALDI-TOF instrument i započinje identifikacija kolonija. Poslije unošenja pločice u instrument izrađuje se lista za očitavanje klasificiranih bakterija. MALDI-TOF instrument uspoređuje automatski generirani spektar mase uzorka s referentnim spektrima koje ima pohranjene u biblioteci. Nakon toga slijedi obrada MALDI Biotyper softverskim programom.

Instrument na kraju analize rezultate na ekranu računala prikazuje u 3 boje: zelena boja označava savršeno preklapanje između spektra mase uzorka i referentnog spektra. Žuta boja označava djelomično preklapanje, a kada postoje razlike između spektra uzorka i referentnog spektra to je označeno crvenom bojom.

5. Rezultati i rasprava

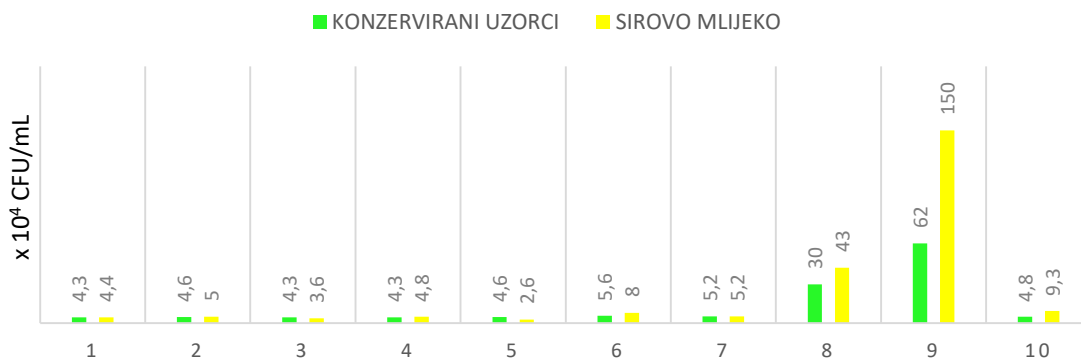
5.1. Rezultati protočne citometrije i klasične metode određivanja ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija

Rezultati određivanja ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija (CFU/mL) 40 uzoraka sirovog mlijeka metodom protočne citometrije prikazani su u Tablicama 5.1.1., 5.1.2. i 5.1.3. prikazuju.

Tablica 5.1.1. Rezultati ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU) za uzorke sirovog mlijeka određenih na instrumentu Bactoscan FC (serija 1)

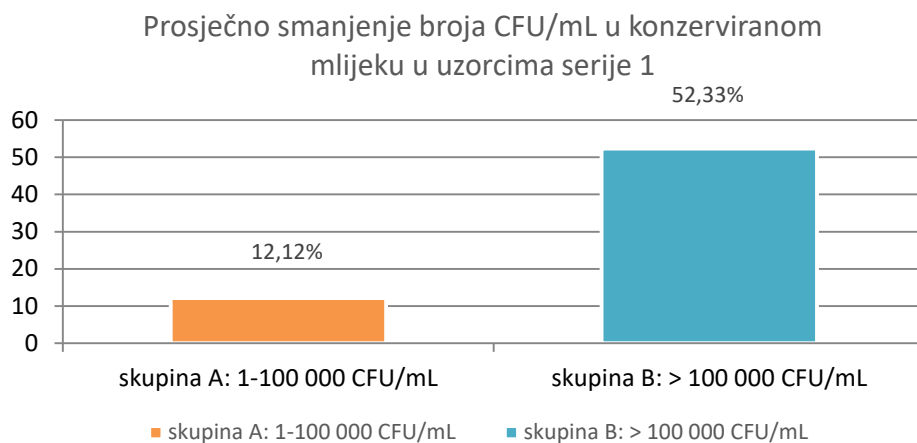
Uzorci sirovog mlijeka serije 1	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (CFU/mL)
1	80.000
2	110.000
3	85.000
4	92.000
5	95.000
6	72.000
7	150.000
8	820.000
9	1 500.000
10	95.000

Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija određivan je i klasičnom metodom brojanja izraslih kolonija na hranjivoj podlozi za uzorke sirovog i konzerviranog mlijeka azidiolom. Grafikon 5.1.1. prikazuje razlike u broju aerobno mezofilnih bakterija u sirovom i konzerviranom mlijeku. Iz grafikona je vidljivo smanjenje broja kolonija u uzorcima konzerviranim azidiolom.



Grafikon 5.1.1. Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija u sirovom i konzerviranom mlijeku ($\times 10^4$) izraženi u CFU/mL

Prosječni broj bakterija u seriji 1 za uzorke sirovog mlijeka bio je 236.000 CFU/mL, a za uzorke konzerviranog mlijeka 130.000 CFU/mL što je prosječno smanjenje od 45% nakon korištenja konzervansa. U seriji 1 formirane su 2 skupine uzoraka ovisno o početnom broju bakterija, kako bi mogli proučiti trend smanjenja broja bakterija u seriji. Skupina A označava uzorke sa početnim brojem bakterija od 1-100.000 CFU/mL (n=8) te je prosječan broj aerobno mezofilnih bakterija u sirovim uzorcima ove skupine bio 53.625 CFU/mL, a nakon korištenja konzervansa prosjek je 47.125 CFU/mL što je smanjenje od 12,12%. Skupina B označava uzorke s početnim brojem > 100.000 CFU/mL (n=2) te je prosječan broj aerobno mezofilnih bakterija u sirovim uzorcima ove skupine bio 965.000 CFU/mL, a u konzerviranim uzorcima 460.000 CFU/mL što je smanjenje od 52,33%. Grafikon 5.1.2. prikazuje prosječno smanjenje CFU/mL ovisno o početnom broju aerobno mezofilnih bakterija koji su uzorci imali nakon upotrebe azidiola te je vidljivo kako se povećanjem početnog broja bakterija korištenjem konzervansa povećava i razlika u početnom i krajnjem broju bakterija u uzorku.

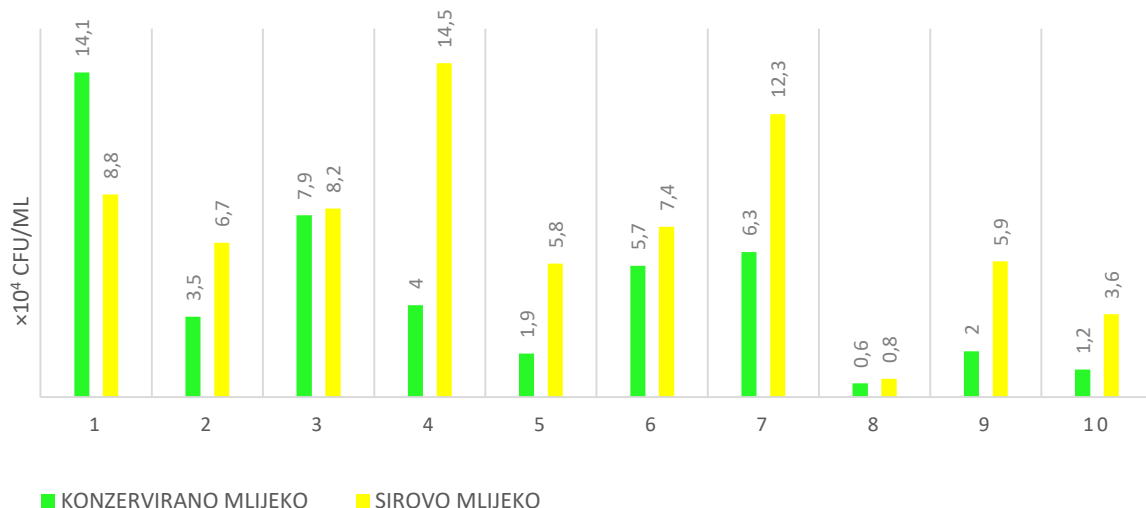


Grafikon 5.1.2. Prosječno smanjenje broja CFU/mL nakon korištenja azidiola ovisno o početnom broju bakterija za uzorke serije 1

Tablica 5.1.2. Rezultati ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU) za uzorke sirovog mlijeka određenih na instrumentu Bactoscan FC (serija 2)

Uzorci sirovog mlijeka serije 2	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (CFU/mL)
1	257.000
2	81.000
3	84.000
4	80.000
5	42.000
6	65.000
7	243.000
8	43.000
9	123.000
10	70.000

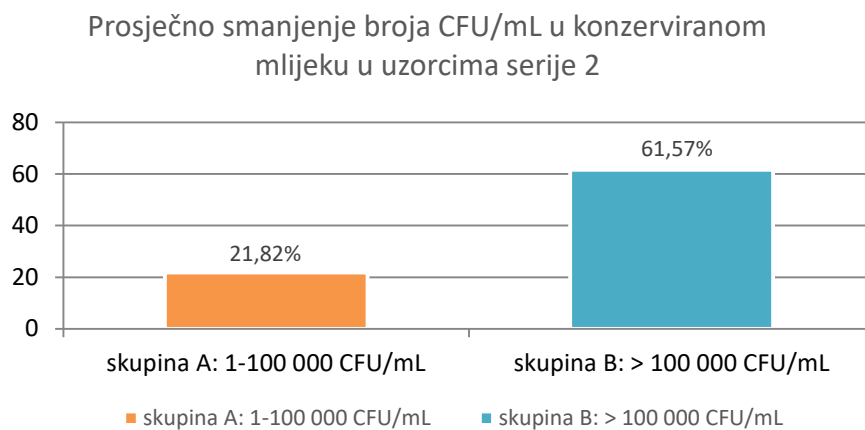
Kod uzoraka serije 2 ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija određen klasičnom metodom kretao se od 42.000 do 257.000 CFU/mL. Grafikon 5.1.3. prikazuje usporedbu broja kolonija u sirovom i konzerviranom mlijeku za uzorke serije 2 dobivenih brojanjem na hranjivoj podlozi.



Grafikon 5.1.3. Rezultati određivanja broja kolonija klasičnom metodom u sirovom i konzerviranom mlijeku ($\times 10^4$) izraženi u CFU/mL u seriji uzoraka 2

Prosječni broj aerobno mezofilnih bakterija u seriji 2 za uzorke sirovog mlijeka bio je 74.000 CFU/mL, a za uzorke konzerviranog mlijeka 47.000 CFU/mL što je prosječno

smanjenje od 36% nakon korištenja konzervansa. U seriji 2 formirane su 2 skupine uzoraka ovisno o početnom broju bakterija. Skupina A označava uzorke s početnim brojem bakterija od 1 - 1. 000 CFU/mL (n=8) te je prosječan broj aerobno mezofilnih bakterija u sirovim uzorcima ove skupine bio 59.000 CFU/mL, a u konzerviranim uzorcima 46.125 CFU/mL što je prosječno smanjenje od 21,82%. Skupina B su uzorci s početnim brojem > 100.000 CFU/mL (n=2). Uzorci sirovog mlijeka skupine B imali su prosječni broj aerobno mezofilnih bakterija od 134.000 CFU/mL, a konzervirani uzorci 51.500 CFU/mL što je smanjenje od 61,57%. Grafikon 5.1.4. prikazuje prosječno smanjenje broja CFU/mL ovisno o početnom broju bakterija koji su uzorci imali nakon upotrebe azidiola.

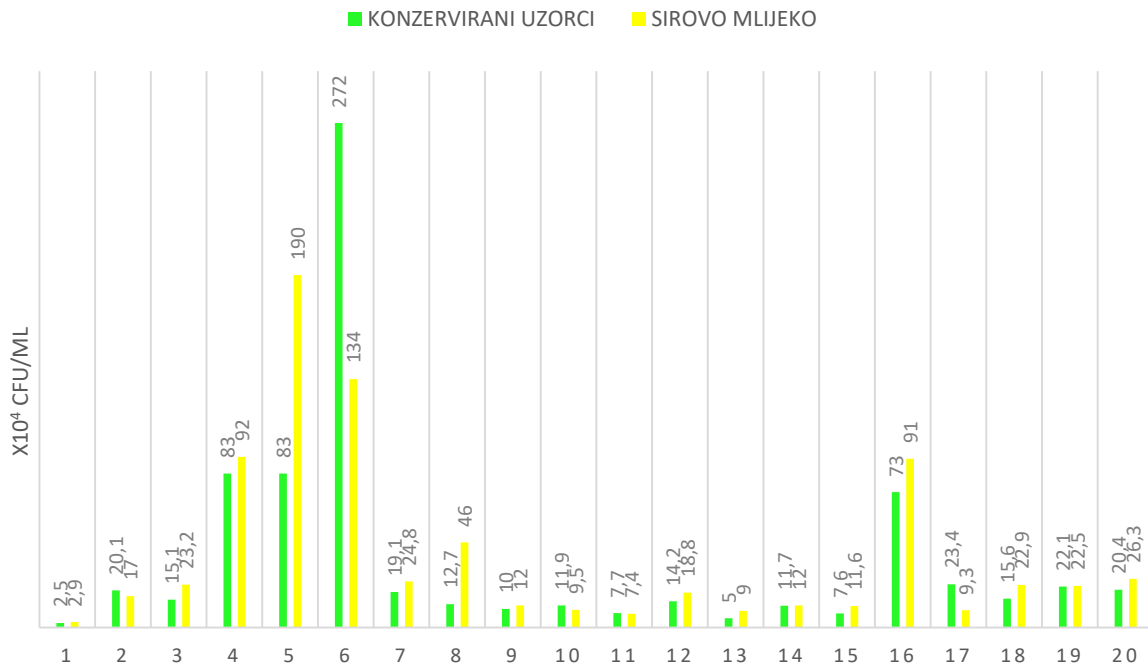


Grafikon 5.1.4. Prosječno smanjenje broja CFU/mL nakon korištenja azidiola ovisno o početnom broju bakterija za uzorke serije 2

Tablica 5.1.3. Rezultati određivanja ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (CFU) za uzorke sirovog mlijeka određenih na instrumentu Bactoscan FC (serija 3)

Uzorci sirovog mlijeka serije 3	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (CFU/mL)
1	110.000
2	165.000
3	421.000
4	2 444.000
5	1 880.000
6	1 415.000
7	52.000
8	472.000
9	270.000
10	34.000
11	16.000
12	290.000
13	170.000
14	69.000
15	691.000
16	1 011.000
17	139.000
18	137.000
19	520.000
20	79.000

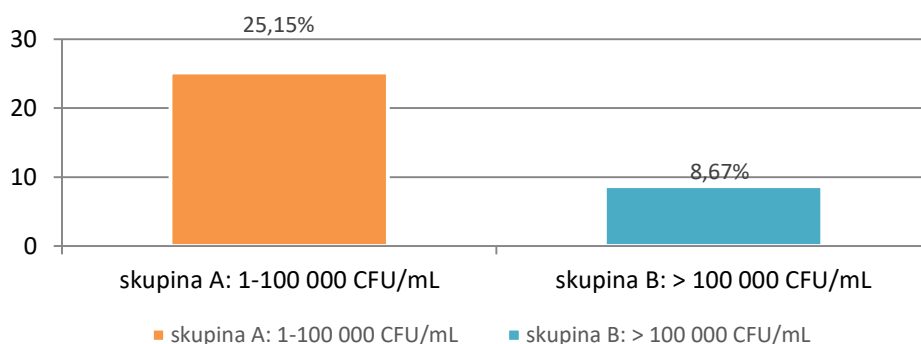
U uzorcima sirovog mlijeka serije 3 utvrđen je broj aerobno mezofilnih bakterija od 16.000 do 2 444.000 CFU/mL sirovog mlijeka. Konzerviranje mlijeka u većini uzoraka utjecalo je na smanjenje broja aerobno mezofilnih bakterija što je prikazano u grafikonu 5.1.5.



Grafikon 5.1.5. Rezultati određivanja brojanja kolonija klasičnom metodom u sirovom i konzerviranom mlijeku ($\times 10^4$) izraženi u CFU/mL u seriji uzoraka 3

Prosječni broj aerobno mezofilnih bakterija u seriji 3 za uzorke sirovog mlijeka iznosio je 391.000 CFU/mL, a za uzorke konzerviranog mlijeka 365.000 CFU/mL, što je prosječno smanjenje od 6,61% nakon korištenja konzervansa. U seriji 3 formirane su 2 skupine uzoraka ovisno o početnom broju bakterija. Skupina A označava uzorke s početnim brojem bakterija od 1-100.000 CFU/mL (n=5) gdje je prosječan broj aerobno mezofilnih bakterija bio 76.200 CFU/mL dok se jedino u ovoj skupini uočava prosječno povećanje u uzorcima konzerviranim azidiolom pa je tako prosjek za konzervirane uzorke 101.800 CFU/mL što je povećanje od 25,15%. Skupina B su uzorci s početnim brojem > 100.000 CFU/mL (n=15) te je prosjek za sirove uzorke ove skupine iznosio 372.050 CFU/mL, a u konzerviranim uzorcima 339.800 CFU/mL što je smanjenje od prosječno 8,67%. Grafikon 5.1.6. prikazuje promjenu broja CFU/mL ovisno o početnom broju bakterija koji su uzorci imali nakon upotrebe azidiola.

Promjena broja CFU/mL u konzerviranom mlijeku u
uzorcima serije 3

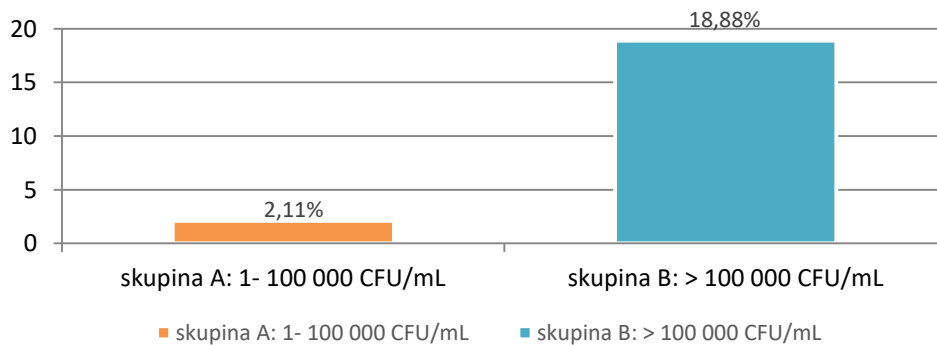


Grafikon 5.1.6. Prosječno smanjenje broja CFU/mL nakon korištenja azidiola ovisno o početnom broju bakterija za uzorke serije 3

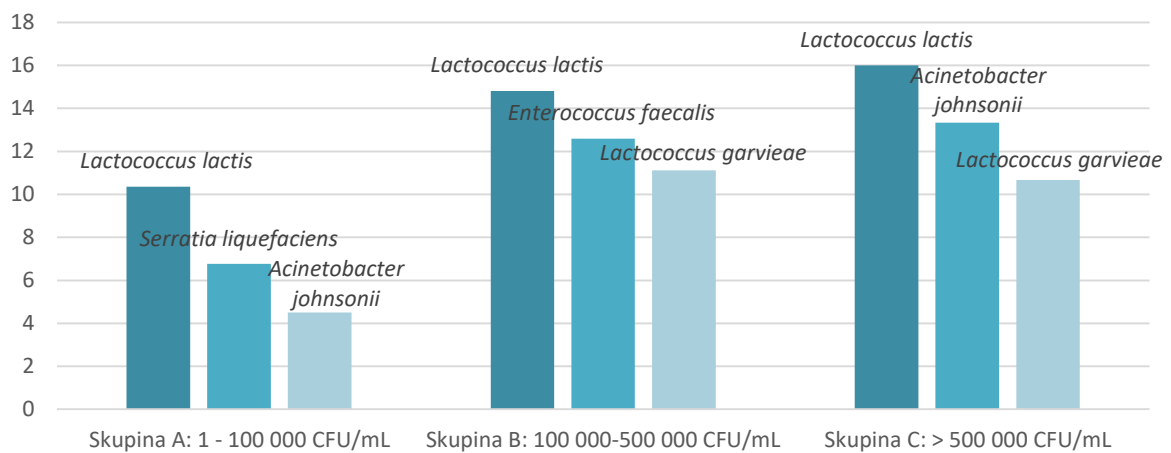
Grafikon 5.1.7. prikazuje prosječan trend promjene broja aerobno mezofilnih bakterija u uzorcima mlijeka za sve serije uzoraka nakon korištenja azidiola. Za sve serije uzoraka skupina A sastojala se od 21 uzorka, a skupina B od 19 uzoraka. Prosječni broj CFU/mL za sve uzorke sirovog mlijeka skupine A iznosio je 61.047 CFU/mL dok je za konzervirane uzorke skupine A on bio 59.762 CFU/mL što je prosječno smanjenje od 2,11%. Za skupinu B svih uzoraka prosjek aerobno mezofilnih bakterija iznosio je 507.316 CFU/mL, a nakon konzerviranja on je bio 411.526 CFU/mL što je prosječno smanjenje od 18,88%.

Od ukupno 40 uzoraka u 30 uzoraka uočeno je smanjenje broja kolonija u uzorcima konzerviranim azidiolom. U 8 uzoraka uočava se povećanje broja kolonija dok su nikakva odstupanja uočena u 2 uzorka. U 9 uzoraka uočeno je odstupanje manje od 10%, od toga je 5 uzoraka iz skupine s početnim brojem do 100.000 CFU/mL. Najmanja odstupanja uočena su u skupini do 100.000 CFU/mL i za sve serije iznose prosječno 2,11%. Za sve uzorke veće od 100.000 CFU/mL prosječna odstupanja iznose prosječno 18,88%. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da je azidiol najboljeg djelovanja za skupinu uzoraka s početnim brojem aerobno mezofilnih bakterija manjim od 100.000, dok njegovo djelovanje postaje nestabilnije kod uzoraka mlijeka s povećanim brojem bakterija. Prema posljednjem izvješću HAPIH-a (2020.) u Republici Hrvatskoj 96% mlijeka pripada 1. klasi, zbog čega se još uvijek koristi u sastavu kontrole mlijeka.

Prosječno smanjenje broja CFU/mL u mlijeku konzerviranom azidiolom ovisno o početnom broju bakterija za uzorke skupine A i B svih serija

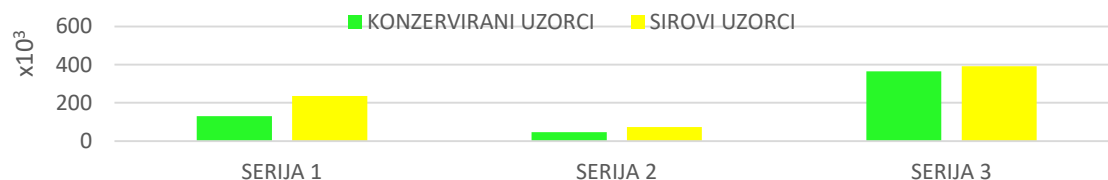


Grafikon 5.1.7. Prosječno smanjenje broja CFU/mL nakon korištenja azidiola ovisno o početnom broju bakterija za uzorke skupine A(n=21) i B(n=19) serije 1, serije 2 i serije 3



Grafikon 5.1.8. Prevladavajuće bakterijske vrste u uzorcima sirovog mlijeka s različitim početnim brojem bakterija

Prosječan broj CFU/mL u serijama 1,2 i 3 - sirovo i konzervirano mlijeko



Grafikon 5.1.9. Prosječan broj CFU/mL u svim serijama uzoraka (sirovo i konzervirano mlijeko)

Grafikon 5.1.8. prikazuje bakterijske vrste koje prevladavaju u uzorcima ovisno o početnom broju bakterija u sirovom mlijeku. U skupini A s početnim brojem bakterija od 1 – 100.000 CFU/mL prevladavaju *Lactococcus lactis*, *Serratia liquefaciens* i *Acinetobacter johnsonii*. U skupini B s početnim brojem bakterija od 100.000 – 500.000 CFU/mL prevladavaju *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* i *Lactococcus garvieae*. U skupini C s početnim brojem bakterija > 500.000 CFU/mL prevladavaju *Lactococcus lactis*, *Acinetobacter johnsonii* i *Lactococcus garvieae*.

Metoda protočne citometrije se koristi za provjeravanje rezultata klasične metode, za kalibraciju instrumenata i za određivanje razine odstupanja rezultata. Na ukupan broj bakterija u uzorcima utječe veliki broj faktora pa se tako rezultati tih analiza ne bi trebali promatrati u strogim okvirima dobivenih rezultata. Upotrebom azidiola u većini uzoraka se smanjio broj aerobno mezofilnih bakterija – od 40 analiziranih uzoraka u 30 uzoraka je broj aerobno mezofilnih bakterija bio manji nakon upotrebe konzervansa. Međutim, broj uzoraka je premali za donošenje zaključaka o utjecaju azidiola na smanjenje broja bakterija u mlijeku.

Na slici 5.1.4. prikazane se dvije Petrijeve zdjelice istog uzorka mlijeka istog razrijeđenja. Lijevo prikazano su kolonije izrasle iz uzorka sirovog mlijeka, a slika desno prikazuje uzorak mlijeka s konzervansom s pripadajućim kolonijama.



Slika 5.1.4. Izrasle kolonije iz uzorka sirovog mlijeka i konzerviranog uzorka 9 iz serije uzoraka 2

Na temelju rezultata svih analiziranih uzoraka uočava se smanjenje ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija u uzorcima konzerviranim azidolom. Prosječan broj aerobno mezofilnih bakterija u uzorcima sirovog mlijeka iznosio je 273.000 CFU/mL dok u konzerviranim uzorcima taj broj je manji za 13,6% i iznosi 227.000 CFU/mL. U 1. seriji uzoraka prosječno smanjenje CFU/mL iznosi 45,02%, u 2. seriji uzoraka ono je 36,22% i u 3. seriji uzoraka 6,61%.

5.2. Rezultati MALDI-TOF tehnike u identifikaciji aerobno mezofilnih bakterija

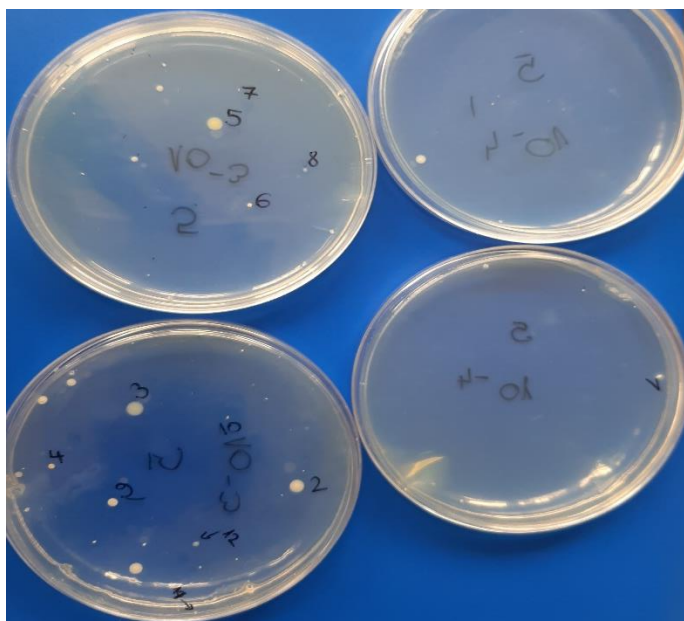
MALDI-TOF tehnikom identificirane su izrasle bakterijske kolonije na Petrijevim zdjelicama. Prije provođenja analize, izrasle bakterijske kolonije su označene i numerirane te je kreirana MALDI lista sa svim označenim kolonijama (Slika 5.2.1.). Na istoj Petrijevoj zdjelici identificirane su kolonije različitih morfoloških karakteristika (Slika 5.2.2.) pa tako dvije iste kolonije nisu uzorkovane na MALDI pločicu. Ista MALDI pločica snimana je dva puta zbog točnijeg dobivanja rezultata identifikacije. Svi rezultati MALDI-TOF tehnike prikazani su u Prilogu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1K 1	1K 2	1K 3	1K 4	1K 5	1K 6	1K 7	1K 8	1K 9	2K 1	2K 2	2K 3
B	2K 4	2K 5	2K 6	2K 7	2K 8	2K 9	3K 1	3K 2	3K 3	3K 4	3K 5	3K 6
C	3K 7	3K 8	3K 9	3K 10	3K 11	3K 12	4K 1	4K 2	4K 3	4K 4	4K 5	4K 6
D	4K 7	4K 8	4K 9	5K 1	5K 2	5K 3	5K 4	5K 5	5K 6	7K 1	7K 2	7K 3
E	7K 4	7K 5	7K 6	7K 7	7K 8	7K 9	8K 1	8K 2	8K 3	8K 4	8K 5	8K 6
F	9K 1	9K 2	10K 1	10K 2	10K 3	10K 4	10K 5					
G												
H												

Datum: 23.06.2020.
Ime: NINA -DIPLOMSKI
Snimio:

Slika 5.2.1. MALDI lista sa označenim kolonijama i njihovim pozicijama na MALDI pločici

Na slici 5.2.2. prikazan je označeni uzorak broj 5 iz serije uzoraka 1 s 12 morfološki različitih kolonija koje se nanose na MALDI pločicu i identificiraju u instrumentu MALDI-TOF spektrometru masa.



Slika 5.2.2. Uzorak broj 5 iz serije uzoraka 1 s označenim izraslim kolonijama

MALDI-TOF instrument uspoređuje rezultate kolonija s referentnim spektrom pohranjenim u biblioteci mikroorganizama. Ovisno o podudarnosti s referentnim spektrom instrument pokazuje slijedeće rezultate:

1. *Lactococcus lactis* 2.366
2. *Ochrobacterium grignonense* 1.738
3. *Acinetobacter johnsonii* 2.19
4. *Rhodococcus erythropolis* 2.103
5. *Microbacterium maritypicum* 2.064
6. *Rhodococcus erythropolis* 1.911
7. *Ochrobactrum gallinifaecis* * 1.414
8. *Ochrobactrum grignonense* 1.727
9. *Corynebacterium casei* 2.02
10. *Corynebacterium* spp.* 1.495
11. *Corynebacterium xerosis* 1.795
12. *Alcaligenes faecalis* 1.747

Rezultati označeni zvjezdicom (*) označavaju nepouzdanu identifikaciju. Do toga može doći uslijed uzimanja previše ili premalo uzorka za premazivanje na MALDI pločicu ili zbog izostanka referentnog spektra u biblioteci mikroorganizama za uzorkovanu bakterijsku koloniju.

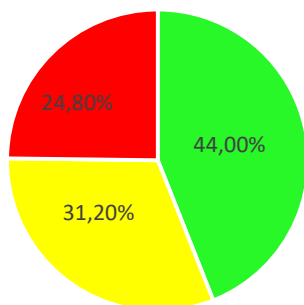
Tablica 5.2.1. Bruker Daltonik MALDI Biotyper rezultati za serije uzoraka 1, 2 i 3 za sirovo i konzervirano mlijeko

	serija 1 sirovo mlijeko	serija 1 konzervirano mlijeko	serija 2 sirovo mlijeko	serija 2 konzervirano mlijeko	serija 3 sirovo mlijeko	serija 3 konzervira no mlijeko
OCJENA						
2.000– 3.000	55	53	30	26	69	56
	44,00%	46,90%	41,10%	41,27%	35,38%	40,00%
1.7000– 1.999	39	32	27	22	78	53
	31,20%	28,32%	36,99%	34,92%	40,00%	37,86%
< 1.699	31	28	16	15	48	31
	24,80%	24,78%	21,92%	23,81%	24,62%	22,14%
UKUPNO	125	118	73	63	195	140

Tablica 5.2.1. prikazuje rezultate identifikacije izraslih bakterijskih kolonija u sirovim i konzerviranim uzorcima. Za seriju uzoraka 1 (konzervirani uzorci) od ukupno 118 analiziranih kolonija, sigurnom identifikacijom (ocjena od 2.000 do 3.000) utvrđeno je 53 kolonija, vjerojatnom identifikacijom (ocjena od 1.700 do 1.999) utvrđene su 32 kolonije i nepouzdanom identifikacijom (ocjena 1.699) utvrđene su 33 kolonije. Za istu seriju uzoraka ali za uzorke sirovog mlijeka, od ukupno 125 analiziranih kolonija, sigurnom identifikacijom utvrđeno je 55 kolonija, vjerojatnom identifikacijom utvrđeno je 38 kolonija, a nepouzdanom identifikacijom utvrđene su 32 kolonije. Za seriju uzoraka 2 od ukupno 73 uzoraka sirovog mlijeka pouzdanom identifikacijom utvrđeno je 30 kolonija, vjerojatnom identifikacijom 27 kolonija i nepouzdanom identifikacijom 16 kolonija. Za konzervirane uzorke iste serije od ukupno 63 kolonija pouzdanom identifikacijom utvrđeno je 26 kolonija, vjerojatnom identifikacijom 22 kolonije i nepouzdanom identifikacijom 15 kolonija. Za seriju uzoraka 3 kod uzoraka od sirovog mlijeka, od ukupno 195 analiziranih kolonija pouzdanom identifikacijom utvrđeno je 69 kolonija, vjerojatnom identifikacijom 78 kolonija, a nepouzdanom identifikacijom 48 kolonija. U konzerviranim uzorcima ove serije od ukupno 140 identificiranih kolonija, 56 su pouzdano identificirane, a 53 ih je vjerojatno identificirano i 31 nepouzdanom identificirana.

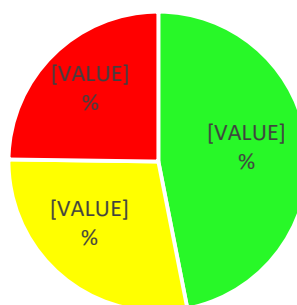
Grafikoni 5.2.3., 5.2.4. i 5.2.5., prikazuju rezultate MALDI Biotyper identifikacije bakterijskih kolonija na razini vrste i roda za serije uzoraka 1,2 i 3 izraženo u postotcima (%). Zelena boja u grafikonima predstavlja pouzdanu identifikaciju, žuta vjerojatnu identifikaciju i crvena boja predstavlja nepouzdanu identifikaciju.

sirovo mlijeko



- Sigurna identifikacija
- Vjerojatna identifikacija
- Nepouzdana identifikacija

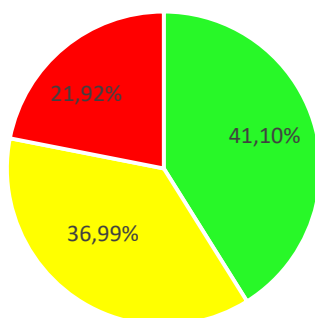
konzervirano mlijeko



- Sigurna identifikacija
- Vjerojatna identifikacija
- Nepouzdana identifikacija

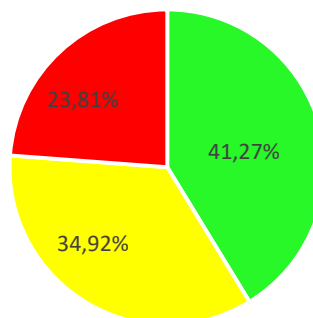
Grafikon 5.2.3. Rezultati identifikacije na razini vrste i roda za seriju uzoraka 1 - sirovo i konzervirano mlijeko analizirani MALDI Biotyper-om.

sirovo mlijeko



- Sigurna identifikacija
- Vjerojatna identifikacija
- Nepouzdana identifikacija

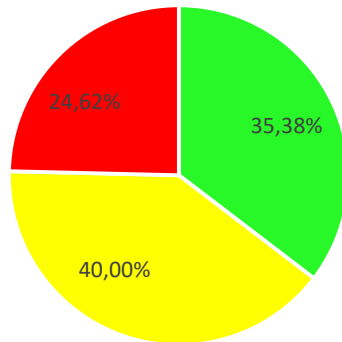
konzervirano mlijeko



- Pouzdana identifikacija
- Vjerojatna identifikacija
- Nepouzdana identifikacija

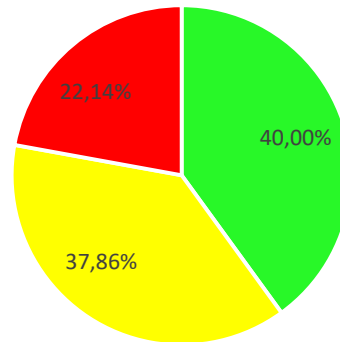
Grafikon 5.2.4. Rezultati identifikacije na razini vrste i roda za seriju uzoraka 2 - sirovo i konzervirano mlijeko analizirani MALDI Biotyper-om

sirovo mlijeko



- Pouzdana identifikacija
- Vjerojatna identifikacija
- Nepouzdana identifikacija

konzervirano mlijeko

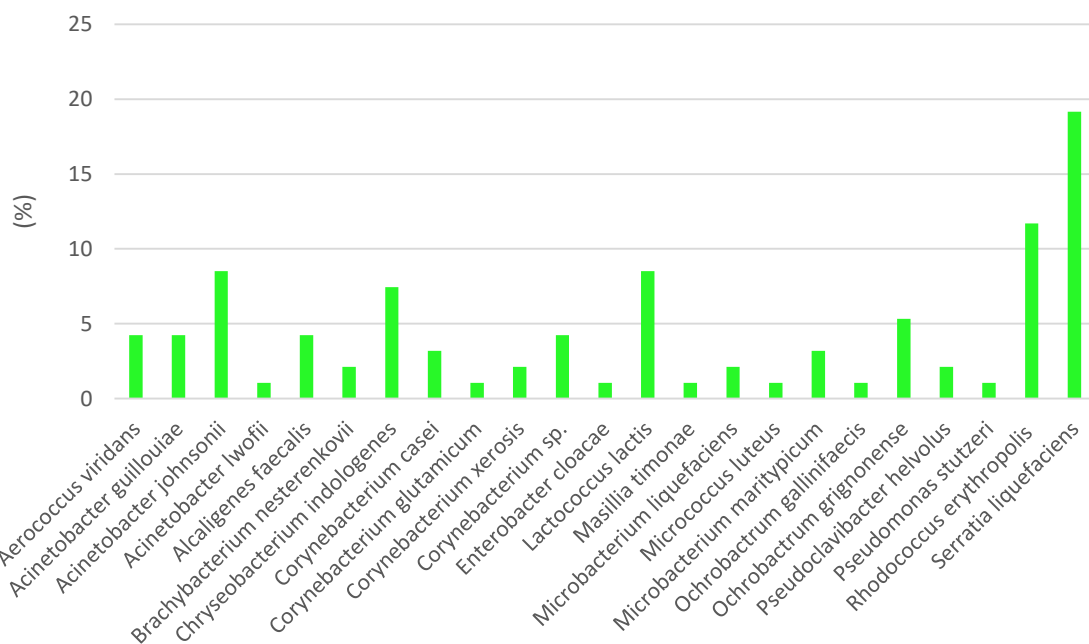


- Pouzdana identifikacija
- Vjerojatna identifikacija
- Nepouzdana identifikacija

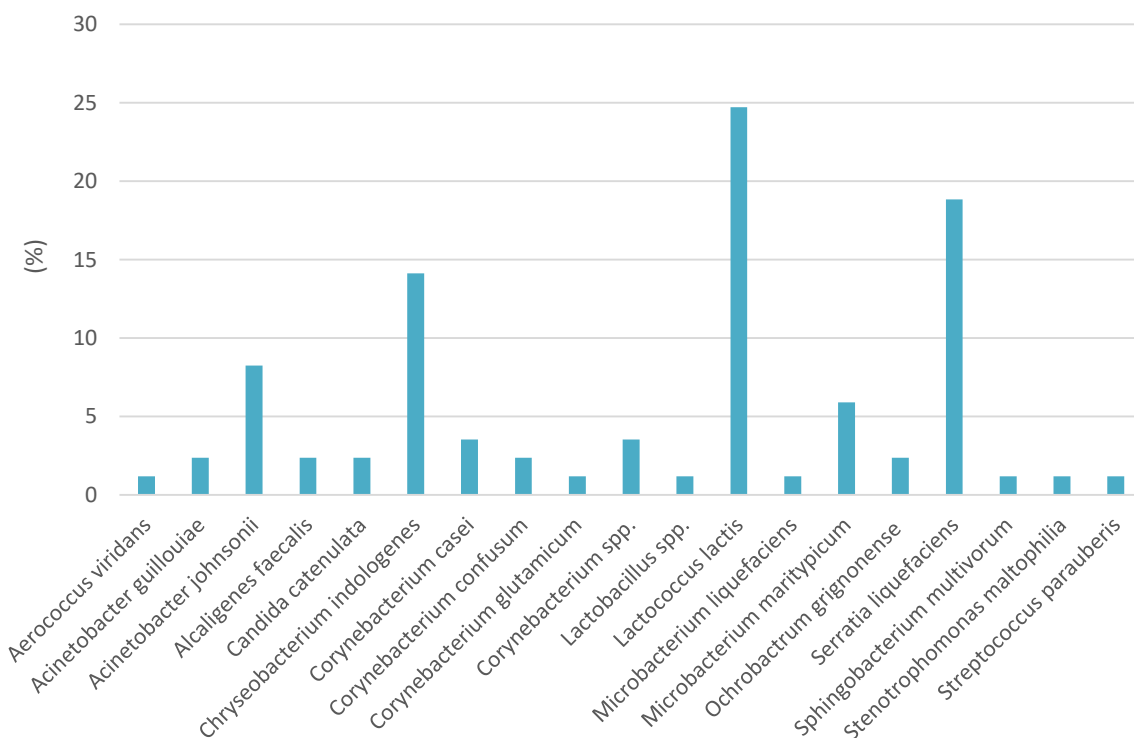
Grafikon 5.2.5. Rezultati identifikacije na razini vrste i roda za seriju uzoraka 3 - sirovo i konzervirano mlijeko analizirani MALDI Biotyper-om

U seriji uzoraka 1 – sirovo mlijeko ukupno je identificirano 93 kolonija od čega je 38 kolonija vjerojatno identificirano i 55 kolonija pouzdano identificirano. U istoj seriji uzoraka, ali u konzerviranom mlijeku ukupno je identificirano 85 kolonija od čega su 32 vjerojatno identificirane i 53 pouzdano identificirane.

Grafikoni 5.2.6. i 5.2.7. prikazuju zastupljenost bakterijskih vrsta i rodova u uzorcima sirovog i konzerviranog mlijeka za seriju uzoraka 1. Vidljiva je razlika u zastupljenosti pojedinih vrsta bakterija u sirovom i konzerviranom mlijeku. U uzorcima sirovog mlijeka od ukupno identificirane 23 bakterijske vrste, najveći udio zauzima bakterija *Serratia liquefaciens* (19,15%). Sljedeća dominantna bakterijska vrsta je *Rhodococcus erythropolis* (11,70%), zatim *Lactococcus lactis* i *Acinetobacter johnsonii* (8,51%), slijede *Chryseobacterium indologenes* (7,45%), *Ochrobactrum grignonense* (5,32%) i *Acinetobacter guillouiae*, *Corynebacterium* spp., *Alcaligenes faecalis* i *Aerococcus viridans* sa zastupljenošću od 4,25%. Najmanju zastupljenost (< 2%) u seriji uzoraka 1 za sirovo mlijeko imaju bakterije *Acinetobacter lwofii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Ochrobactrum gallinifaecis*, *Pseudomonas stutzeri* i *Masillia timonae*. Kod serije uzoraka 1, ali za uzorke konzerviranog mlijeka ukupno je identificirano manji broj vrsta nego u sirovom mlijeku, njih 19. Najveći udio u konzerviranim uzorcima mlijeka iz ove serije uzoraka zauzima *Lactococcus lactis* (24,71%), slijedi *Serratia liquefaciens* (18,82%) i *Chryseobacterium indologenes* (14,12%) te *Acinetobacter johnsonii* (8,24%). Najmanji udio (< 2%) u konzerviranim uzorcima mlijeka imaju *Corynebacterium glutamicum*, *Sphingobacterium multivorum*, *Streptococcus parauberis*, *Microbacterium liquefaciens*, *Aerococcus viridans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, i *Lactobacillus* spp.



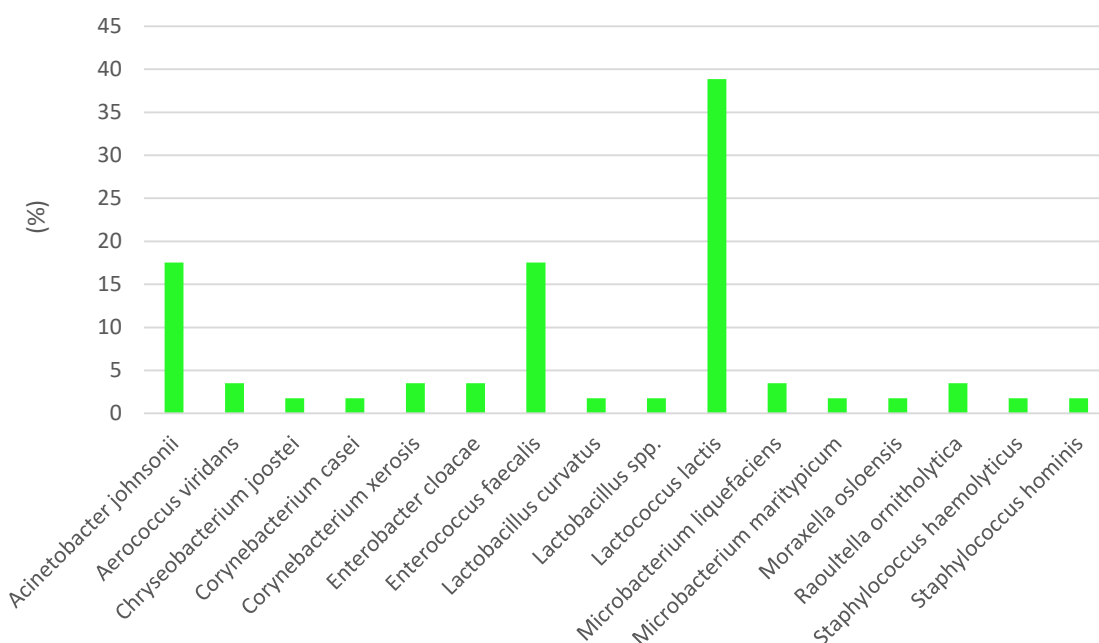
Grafikon 5.2.6. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 1 – sirovo mlijeko



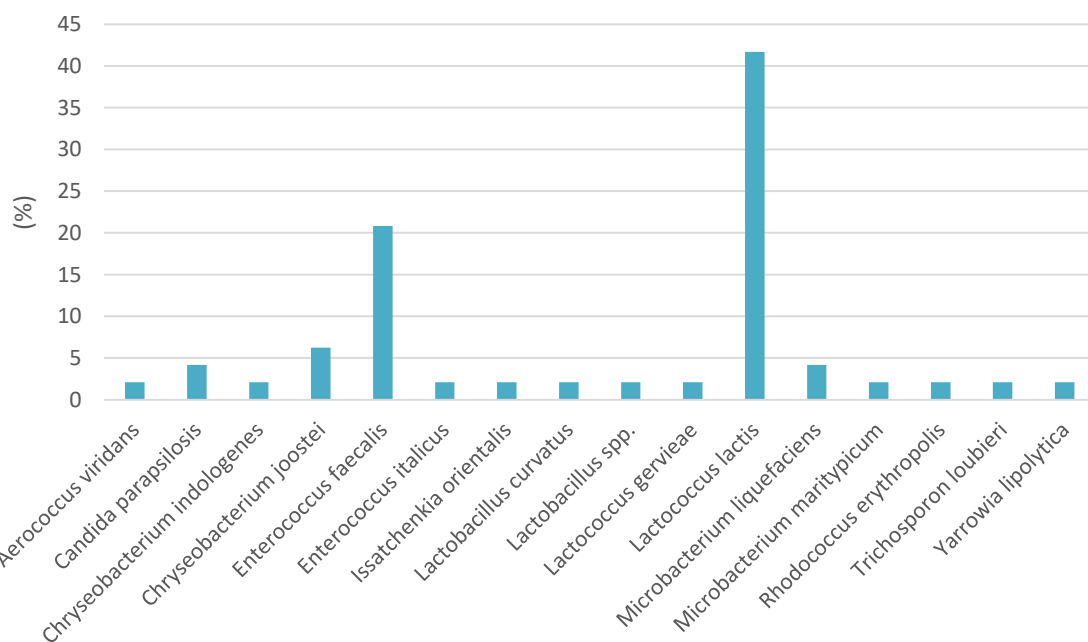
Grafikon 5.2.7. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 1 – konzervirano mlijeko

U seriji uzoraka 2 – sirovo mlijeko ukupno je identificirano 57 kolonija, od čega je 27 kolonija vjerojatno identificirano i 30 kolonija pouzdano identificirano. U istoj seriji uzoraka, ali u konzerviranom mlijeku ukupno je identificirano 48 kolonija, od čega su 22 vjerojatno

identificirane i 26 pouzdano identificirane. Grafikoni 5.2.8. i 5.2.9. prikazuju zastupljenost bakterijskih vrsta i rodova u uzorcima sirovog i konzerviranog mlijeka za seriju uzoraka 2. U uzorcima sirovog mlijeka ukupno je identificirano 16 bakterijskih vrsta i u konzerviranim uzorcima identificirano je 16 bakterijskih vrsta. U uzorcima sirovog mlijeka od ukupno identificiranih 16 bakterijskih vrsta, najveći udio zauzima bakterija *Lactococcus lactis* (33,37%). Na drugom mjestu su *Acinetobacter johnsonii* i *Enterococcus faecalis*(17,54%). Slijede je *Raoultella ornitholytica*, *Enterobacter cloacae* i *Corynebacterium xerosis*, *Microbacterium liquefaciens* i *Aerococcus viridans* (3,51%). Najmanju zastupljenost (< 3%) u seriji uzoraka 2 za sirovo mlijeko imaju *Chryseobacterium joostei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Corynebacterium casei*, *Moraxella osloensis* i *Microbacterium maritypicum*. Najveći udio u konzerviranim uzorcima mlijeka iz ove serije uzoraka zauzima *Lactococcus lactis* (41,67%), slijedi *Enterococcus faecalis* (20,83%). Slijedi *Chryseobacterium joostei* (6,25%). Najmanji udio (< 3%) u konzerviranim uzorcima mlijeka imaju *Yarowia lipolytica*, *Trichosporon loubieri*, *Aerococcus viridans*, *Lactococcus gerviae*, *Rhodococcus erythropolis*, *Microbacterium maritypicum* i *Enterococcus italicus*, *Lactobacillus curvatus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Issatchenka orientalis* i *Lactobacillus* spp.

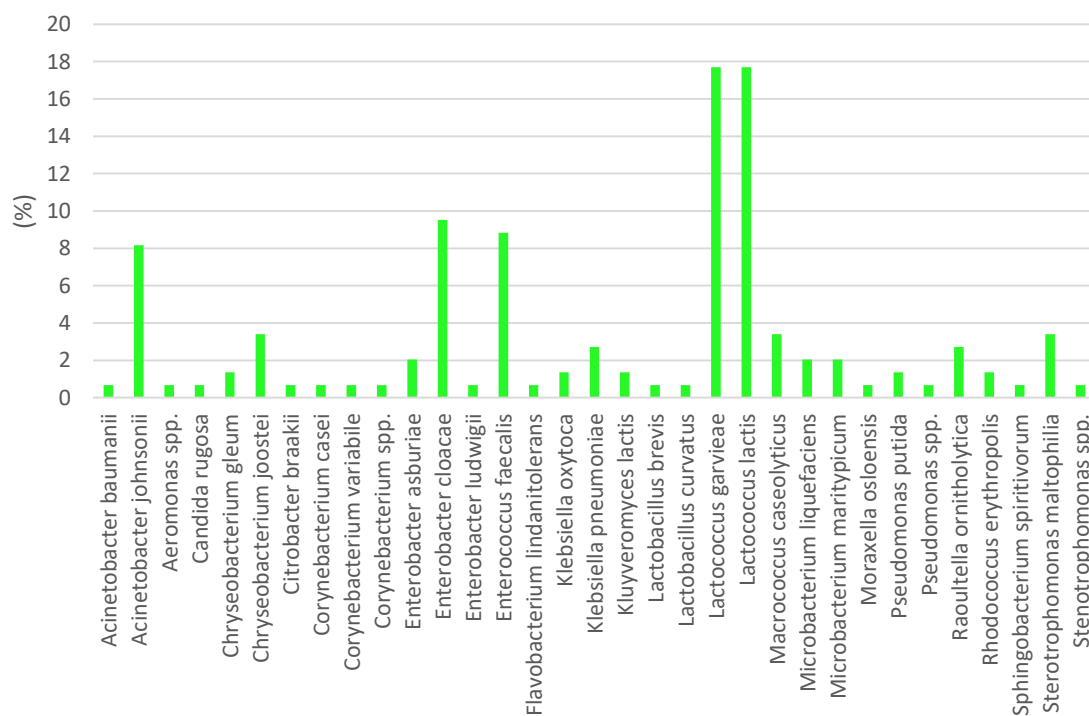


Grafikon 5.2.8. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 2 – sirovo mlijeko

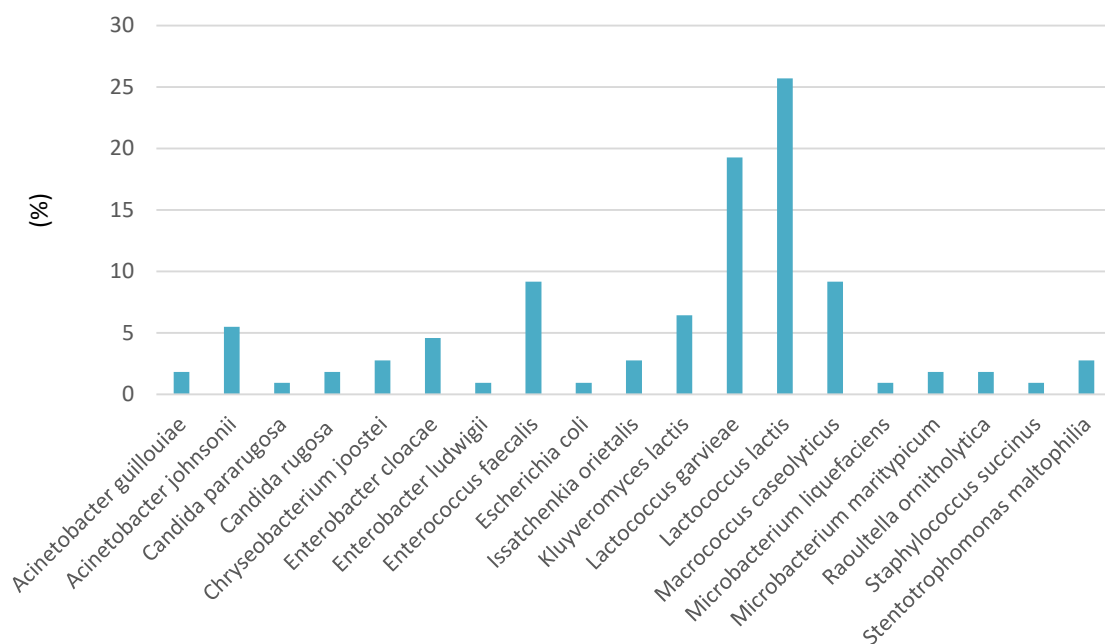


Grafikon 5.2.9. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 2 – konzervirano mlijeko

Grafikoni 5.2.10. i 5.2.11. prikazuju zastupljenost bakterijskih vrsta i rodova u uzorcima sirovog i konzerviranog mlijeka za seriju uzoraka 3. U uzorcima sirovog mlijeka od ukupno identificirane 33 bakterijske vrste, najveći udio zauzimaju *Lactococcus lactis* i *Lactococcus gerviae* (17,69%). Slijedi je *Enterobacter cloacae* (9,52%), zatim *Enterococcus faecalis* (8,84%) i *Acinetobacter johnsonii* (8,16%). Najmanju zastupljenost (< 1%) imaju *Sphingobacterium spiritivorum*, *Aeromonas spp.*, *Corynebacterium casei*, *Stenotrophomonas spp.*, *Lactobacillus brevis*, *Corynebacterium variabile*, *Citrobacter braakii* i ostale. U uzorcima konzerviranog mlijeka ove serije identificirano je 19 bakterijskih vrsta, najveći udio zauzima *Lactococcus lactis* (25,69%), slijedi *Lactococcus garvieae* (19,27%), *Enterococcus faecalis* i *Macroccoccus caseolyticus* (9,17%), *Kluyveromyces lactis* (6,42%) i *Acinetobacter johnsonii* (5,50%). Najmanju zastupljenost (<3%) imaju *Chryseobacterium joostei*, *Acinetobacter guillouiae*, *Staphylococcus succinus*, *Candida rugosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter ludwigii*, *Issatchenkia orientalis*, *Raoultella ornitholytica*, *Microbacterium maritypicum*, *Candida pararugosa*, *Microbacterium liquefaciens* i *Escherichia coli*.



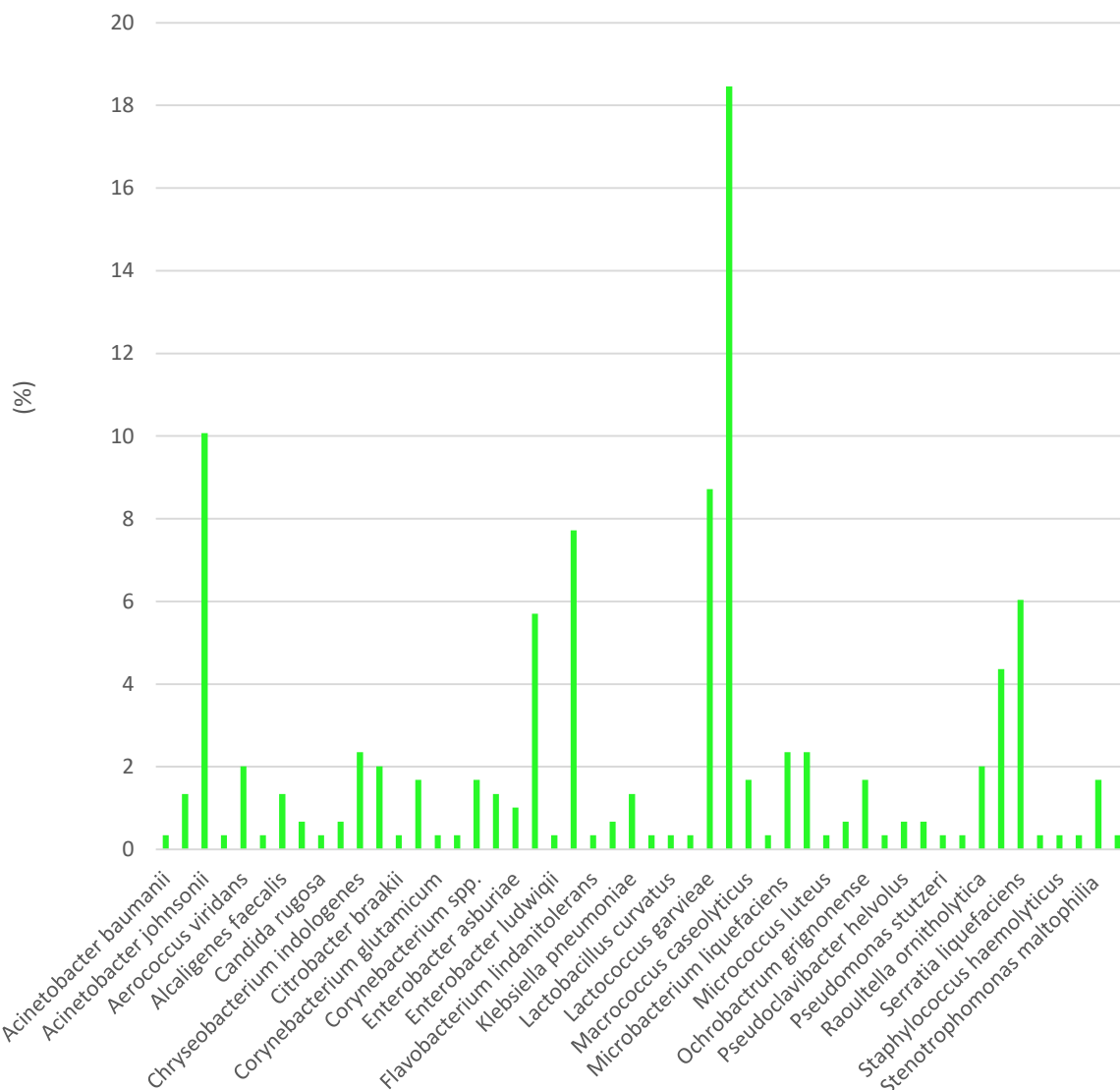
Grafikon 5.2.10. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 3 – sirovo mlijeko



Grafikon 5.2.11. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 3 – konzervirano mlijeko

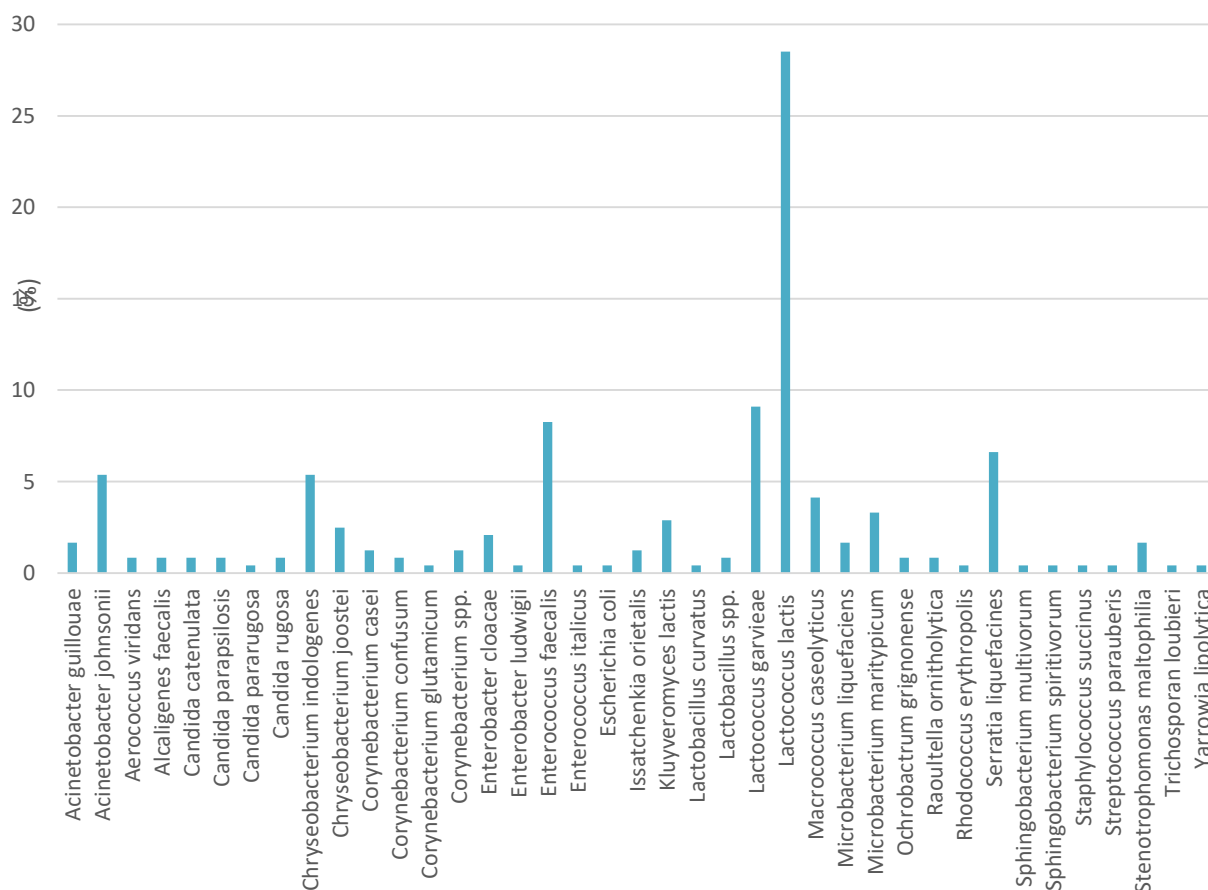
Grafikon 5.2.12. prikazuje zastupljenost pojedinih vrsta bakterija od ukupno 50 identificiranih bakterijskih vrsta u uzorcima sirovog mlijeka. Prema podacima u grafikonu 5.2.12., najzastupljenije bakterijske vrste u identifikaciji uzoraka sirovog mlijeka su *Lactococcus lactis* (18,46%), *Acinetobacter johnsonii* (10,07%), *Lactococcus garvieae* (8,72%),

Enterococcus faecalis (7,72%), *Serratia liquefaciens* (6,04%), *Enterobacter cloacae* (5,70%), *Rhodococcus erythropolis* (4,36%).



Grafikon 5.2.12. Rezultati identifikacije 50 bakterijskih vrsta iz serije uzoraka 1,2 i 3 – sirovo mlijeko

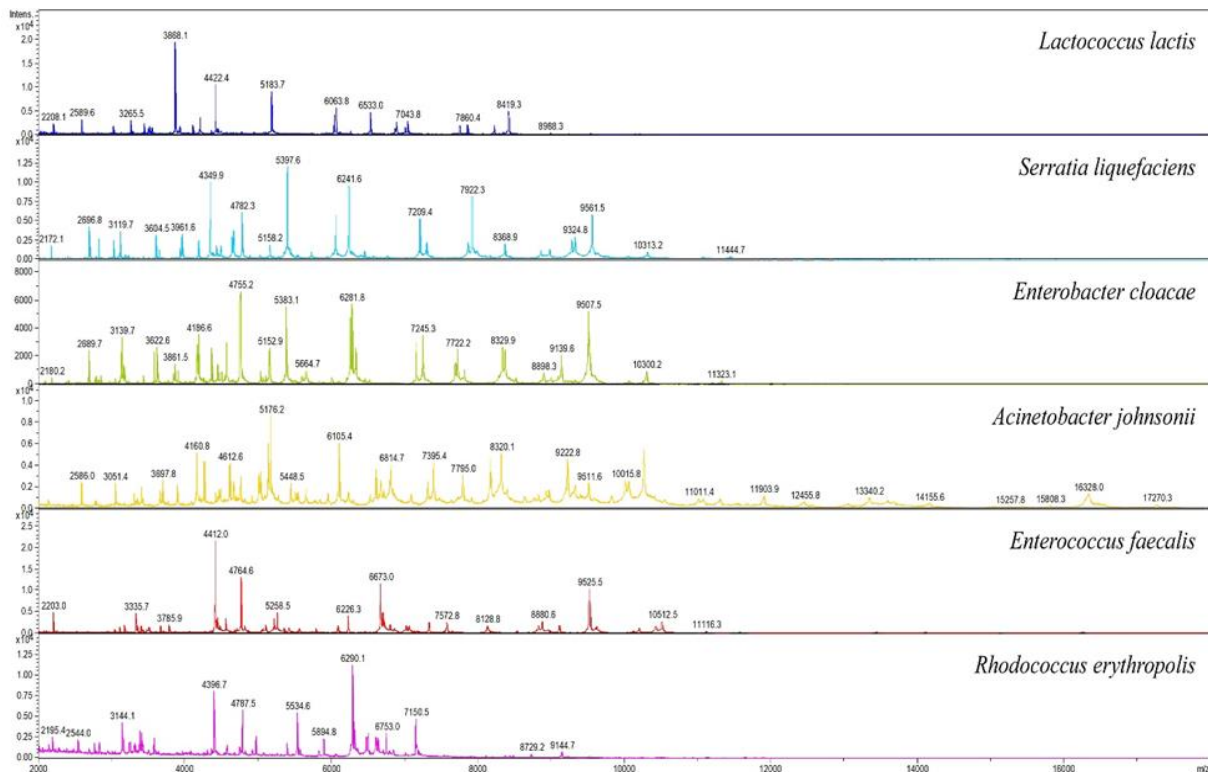
Grafikon 5.2.13. prikazuje zastupljenost pojedinih vrsta bakterija od ukupno 38 identificiranih bakterijskih vrsta u uzorcima konzerviranog mlijeka. Prema podacima prikazanim u grafikonu 5.2.13., najzastupljenije bakterijske vrste u identifikaciji uzoraka konzerviranog mlijeka su *Lactococcus lactis* (28,51%), slijede *Lactococcus garvieae* (9,09%), *Enterococcus faecalis* (8,26%), *Serratia liquefaciens* (6,61%). Zastupljenost od 5,37% imaju bakterije *Acinetobacter johnsonii* i *Chryseobacterium indologenes*.



Grafikon 5.2.13. Rezultati identifikacije 38 bakterijskih vrsta iz serije uzoraka 1,2 i 3 – konzervirano mlijeko

Slika 5.2.3. prikazuje referentne spektre za najčešće zastupljene bakterije u analiziranim uzorcima mlijeka. Prikazani pikovi svakog spektra predstavljaju jedinstveni

uzorak za svaku pojedinu bakteriju na temelju kojih MALDI Biotyper program obavlja identifikaciju.



Slika 5.2.3. Referentni spektri MALDI-TOF MS programa za najčešće identificirane vrste bakterija u uzrocima mlijeka
(Izvor: Kazazić S., 2020)

Sukladno navodima Upadhyay i sur. (2014.) u mlijeku konzerviranim s azidiolom došlo je do smanjenja broja koliformnih bakterija. U konzerviranim uzorcima nije pronađena vrsta *Enterobacter asburiae*, a *Enterobacter cloacae* je u uzorcima sirovog mlijeka pronađena u postotku od 5,70% dok je u konzerviranim uzorcima pronađena u nešto manjem postotku - 2,07%. U uzorcima sirovog mlijeka pronađene su 2 bakterijske vrste iz roda *Klebsiella* koji pripada skupini koliformnih bakterija (*K. oxytoca* i *K. pneumoniae*), a u konzerviranim uzorcima nisu pronađene. Upadhyay i sur. (2014.) također navode kako su stafilocoki osjetljiviji na natrijev azid prisutan u azidiolu. Nakon korištenja azidiola, u konzerviranim uzorcima nisu pronađene vrste *Staphylococcus haemolyticus* i *Staphylococcus hominis*.

Iz rezultata je vidljivo da se mikrobna populacija razlikuje s obzirom da li se koristio konzervans ili nije, što nije sukladno navodima Zangerl i sur. (1992.), ali je uočen i trend smanjenja početnog broja bakterija. Kako bi se normalizirale vrijednosti, obično se rezultati u mikrobiologiji logaritmiraju da bi se moglo nešto zaključivati. Proučavane su apsolutne vrijednosti bez logitmiranja pa su te razlike prividno veće.

Prema navodima Nacefab i sur. (2016) pomoću MALDI-TOF tehnike uspješno je identificirano 197 kolonija bakterija mliječne kiseline iz sira proizvedenog od sirovog i pasteriziranog mlijeka. Identificirane su 4 vrste roda *Lactobacillus* s kore sira – *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. fructivorans* i *L. brevis*. Iz tijesta sira uspješno je identificirano 120 kolonija gdje su identificirana 3 roda bakterija mliječne kiseline – *Leuconostoc*, *Enterococcus* i 5 vrsta roda *Lactobacillus*. Autori navode kako su pomoću MALDI-TOF tehnike uspješno identificirali, s visokom pouzdanošću različite vrste bakterija mliječne kiseline što se podudara i s rezultatima iz grafikona 5.2.12. gdje su iz uzoraka sirovog mlijeka uspješno identificirana 3 roda iz skupine bakterija mliječne kiseline, uključujući rodove *Lactobacillus* (*L. brevis* i *L. curvatus*), *Lactococcus* (*L. lactis* i *L. garvieae*) i *Enterococcus* (*E. faecalis*). Velika povezanost identifikacije utemeljene na 16S rDNA provedene na odabranim sojevima i one dobivene MALDI-TOF MS-om pokazala je da ova brza, ekonomski pristupačna i pouzdana metoda za identifikaciju bakterija stoji kao atraktivna alternativa uobičajenim metodama za identifikaciju mikroorganizama.

Wieser i sur. (2011.) navode kako su nedavne studije pokazale kako se MALDI-TOF tehnika može uspješno koristiti u svrhu identifikacije bakterija, kvasaca i plijesni. Studija u kojoj je analizirano 1116 uzoraka u kojoj se uspoređivala identifikacija MALDI-TOF MS-om i konvencionalna biokemijska ispitivanja pokazala su točnu identifikaciju bakterija u 95,2% slučajeva. U sličnoj studiji provedenoj na 1660 bakterijskih izolata sa 109 različitih vrsta, 84,1% je točno identificirano MALDI-TOF tehnikom na razini vrste. Tada je nepotpuna biblioteka mikroorganizama bila glavni razlog neuspješne identifikacije uzoraka. Studije provjere valjanosti sustava BrukerDaltonik (Bremen, Njemačka) MALDI-TOF MS također su potvrdile valjanost sustava. Rezultati spektrometrije masa uspoređivani su s rezultatima postignutim biokemijskim sustavima za identifikaciju (Phoenix, Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka; i API, bioMérieux, Nürtingen, Njemačka). U slučaju odstupanja, provedeno je sekvencioniranje 16S-rDNA/28S-rDNA. Od 1200 analiziranih uzoraka, 93,5% identifikacija bilo je u skladu s rezultatima postignutim biokemijskim metodama. Izolati su obuhvaćali 370 enterobakterija, 300 nefermentirajućih bakterija, 110 Gram-negativnih bakterija, 320 Gram-positivnih bakterija i 100 kvasaca. Kada su sekvence 16S-rDNA korištene kao standard, biokemijska diferencijacija bila je superiorna u 3% slučajeva dok je MALDI-TOF MS identifikacija rezultirala s 3,5%. U većini slučajeva kada MS MALDI-TOF nije dao rezultat, relevantne informacije o vrstama izostajale su iz baze podataka što je i bio razlog izostajanja rezultata identifikacije. Rezultati prikazani u grafikonima 5.2.3, 5.2.4. i 5.2.5. pokazuju da je MALDI-TOF tehnika bila uspješna u prosječno 75,95% slučajeva prilikom identifikacije kolonija iz uzoraka sirovog mlijeka i u 75,36% slučajeva prilikom identifikacije kolonija iz uzoraka konzerviranog mlijeka. Uzrok nepouzdanosti identifikaciji također je u većini slučajeva bio izostanak podatka o bakteriji u biblioteci mikroorganizama.

Dobranić i sur. (2016.) proveli su istraživanje u kojoj je analiziran mikrobiološki sastav sirovog kravljeg mlijeka s naglaskom na oportunističke patogene enterokoka. Klasičnom metodom utvrđen je ukupan broj bakterija, broj psihrotrofnih bakterija, broj BMK, stafilokoka, *E.coli*, enterokoka, enterobakterija, *Listeria* spp. i sulfitoreducirajućih bakterija.

Uzorci mlijeka uzimani su iz vimena zdravih krava i vimena krava koje su liječene zbog mastitisa. Kolonije enterokoka su nasumično odabrane sa selektivne hranjive podloge te su podvrgnute fenotipskoj identifikaciji pomoću API 20 Strep, a potom MALDI-TOF spektrometrijom masa. Statistički značajne razlike utvrđene su, s obzirom na zdravstveno stanje vimena kod određivanja ukupnog broja bakterija i bakterija mliječne kiseline. Rezultati identifikacije uzoraka *Enterococcus faecalis* pokazali su jednake rezultate kod primjene dviju navedenih metoda. Ova studija dokazala je da je MALDI-TOF tehnika pouzdana metoda za identifikaciju enterokoka iz sirovog mlijeka. U grafikonu 5.2.12. prikazane su sve identificirane bakterijske vrste iz sirovog mlijeka gdje je jedna od prevladavajućih bakterijskih vrsta upravo *Enterococcus faecalis*, što potvrđuje da je MALDI-TOF tehnika pouzdana za identifikaciju ove vrste iz sirovog mlijeka.

6. Zaključak

- MALDI-TOF spektrometrijom masa moguće je identificirati bakterije na razini vrste i roda i dobiti bolji uvid u higijensku kvalitetu mlijeka i prisutnost pojedinih bakterijskih vrsta.
- Korištenjem konzervansa azidiola, koji je danas sveprisutan u mljekarskoj analitici kao bakteriostatski konzervans utvrđen je trend smanjenja broja aerobno mezofilnih bakterija. Zbog relativno malog broja uzoraka nije provedena logaritamska transformacija broja aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku, kako bi se izračunala da li je razlika bila statistički značajna ili ne.
- Utvrđen je slijedeći utjecaj konzervansa na zastupljenost pojedinih bakterijskih vrsta u sirovom i konzerviranom mlijeku: bakterijske vrste koje su prevladavale u uzorcima sirovog mlijeka su *Lactococcus lactis* (18,46%), *Acinetobacter johnsonii* (10,07%), *Lactococcus garvieae* (8,72%), *Enterococcus faecalis* (7,72%), *Serratia liquefaciens* (6,04%), *Enterobacter cloacae* (5,70%), *Rhodococcus erythropolis* (4,36%) dok su u uzorcima konzerviranog mlijeka prevladavale: *Lactococcus lactis* (28,51%), *Lactococcus garvieae* (9,09%), *Enterococcus faecalis* (8,26%) i *Serratia liquefaciens* (6,61%). Isto tako, u uzorcima konzerviranog mlijeka nije pronađeno 16 bakterijskih vrsta koje su prethodno pronađene u uzorcima sirovog mlijeka, a to su: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Iwofii*, *Brachybacterium nesterenkovii*, *Chryseobacterium gleum*, *Corynebacterium xerosis*, *Enterobacter asburiae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Masillia timonae*, *Moraxella osloensis*, *Ochrobactrum gallinifacis*, *Pseudoclavibacter helvolus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus haemolyticus* i *Staphylococcus hominis*.
- MALDI-TOF tehnikom u sirovom mlijeku identificirano je 29 rodova i 45 bakterijskih vrsta, a u konzerviranom mlijeku 25 rodova i 36 bakterijskih vrsta.
- U kombinaciji s metodom protočne citometrije, MALDI-TOF tehnika daje potpuniji uvid u mikrobiološki sastav sirovog i konzerviranog mlijeka jer uz broj bakterija dobivamo informaciju o zastupljenosti određenih bakterijskih vrsta u uzorcima mlijeka.

7. Popis literature

1. Antunac N., Havranek J., (2013). Mlijeko. Kemija, fizika i mikrobiologija. Sveučilišni udžbenik u e-izdanju. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet. Zagreb.
2. Antunac N., Mikulec N., Zamberlin Š., Škevin Sović J., Blažek A., Horvat I. (2010). Influence of various methods of milk sample preserving on the number of somatic cells. *Mljekarstvo*. 65(3): 313-316.
3. Betts G. (2006). Other spoilage bacteria. U: *Food Spoilage Microorganisms* (C. de W. Blackburn, ur.) Padstow, Cornwall, England. 668–693.
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(4): 581-590.
5. Friman M.J., Eklund M.H., Pitkälä A.H., Päivi J.R.S., Merja H.J.R.(2019). Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 61: 54.
6. HAPIH (2020). Godišnje izvješće za 2019. godinu, Kontrola kvalitete stočarskih proizvoda.
7. Herrera A.G. (2001). Mesophilic Aerobic Microorganisms. U: Spencer J.F.T., de Ragout Spencer A.L.. *Food Microbiology Protocols. Methods in Biotechnology*, vol 14. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:25>
8. HRN EN ISO (2013). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za
9. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. (78): 53-68.
10. Luana M. Perin., Juliano G. Pereira., Luciano S. Bersot., Luís A. Nero. (2019). Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits. *Microbiology of raw milk*. London, United Kingdom, San Diego, CA, United States. 45-64.
11. Nacefab M., Chevalierb M., Cholleta S., Driderb D., Flahaut C. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology*. 247: 2-8.
12. određivanje broja mikroorganizama – 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30°C
12. Pravilnik o utvrđivanju sastava svježeg sirovog mlijeka (2017). Narodne novine, Broj 27.
13. Saad B. Almasaudi. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25(3): 586–596.
14. Samaržija D. (2015). Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

15. Samaržija D. (2018). Mljekarska mikrobiologija - Opća svojstva bakterija, kvasaca, plijesni i virusa s osnovama taksonomije. Interna skripta. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
16. Samaržija D., Antunac N., Pogačić T., Sikora S. (2004). Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije. *Mljekarstvo*. 54(1): 39-51.
17. Seifert H., Dijkshoorn L., Gerner-Smidt P., Pelzer N., Tjernberg I., Vaneechoutte M. (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal Of Clinical Microbiology*. 35(11): 2819–2825.
18. Sierra D., Sánchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J. C. de la Fe C., Guirao I., Morales C.T., Gonzalo C. (2009). Short communication: Effect of storage and preservation on total bacterial counts determined by automated flow cytometry in bulk tank goat milk. *Journal of Dairy Science*. 92(10): 4841-4845.
19. Singh P., Gandhi N. (2015). Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. *Food Reviews International*. 31(3): 236–261.
20. Singhal N., Kumar M., Kanaujia Pawan K., Viridi Jugsharan S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 16(6): 1-4.
tehnikom zalijeivanja podloge. Broj 4833-1. Hrvatski zavod za norme, Zagreb.
21. Tratnik Lj. (1998). Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 13-19.
22. Upadhyay N., Goyal A., Kumar A., Ghai D. L. Singh R. (2014). Preservation of Milk and Milk Products for Analytical Purposes. *Food Reviews International*. 30(3): 203–224.
23. Weisglass H. (1983). Bakterije i bolesti čovjeka. Školska knjiga, Zagreb.
24. Wieser A., Schneider L., Jung J., Schubert S. (2011). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics — identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(3): 965–974.
25. Zajác P., Zubrická S., Čapla J., Zeleňáková L., Židek R., Čurlej J. (2016). Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, 61 (2016): 239–244.
26. Zangerl, P., Ginzinger, W., Kaereby, F. (1992). Unspecific increase in Bactoscan counts during the storage of milk samples. *Milchwissenschaft*, 47 (12):773-776.
27. http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html - pristupljeno 15.2.2020.
28. https://classconnection.s3.amazonaws.com/845/flashcards/4237845/png/screen_shot_2013-11-16_at_93054_am-14261532A1E483696F6.png – pristupljeno 20.03.2020.
29. <https://www.iitk.ac.in/che/pdf/resources/Flow-Cytometry-reading-material.pdf>.- pristupljeno 20.03.2020.
30. <https://www.fossanalytics.com/en/products/bactoscan> – pristupljeno 16.05.2020.

8. Prilog

Tablica MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 1 za sirovo i konzervirano mlijeko (K)

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E1(++) (A)	1 2	Acinetobacter lwoffii	2.148	Acinetobacter lwoffii	2.035
E2(++) (A)	1 3	Acinetobacter guillouiae	2.275	not reliable identification	1.562
E3(+) (B)	1 4	Ochrobactrum grignonense	1.873	not reliable identification	1.36
E4(+) (B)	1 5	Corynebacterium xerosis	1.839	not reliable identification	1.247
E6(+) (B)	1 7	Corynebacterium casei	1.925	not reliable identification	1.299
E7(-) (C)	1 8	Ochrobactrum gallinifacis	1.700	not reliable identification	1.133
E8(++) (A)	1 9	Acinetobacter johnsonii	2.126	Acinetobacter johnsonii	2.103
E9(-) (C)	1 10	Corynebacterium sp	1.700	not reliable identification	1.575
E10(+) (B)	1 11	Corynebacterium casei	1.913	not reliable identification	1.284
E11(-) (C)	1 12	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.542
E12(++) (A)	1 13	Rhodococcus erythropolis	2.006	Rhodococcus erythropolis	1.989
F1(+) (B)	1 14	Pseudoclavibacter helvolus	1.866	not reliable identification	1.225
F2(+++) (A)	1 15	Serratia liquefaciens	2.443	Serratia liquefaciens	2.348
F3(++)(A)	2 1	Pseudomonas stutzeri	2.043	Pseudomonas stutzeri	2.033
F4(++)(C)	2 2	Serratia liquefaciens	2.254	Serratia liquefaciens	2.206
F5(-) (C)	2 3	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.446
F6(-) (C)	2 4	not reliable identification	1.402	not reliable identification	1.222
F7(+++) (A)	2 5	Serratia liquefaciens	2.431	Serratia liquefaciens	2.367
F8(+++) (A)	2 6	Serratia liquefaciens	2.403	Serratia liquefaciens	2.379
F9(++)(A)	2 7	Serratia liquefaciens	2.232	Serratia liquefaciens	2.183
F10(+++) (B)	2 8	Serratia liquefaciens	2.456	Serratia liquefaciens	2.353
F11(-) (C)	2 9	not reliable identification	1.266	not reliable identification	1.231
F12(+) (B)	2 10	Ochrobactrum grignonense	1.708	not reliable identification	1.217
G1(+++) (A)	2 11	Serratia liquefaciens	2.366	Serratia liquefaciens	2.283
G2(-) (C)	2 12	Alcaligenes faecalis	1.700	not reliable identification	1.6
G3(-) (C)	2 13	not reliable identification	1.416	not reliable identification	1.345
G4(+) (B)	3 1	Massilia timonae	1.909	not reliable identification	1.497
G1(+++) (A)	2 11	Serratia liquefaciens	2.366	Serratia liquefaciens	2.283
G5(++)(A)	3 2	Acinetobacter johnsonii	2.145	Acinetobacter johnsonii	2.022
G6(++)(A)	3 3	Serratia liquefaciens	2.17	Serratia liquefaciens	2.131
G7(+) (B)	3 4	Corynebacterium sp	1.75	not reliable identification	1.68
G8(++)(A)	3 5	Corynebacterium glutamicum	2.285	Corynebacterium glutamicum	2.271
G9(+++) (B)	3 6	Serratia liquefaciens	2.438	Serratia liquefaciens	2.434
G10(+) (B)	3 7	Corynebacterium sp	1.794	Corynebacterium sp	1.756
G11(-) (C)	3 8	not reliable identification	1.326	not reliable identification	1.289
G12(+) (B)	3 9	Acinetobacter guillouiae	1.829	not reliable identification	1.325
H1(-) (C)	3 10	not reliable identification	1.49	not reliable identification	1.232
H2(++)(A)	3 11	Rhodococcus erythropolis	2.042	Rhodococcus erythropolis	1.922
H3(-) (C)	4 1	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.236
H4(+++) (A)	4 2	Serratia liquefaciens	2.336	Serratia liquefaciens	2.25
H5(+) (B)	4 3	Aerococcus viridans	1.791	not reliable identification	1.694
H6(+) (B)	4 4	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.933
H7(+) (B)	4 5	Lactococcus lactis	1.912	not reliable identification	1.633
H8(-) (C)	4 6	not reliable identification	1.225	not reliable identification	1.195

H9(++) (A)	4 7	Corynebacterium sp	2.114	Corynebacterium sp	1.906
H10(-) (C)	4 8	not reliable identification	1.482	not reliable identification	1.228
H11(+) (B)	4 9	Alcaligenes faecalis	1.768	not reliable identification	1.649
H12(++) (B)	4 10	Microbacterium liquefaciens	2.133	Microbacterium maritypicum	2.07
A1(+) (B)	4 11	Pseudoclavibacter helvolus	1.738	not reliable identification	1.215
A2(-) (C)	4 12	not reliable identification	1.612	not reliable identification	1.424
A3(-) (C)	4 13	not reliable identification	1.291	not reliable identification	1.249
A4(++) (A)	4 14	Rhodococcus erythropolis	2.104	Rhodococcus erythropolis	2.088
A5(+++) (A)	5 1	Lactococcus lactis	2.366	Lactococcus lactis	2.361
A6(+) (B)	5 2	Ochrobactrum grignonense	1.783	not reliable identification	1.139
A7(++) (A)	5 3	Acinetobacter johnsonii	2.19	Acinetobacter johnsonii	2.104
A8(++) (A)	5 4	Rhodococcus erythropolis	2.103	Rhodococcus erythropolis	2.029
A9(++) (A)	5 5	Microbacterium maritypicum	2.064	Microbacterium oxydans	1.903
A10(+) (B)	5 6	Rhodococcus erythropolis	1.911	Rhodococcus erythropolis	1.857
A11(-) (C)	5 7	not reliable identification	1.414	not reliable identification	1.289
A12(+) (B)	5 8	Ochrobactrum grignonense	1.727	not reliable identification	1.141
B1(++) (A)	5 9	Corynebacterium casei	2.02	not reliable identification	1.51
B3(+) (B)	5 11	Corynebacterium xerosis	1.795	not reliable identification	1.409
B4(+) (B)	5 12	Alcaligenes faecalis	1.747	not reliable identification	1.476
B5(-) (C)	6 1	not reliable identification	1.343	not reliable identification	1.282
B6(+) (B)	6 2	Rhodococcus erythropolis	1.701	not reliable identification	1.651
B7(++) (A)	6 3	Lactococcus lactis	2.238	Lactococcus lactis	2.158
B8(+) (B)	6 4	Microbacterium liquefaciens	2.000	Microbacterium maritypicum	1.85
B9(-) (C)	6 5	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.422
B10(++) (A)	6 6	Micrococcus luteus	2.177	Micrococcus luteus	2.111
B11(++) (B)	6 7	Microbacterium maritypicum	2.229	Microbacterium liquefaciens	2.11
C1(+) (B)	6 9	Rhodococcus erythropolis	1.911	Rhodococcus erythropolis	1.89
C2(++) (A)	6 10	Lactococcus lactis	2.259	Lactococcus lactis	2.198
C3(-) (C)	6 11	not reliable identification	1.641	not reliable identification	1.397
C4(++) (A)	6 12	Lactococcus lactis	2.195	Lactococcus lactis	2.081
C5(-) (C)	6 13	Rhodococcus erythropolis	1.700	not reliable identification	1.642
C6(-) (C)	6 14	not reliable identification	1.269	not reliable identification	1.211
C7(++) (A)	7 1	Enterobacter cloacae	2.285	Enterobacter cloacae	2.154
C8(++) (A)	7 2	Serratia liquefaciens	2.078	Serratia liquefaciens	2.069
C9(-) (C)	7 3	not reliable identification	1.153	not reliable identification	1.133
C10(+++) (A)	7 4	Serratia liquefaciens	2.368	Serratia liquefaciens	2.364
C11(-) (C)	7 5	not reliable identification	1.521	not reliable identification	1.36
C12(-) (C)	7 6	not reliable identification	1.277	not reliable identification	1.256
D2(++) (A)	7 8	Aerococcus viridans	2.135	Aerococcus viridans	1.97
D4(+) (B)	7 10	Chryseobacterium indologenes	1.758	not reliable identification	1.51
D6(+++) (A)	7 12	Lactococcus lactis	2.324	Lactococcus lactis	2.307
D7(+) (B)	7 13	Rhodococcus erythropolis	1.918	Rhodococcus erythropolis	1.783
D8(+) (B)	8 1	Brachybacterium nesterenkovi	1.768	not reliable identification	1.695
D9(-) (C)	8 2	not reliable identification	1.4	not reliable identification	1.281
D11(-) (C)	8 4	not reliable identification	1.615	not reliable identification	1.446
D12(++) (A)	8 5	Acinetobacter guillouiae	2.181	not reliable identification	1.607
E1(-) (C)	8 6	not reliable identification	1.603	not reliable identification	1.509
E2(-) (C)	8 7	not reliable identification	1.37	not reliable identification	1.365
E4(+) (B)	8 9	Rhodococcus erythropolis	1.894	Rhodococcus erythropolis	1.822
E6(-) (C)	8 11	not reliable identification	1.276	not reliable identification	1.173
E7(-) (C)	8 12	Ochrobactrum grignonense	1.700	not reliable identification	1.163
E8(+) (B)	8 13	Brachybacterium nesterenkovi	1.752	not reliable identification	1.612

E11(-)(C)	8 16	not reliable identification	1.27	not reliable identification	1.27
E12(-)(C)	8 17	Alcaligenes faecalis	1.700	not reliable identification	1.593
F1(++)(B)	8 18	Microbacterium maritypicum	2.2	Microbacterium liquefaciens	2.189
F2(++)(A)	8 19	Rhodococcus erythropolis	2.11	Rhodococcus erythropolis	2.1
F3(-)(C)	8 20	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.545
F5(++)(A)	9 2	Acinetobacter johnsonii	2.089	Acinetobacter johnsonii	2.034
F6(++)(A)	9 3	Lactococcus lactis	2.173	Lactococcus lactis	2.042
F7(+++)(A)	9 4	Serratia liquefaciens	2.308	Serratia liquefaciens	2.289
F8(++)(A)	9 5	Serratia liquefaciens	2.265	Serratia liquefaciens	2.207
F9(++)(A)	9 6	Serratia liquefaciens	2.098	Serratia liquefaciens	2.007
F10(+++)(A)	9 7	Acinetobacter johnsonii	2.374	Acinetobacter johnsonii	2.31
F12(-)(C)	9 9	not reliable identification	1.617	not reliable identification	1.526
G1(-)(C)	9 10	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.461
G2(-)(C)	9 11	not reliable identification	1.522	not reliable identification	1.372
G4(++)(A)	9 13	Lactococcus lactis	2.112	Lactococcus lactis	2.001
G5(++)(A)	10 1	Acinetobacter guillouiae	2.184	not reliable identification	1.448
G6(+++)(B)	10 2	Serratia liquefaciens	2.441	Serratia liquefaciens	2.428
G7(++)(A)	10 3	Serratia liquefaciens	2.286	Serratia liquefaciens	2.242
G8(++)(A)	10 4	Aerococcus viridans	2.008	Aerococcus viridans	1.865
G9(-)(C)	10 5	not reliable identification	1.552	not reliable identification	1.474
G10(++)(A)	10 6	Acinetobacter johnsonii	2.035	Acinetobacter johnsonii	2.016
G11(-)(C)	10 7	not reliable identification	1.345	not reliable identification	1.32
G12(-)(C)	10 8	not reliable identification	1.383	not reliable identification	1.318
H1(+)(B)	10 9	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.816
H5(+)(B)	10 13	Aerococcus viridans	1.709	not reliable identification	1.584
H6(-)(C)	10 14	not reliable identification	1.213	not reliable identification	1.158
H7(-)(C)	10 15	not reliable identification	1.505	not reliable identification	1.467
H8(++)(A)	10 16	Serratia liquefaciens	2.247	Serratia liquefaciens	2.071
H9(-)(C)	10 17	not reliable identification	1.274	not reliable identification	1.233
H10(-)(C)	10 18	not reliable identification	1.472	not reliable identification	1.45
A2(++)(A)	1 K 2	Lactococcus lactis	2.229	Lactococcus lactis	2.083
A4(++)(A)	1 K 4	Lactococcus lactis	2.248	Lactococcus lactis	2.202
A7(+++)(B)	1 K 7	Serratia liquefaciens	2.439	Serratia liquefaciens	2.416
A8(+++)(A)	1 K 8	Serratia liquefaciens	2.338	Serratia liquefaciens	2.307
A9(-)(C)	1 K 9	not reliable identification	1.584	not reliable identification	1.479
A10(+)(B)	1 K 10	Corynebacterium casei	1.959	not reliable identification	1.171
A11(-)(C)	1 K 11	not reliable identification	1.371	not reliable identification	1.359
A12(-)(C)	1 K 12	not reliable identification	1.423	not reliable identification	1.406
B1(+++)(A)	1 K 13	Serratia liquefaciens	2.421	Serratia liquefaciens	2.402
B2(-)(C)	1 K 14	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.542
B5(-)(C)	2 K 3	not reliable identification	1.436	not reliable identification	1.342
B6(-)(C)	2 K 4	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.435
B7(+++)(A)	2 K 5	Corynebacterium glutamicum	2.419	Corynebacterium glutamicum	2.396
B9(++)(A)	2 K 7	Serratia liquefaciens	2.193	Serratia liquefaciens	2.153
B10(++)(A)	2 K 8	Acinetobacter johnsonii	2.045	Acinetobacter johnsonii	1.962
B11(-)(C)	2 K 9	Corynebacterium sp	1.794	not reliable identification	1.697
C2(-)(C)	2 K 12	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.569
C3(+)(B)	2 K 13	Ochrobactrum grignonense	1.809	not reliable identification	1.29
C4(+)(B)	2 K 14	Sphingobacterium multivorum	1.795	not reliable identification	1.601
C7(+++)(A)	3 K 2	Acinetobacter johnsonii	2.300	Acinetobacter johnsonii	2.135
C8(-)(C)	3 K 3	not reliable identification	1.18	not reliable identification	0.967
C9(+)(B)	3 K 4	Corynebacterium sp	1.907	Corynebacterium sp	1.852

C11(++) (A)	3 K 6	Serratia liquefaciens	2.257	Serratia liquefaciens	2.246
D1(++) (A)	3 K 8	Lactococcus lactis	2.224	Lactococcus lactis	2.202
D2(-) (C)	3 K 9	Corynebacterium casei	1.873	not reliable identification	1.441
D3(-) (C)	3 K 10	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.459
D4(-) (C)	3 K 11	not reliable identification	1.466	not reliable identification	1.36
D5(++) (A)	3 K 12	Microbacterium maritypicum	2.145	Microbacterium liquefaciens	1.982
D6(++) (A)	3 K 13	Lactococcus lactis	2.186	Lactococcus lactis	2.117
D8(-) (C)	4 K 1	not reliable identification	1.519	not reliable identification	1.426
D10(-) (C)	4 K 3	Alcaligenes faecalis	1.700	not reliable identification	1.618
D11(-) (C)	4 K 4	not reliable identification	1.472	not reliable identification	1.439
D12(++) (A)	4 K 5	Streptococcus parauberis	2.146	Streptococcus parauberis	1.959
E2(++) (A)	4 K 7	Lactococcus lactis	2.224	Lactococcus lactis	2.192
E3(-) (C)	4 K 8	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.493
E4(++) (A)	4 K 9	Lactococcus lactis	2.235	Lactococcus lactis	2.231
E5(-) (C)	4 K 10	Candida catenulate	1.700	not reliable identification	1.55
E6(++) (A)	4 K 11	Lactococcus lactis	2.221	Lactococcus lactis	2.205
E7(++) (A)	4 K 12	Lactococcus lactis	2.332	Lactococcus lactis	2.322
E8(-) (C)	4 K 13	not reliable identification	1.347	not reliable identification	1.078
E11(++) (A)	5 K 1	Serratia liquefaciens	2.246	Serratia liquefaciens	2.21
F2(++) (A)	5 K 4	Lactococcus lactis	2.299	Lactococcus lactis	2.213
F3(-) (C)	5 K 5	not reliable identification	1.504	not reliable identification	1.36
F4(-) (C)	5 K 6	Corynebacterium confusum	1.747	not reliable identification	1.459
F5(++) (A)	5 K 7	Acinetobacter johnsonii	2.269	Acinetobacter johnsonii	2.268
F6(-) (C)	5 K 8	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.606
F7(+) (B)	5 K 9	Serratia liquefaciens	1.992	Serratia liquefaciens	1.99
F8(+) (B)	5 K 10	Corynebacterium casei	1.896	not reliable identification	1.294
F9(-) (C)	5 K 11	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.606
F10(++) (A)	5 K 12	Acinetobacter guillouiae	2.183	not reliable identification	1.69
F11(+++) (A)	5 K 13	Acinetobacter johnsonii	2.415	Acinetobacter johnsonii	2.41
G1(+) (B)	5 K 15	Chryseobacterium indologenes	1.719	not reliable identification	1.643
G2(+++) (B)	6 K 1	Serratia liquefaciens	2.476	Serratia liquefaciens	2.47
G3(-) (C)	6 K 2	not reliable identification	1.378	not reliable identification	1.318
G4(++) (B)	6 K 3	Microbacterium liquefaciens	2.102	Microbacterium maritypicum	2.071
G5(++) (A)	6 K 4	Lactococcus lactis	2.278	Lactococcus lactis	2.254
G7(++) (B)	6 K 6	Microbacterium maritypicum	2.262	Microbacterium liquefaciens	2.036
G8(-) (C)	6 K 7	not reliable identification	1.185	not reliable identification	1.166
G9(++) (A)	6 K 8	Lactococcus lactis	2.282	Lactococcus lactis	2.23
G10(-) (C)	6 K 9	not reliable identification	1.378	not reliable identification	1.054
G11(-) (C)	6 K 10	not reliable identification	1.211	not reliable identification	1.094
G12(+) (B)	6 K 11	Microbacterium maritypicum	1.899	Microbacterium liquefaciens	1.865
H1(++) (B)	6 K 12	Microbacterium maritypicum	2.108	Microbacterium liquefaciens	2.047
H2(-) (C)	6 K 13	not reliable identification	1.616	not reliable identification	1.509
H3(+) (B)	6 K 14	Chryseobacterium indologenes	1.705	not reliable identification	1.578
H4(++) (A)	6 K 15	Microbacterium maritypicum	2.117	Microbacterium liquefaciens	2.018
H5(+++) (A)	6 K 16	Lactococcus lactis	2.361	Lactococcus lactis	2.281
H7(+++) (A)	7 K 2	Serratia liquefaciens	2.358	Serratia liquefaciens	2.336
H8(++) (A)	7 K 3	Serratia liquefaciens	2.323	Serratia liquefaciens	2.265
H9(++) (A)	7 K 4	Lactococcus lactis	2.246	Lactococcus lactis	2.196
H11(-) (C)	7 K 6	not reliable identification	1.269	not reliable identification	1.253
H12(+++) (A)	7 K 7	Lactococcus lactis	2.324	Lactococcus lactis	2.254
A1(-) (C)	7 K 8	not reliable identification	1.53	not reliable identification	1.415
A2(-) (C)	7 K 9	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.405

A3(-)(C)	7 K 10	not reliable identification	1.273	not reliable identification	1.196
A4(-)(C)	7 K 11	not reliable identification	1.565	not reliable identification	1.359
A5(+)(B)	7 K 12	Aerococcus viridans	1.835	Aerococcus viridans	1.83
A6(++)(A)	7 K 13	Acinetobacter johnsonii	2.186	Acinetobacter johnsonii	2.159
A7(-)(C)	8 K 1	not reliable identification	1.473	not reliable identification	1.373
A8(+)(B)	8 K 2	Alcaligenes faecalis	1.718	not reliable identification	1.617
A9(-)(C)	8 K 3	not reliable identification	1.389	not reliable identification	1.27
A10(-)(C)	8 K 4	not reliable identification	1.681	not reliable identification	1.458
A11(+)(B)	8 K 5	Ochrobactrum grignonense	1.71	not reliable identification	1.489
B1(++)(A)	8 K 7	Lactococcus lactis	2.189	Lactococcus lactis	2.155
B2(++)(A)	8 K 8	Lactococcus lactis	2.281	Lactococcus lactis	2.17
B3(++)(A)	8 K 9	Lactococcus lactis	2.203	Lactococcus lactis	2.103
B4(+++)(A)	8 K 10	Acinetobacter guillouiae	2.311	not reliable identification	1.582
B5(+++)(A)	9 K 1	Serratia liquefaciens	2.326	Serratia liquefaciens	2.286
B6(-)(C)	9 K 2	not reliable identification	1.248	not reliable identification	1.205
B7(-)(C)	9 K 3	not reliable identification)	1.506	not reliable identification	1.327
B8(-)(C)	9 K 4	not reliable identification	1.279	not reliable identification	1.244
B9(-)(C)	9 K 5	not reliable identification	1.654	not reliable identification	1.625
B10(+)(B)	9 K 6	Stenotrophomonas maltophilia	1.718	not reliable identification	1.601
B11(++)(A)	9 K 7	Lactococcus lactis	2.285	Lactococcus lactis	2.223
B12(+)(B)	9 K 8	Corynebacterium sp	1.831	not reliable identification	1.67
C1(++)(A)	9 K 9	Acinetobacter johnsonii	2.227	Acinetobacter johnsonii	2.072
C3(++)(C)	9 K 11	Lactobacillus sp	2.259	Carnobacterium maltaromaticum	2.23
C4(+++)(C)	9 K 12	Serratia liquefaciens	2.345	Serratia liquefaciens	2.32
C5(-)(C)	9 K 13	not reliable identification	1.43	not reliable identification	1.428
C6(++)(A)	9 K 14	Lactococcus lactis	2.284	Lactococcus lactis	2.146
C8(++)(A)	10 K 2	Serratia liquefaciens	2.262	Serratia liquefaciens	2.217
C9(-)(C)	10 K 3	not reliable identification	1.557	not reliable identification	1.513
C10(+++)(C)	10 K 4	Serratia liquefaciens	2.332	Serratia liquefaciens	2.33
C12(-)(C)	10 K 6	not reliable identification	1.49	not reliable identification	1.35
D1(-)(C)	10 K 7	not reliable identification	1.547	not reliable identification	1.225
D2(+++)(A)	10 K 8	Serratia liquefaciens	2.434	Serratia liquefaciens	2.347
D3(++)(A)	10 K 9	Lactococcus lactis	2.284	Lactococcus lactis	2.176
D4(-)(C)	10 K 10	Chryseobacterium indologenes	1.700	not reliable identification	1.492
D5(+)(B)	10 K 11	Candida catenulata	1.781	not reliable identification	1.694
D6(-)(C)	10 K 12	not reliable identification	1.502	not reliable identification	1.475
D8(+++)(A)	10 K 14	Serratia liquefaciens	2.32	Serratia liquefaciens	2.246
D9(+++)(A)	10 K 15	Lactococcus lactis	2.31	Lactococcus lactis	2.21
D10(++)(A)	10 K 16	Acinetobacter johnsonii	2.016	Acinetobacter johnsonii	2.002
D11(+)(B)	10 K 17	Corynebacterium confusum	1.844	Corynebacterium confusum	1.802

Tablica MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 2 za sirovo i konzervirano mlijeko (K)

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
A1(-)(C)	1 1	not reliable identification	1.302	not reliable identification	1.295
A2(-)(C)	1 2	not reliable identification	1.255	not reliable identification	1.066
A3(+)(B)	1 3	Acinetobacter johnsonii	1.803	not reliable identification	1.628
A4(++)(A)	1 4	Lactococcus lactis	2.222	Lactococcus lactis	2.135
A5(-)(C)	1 5	not reliable identification	1.239	not reliable identification	0.992

A6(-)(C)	16	not reliable identification	1.358	not reliable identification	1.296
A7(++)(A)	17	Acinetobacter johnsonii	2.066	Acinetobacter johnsonii	1.834
A8(++)(A)	18	Lactococcus lactis	2.203	Lactococcus lactis	2.17
A9(+)(B)	19	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.919
A10(-)(C)	110	not reliable identification	1.25	not reliable identification	1.242
A11(+)(B)	21	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.924
A12(+)(B)	22	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.986
B1(++)(C)	23	Raoultella ornithinolytica	2.103	Raoultella ornithinolytica	1.87
B2(++)(A)	24	Lactococcus lactis	2.066	Lactococcus lactis	1.947
B3(-)(C)	25	Chryseobacterium sp	1.700	not reliable identification	1.168
B4(++)(C)	26	Raoultella ornithinolytica	2.149	Klebsiella oxytoca	1.88
B5(+)(B)	27	Enterobacter cloacae	2.000	Enterobacter cloacae	1.963
B6(+)(B)	28	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.81
B7(-)(C)	29	not reliable identification	1.359	not reliable identification	1.301
B8(+)(B)	210	Acinetobacter johnsonii	1.854	Acinetobacter johnsonii	1.842
B9(-)(C)	31	Acinetobacter johnsonii	1.700	not reliable identification	1.251
B10(+)(B)	32	Lactococcus lactis	1.759	not reliable identification	1.639
B11(++)(A)	33	Lactococcus lactis	2.035	Lactococcus lactis	1.943
B12(+)(B)	34	Lactococcus lactis	1.915	Lactococcus lactis	1.822
C1(-)(C)	35	not reliable identification	1.271	not reliable identification	1.153
C2(-)(C)	36	Stenotrophomonas maltophilia	1.700	not reliable identification	1.285
C3(-)(C)	37	not reliable identification	1.411	not reliable identification	1.325
C4(++)(A)	41	Enterococcus faecalis	2.126	Enterococcus faecalis	2.052
C5(+)(B)	42	Enterococcus faecalis	1.778	not reliable identification	1.688
C7(++)(A)	44	Acinetobacter johnsonii	2.061	Acinetobacter johnsonii	1.93
C8(++)(A)	45	Enterococcus faecalis	2.098	Enterococcus faecalis	1.903
C9(-)(C)	46	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.521
C10(+)(B)	47	Enterococcus faecalis	1.900	Enterococcus faecalis	1.843
C12(-)(C)	49	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.489
D1(++)(A)	410	Microbacterium liquefaciens	2.027	Microbacterium liquefaciens	1.827
D2(-)(C)	51	not reliable identification	1.078	not reliable identification	0.99
D3(-)(C)	52	not reliable identification	1.303	not reliable identification	1.188
D5(-)(C)	54	not reliable identification	1.246	not reliable identification	1.237
D6(+)(B)	55	Lactococcus lactis	1.879	not reliable identification	1.631
D7(+)(B)	56	Enterobacter cloacae	2.000	Enterobacter cloacae	1.892
D8(+)(B)	57	Lactococcus lactis	1.905	Lactococcus lactis	1.887
D9(+)(B)	58	Lactococcus lactis	1.836	Lactococcus lactis	1.78
D10(+)(B)	59	Corynebacterium xerosis	1.861	not reliable identification	1.228
D12(-)(C)	72	not reliable identification	1.292	not reliable identification	1.215
E1(+)(B)	73	Enterococcus faecalis	2.000	Enterococcus faecalis	1.823
E2(++)(A)	74	Lactococcus lactis	2.157	Lactococcus lactis	2.114
E3(++)(A)	75	Lactococcus lactis	2.16	Lactococcus lactis	2.145
E4(+)(B)	76	Lactococcus lactis	1.891	Lactococcus lactis	1.715
E5(++)(A)	77	Enterococcus faecalis	2.084	Enterococcus faecalis	2
E6(+)(B)	78	Enterococcus faecalis	1.848	Enterococcus faecalis	1.799
E7(-)(C)	79	not reliable identification	1.298	not reliable identification	1.214
E8(++)(A)	710	Enterococcus faecalis	2.046	Enterococcus faecalis	1.996
E11(++)(A)	81	Enterococcus faecalis	2.016	Enterococcus faecalis	1.795
E12(-)(C)	82	not reliable identification	1.323	not reliable identification	1.126
F1(-)(C)	83	Lactobacillus curvatus	1.700	not reliable identification	1.4
F4(-)(C)	912	Lactobacillus sp	1.700	not reliable identification	1.443

F5(-)(C)	9 1	not reliable identification	1.246	not reliable identification	1.148
F6(+)(B)	9 2	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.796
F7(++)(A)	9 3	Lactococcus lactis	2.114	Lactococcus lactis	2.102
F8(++)(A)	9 4	Lactococcus lactis	2.239	Lactococcus lactis	2.11
F10(-)(C)	9 6	not reliable identification	1.187	not reliable identification	1.129
F11(-)(C)	9 7	Staphylococcus haemolyticus	1.700	not reliable identification	1.285
F12(+)(B)	9 8	Aerococcus viridans	1.837	not reliable identification	1.633
G1(+)(B)	9 9	Staphylococcus hominis	1.825	Staphylococcus hominis	1.823
G2(+)(B)	9 10	Corynebacterium casei	1.713	not reliable identification	1.341
G3(+)(B)	9 11	Corynebacterium xerosis	1.862	not reliable identification	1.422
G4(-)(C)	10 1	Moraxella osloensis	1.700	not reliable identification	1.453
G5(++)(A)	10 2	Lactococcus lactis	2.113	Lactococcus lactis	2.105
G6(++)(A)	10 3	Lactococcus lactis	2.19	Lactococcus lactis	2.139
G7(+)(B)	10 4	Microbacterium maritypicum	1.869	Microbacterium liquefaciens	1.83
G8(+)(B)	10 5	Enterococcus faecalis	2.000	Enterococcus faecalis	1.89
G9(-)(C)	10 6	Microbacterium liquefaciens	1.700	not reliable identification	1.535
G10(++)(A)	10 7	Lactococcus lactis	2.188	Lactococcus lactis	2.157
A1(-)(C)	1K 1	not reliable identification	1.093	not reliable identification	1.075
A2(-)(C)	1K 2	Candida parapsilosis	1.700	not reliable identification	1.47
A3(+)(B)	1K 3	Yarrowia lipolytica	2.000	not reliable identification	1.695
A4(-)(C)	1K 4	not reliable identification	1.161	not reliable identification	1.105
A5(-)(C)	1K 5	not reliable identification	1.172	not reliable identification	1.133
A6(+)(B)	1K 6	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.942
A7(-)(C)	1K 7	not reliable identification	1.285	not reliable identification	1.237
A8(++)(A)	1K 8	Lactococcus lactis	2.14	Lactococcus lactis	2.067
A9(-)(C)	1K 9	Candida parapsilosis	1.700	not reliable identification	1.442
A10(-)(C)	2K 1	Chryseobacterium joostei	1.700	not reliable identification	1.088
A11(-)(C)	2K 2	Chryseobacterium joostei	1.700	not reliable identification	1.12
A12(-)(C)	2K 3	not reliable identification	1.209	not reliable identification	0.975
B1(+)(B)	2K 4	Lactococcus lactis	1.811	Lactococcus lactis	1.795
B2(-)(C)	2K 5	Chryseobacterium joostei	1.700	not reliable identification	1.428
B3(++)(A)	2K 6	Lactococcus lactis	2.292	Lactococcus lactis	2.231
B5(-)(C)	2K 8	not reliable identification	1.24	not reliable identification	1.21
B6(+)(B)	2K 9	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.933
B7(-)(C)	3K 1	not reliable identification	1.233	not reliable identification	1.221
B8(-)(C)	3K 2	not reliable identification	1.218	not reliable identification	1.217
B9(-)(C)	3K 3	not reliable identification	1.157	not reliable identification	1.134
B10(+)(B)	3K 4	Lactococcus lactis	1.873	Lactococcus lactis	1.835
B11(+)(B)	3K 5	Trichosporon loubieri	1.792	not reliable identification	1.612
B12(-)(C)	3K 6	not reliable identification	1.337	not reliable identification	1.085
C1(-)(C)	3K 7	Chryseobacterium joostei	1.700	not reliable identification	1.144
C2(+)(B)	3K 8	Aerococcus viridans	1.807	not reliable identification	1.698
C3(+)(B)	3K 9	Lactococcus garvieae	1.821	not reliable identification	1.39
C4(-)(C)	3K 10	not reliable identification	1.444	not reliable identification	1.256
C6(+)(B)	3K 12	Rhodococcus erythropolis	2.000	Rhodococcus erythropolis	1.917
C7(-)(C)	4K 1	not reliable identification	1.31	not reliable identification	1.187
C8(++)(A)	4K 2	Lactococcus lactis	2.084	Lactococcus lactis	2.062
C9(+)(B)	4K 3	Lactobacillus curvatus	1.738	Lactobacillus sakei	1.716
C10(-)(C)	4K 4	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.587
C11(-)(C)	4K 5	Issatchenkia orientalis	1.700	not reliable identification	1.334
C12(-)(C)	4K 6	not reliable identification	1.22	not reliable identification	1.22
D1(+)(B)	4K 7	Lactococcus lactis	1.899	Lactococcus lactis	1.87

D2(+) (B)	4K 8	Lactococcus lactis	1.837	Lactococcus lactis	1.804
D4(++) (A)	5K 1	Lactococcus lactis	2.18	Lactococcus lactis	2.147
D5(++) (A)	5K 2	Lactococcus lactis	2.131	Lactococcus lactis	2.006
D6(++) (A)	5K 3	Lactococcus lactis	2.044	Lactococcus lactis	2.043
D7(+) (B)	5K 4	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.813
D8(+) (B)	5K 5	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.919
D9(-) (C)	5K 6	Lactobacillus spp	1.700	not reliable identification	1.467
D10(-) (C)	7K 1	not reliable identification	1.504	not reliable identification	1.419
D11(++) (A)	7K 2	Enterococcus faecalis	2.112	Enterococcus faecalis	2.058
D12(++) (A)	7K 3	Enterococcus faecalis	2.05	Enterococcus faecalis	2.035
E1(-) (C)	7K 4	not reliable identification	1.232	not reliable identification	1.195
E2(++) (A)	7K 5	Enterococcus faecalis	2.042	Enterococcus faecalis	1.899
E3(+) (B)	7K 6	Microbacterium maritypicum	1.805	not reliable identification	1.595
E4(++) (A)	7K 7	Lactococcus lactis	2.15	Lactococcus lactis	2.126
E5(-) (C)	7K 8	Enterococcus faecalis	1.700	not reliable identification	1.452
E7(+) (B)	8K 1	Enterococcus faecalis	1.768	Enterococcus faecalis	1.764
E8(++) (A)	8K 2	Enterococcus faecalis	2.078	Enterococcus faecalis	1.992
E9(+) (B)	8K 3	Enterococcus faecalis	2.000	Enterococcus faecalis	1.864
E10(+++) (A)	8K 4	Enterococcus faecalis	2.31	Enterococcus faecalis	2.149
E11(++) (A)	8K 5	Enterococcus faecalis	2.146	Enterococcus faecalis	2.027
E12(++) (A)	8K 6	Enterococcus faecalis	2.257	Enterococcus faecalis	2.243
F1(++) (A)	9K 1	Lactococcus lactis	2.067	Lactococcus lactis	2.001
F2(++) (A)	9K 2	Lactococcus lactis	2.238	Lactococcus lactis	2.154
F3(-) (C)	10K 1	Microbacterium liquefaciens	1.700	not reliable identification	1.285
F4(++) (A)	10K 2	Lactococcus lactis	2.03	Lactococcus lactis	1.803
F5(++) (A)	10K 3	Enterococcus italicus	2.061	not reliable identification	1.303
F6(++) (A)	10K 4	Lactococcus lactis	2	Lactococcus lactis	1.94
F7(-) (C)	10K 5	Microbacterium liquefaciens	1.700	not reliable identification	1.561

Tablica MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 3 za sirovo i konzervirano mlijeko (K)

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
E2(+) (B)	1 2	Sphingobacterium spiritivorum	2.000	not reliable identification	1.287
E4(+) (B)	1 4	Chryseobacterium joostei	1.744	not reliable identification	1.304
E5(-) (C)	1 5	Enterobacter cloacae	1.700	not reliable identification	1.613
E6(-) (C)	1 6	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.366
E7(+) (B)	1 7	Klebsiella pneumoniae	2.000	Klebsiella pneumoniae	1.806
E8(-) (C)	1 8	Aeromonas sp	1.700	not reliable identification	1.306
E9(++) (A)	1 9	Pseudomonas putida	2.253	Pseudomonas putida	2.027
E10(+) (B)	1 10	Chryseobacterium joostei	1.762	not reliable identification	1.182
E12(+) (B)	1 12	Chryseobacterium joostei	1.729	not reliable identification	1.128
F1(++) (A)	1 13	Klebsiella pneumoniae	2.216	Klebsiella pneumoniae	2.192
F2(++) (A)	1 14	Pseudomonas putida	2.047	Pseudomonas putida	2.025
F3(-) (C)	1 15	Corynebacterium casei	1.700	not reliable identification	1.373
F4(-) (C)	1 16	not reliable identification	1.346	not reliable identification	1.138

D1(+)(B)	2 1	Chryseobacterium joostei	1.778	not reliable identification	1.152
D2(-)(C)	2 2	Raoultella ornithinolytica	1.700	not reliable identification	1.587
D3(-)(C)	2 3	not reliable identification	1.143	not reliable identification	1.056
D4(-)(C)	2 4	Stenotrophomonas sp	1.700	not reliable identification	1.222
D5(+)(B)	2 5	Enterobacter cloacae	2.000	Enterobacter cloacae	1.76
D6(+)(B)	2 6	Lactococcus garvieae	1.781	Lactococcus garvieae	1.738
D7(+)(B)	2 7	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.896
D8(+)(B)	2 8	Enterobacter cloacae	1.887	Enterobacter asburiae	1.718
D9(-)(C)	2 9	not reliable identification	1.276	not reliable identification	1.24
D10(-)(C)	2 10	Klebsiella pneumoniae	1.700	not reliable identification	1.046
D11(+)(B)	2 11	Klebsiella pneumoniae	1.939	Klebsiella pneumoniae	1.938
D12(-)(C)	2 12	not reliable identification	1.291	not reliable identification	1.119
C1(-)(C)	3 1	Enterobacter asburiae	1.700	not reliable identification	1.596
C2(+)(B)	3 2	Enterobacter cloacae	1.708	not reliable identification	1.682
C3(++)(A)	3 3	Enterococcus faecalis	2.015	Enterococcus faecalis	1.931
C4(+)(B)	3 4	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.705
C5(+)(B)	3 5	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.973
C6(-)(C)	3 6	not reliable identification	1.208	not reliable identification	1.133
C7(-)(C)	3 7	not reliable identification	1.24	not reliable identification	1.169
C8(-)(C)	3 8	not reliable identification	1.302	not reliable identification	1.232
C9(-)(C)	3 9	not reliable identification	1.257	not reliable identification	1.173
C10(+)(B)	3 10	Enterococcus faecalis	2.000	Enterococcus faecalis	1.857
C11(++)(A)	3 11	Acinetobacter johnsonii	2.052	Acinetobacter johnsonii	1.919
C12(++)(A)	3 12	Acinetobacter johnsonii	2.11	Acinetobacter johnsonii	2.093
H1(+)(B)	4 1	Enterobacter cloacae	2.000	Enterobacter cloacae	1.801
H2(-)(C)	4 2	Enterococcus faecalis	1.700	not reliable identification	1.573
H3(-)(C)	4 3	Enterobacter cloacae	1.766	not reliable identification	1.41
H4(+)(B)	4 4	Lactococcus garvieae	1.701	not reliable identification	1.255
H5(-)(C)	4 5	not reliable identification	1.305	not reliable identification	1.257
H6(-)(C)	4 6	not reliable identification	1.499	not reliable identification	1.133
H7(-)(C)	4 7	not reliable identification	1.243	not reliable identification	0.97
H8(-)(C)	4 8	Enterobacter asburiae	1.766	not reliable identification	0.702
H9(-)(C)	4 9	not reliable identification	1.095	not reliable identification	1.084
H10(-)(C)	4 10	not reliable identification	1.14	not reliable identification	0.986
H11(-)(C)	4 11	not reliable identification	1.212	not reliable identification	1.194
H12(+)(C)	4 12	Stenotrophomonas maltophilia	2.035	Stenotrophomonas_maltophilia	1.883
G1(-)(C)	5 1	Enterobacter cloacae	1.826	not reliable identification	1.377
G2(-)(C)	5 2	not reliable identification	1.573	not reliable identification	1.305
G3(++)(A)	5 3	Lactococcus lactis	2.122	Lactococcus lactis	1.915
G4(-)(C)	5 4	not reliable identification	1.297	not reliable identification	1.206
G5(-)(C)	5 5	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.32

G6(+) (B)	5 6	Lactococcus garvieae	1.77	not reliable identification	1.185
G7(+) (B)	5 7	Enterobacter cloacae	1.809	not reliable identification	1.583
G8(+) (B)	5 8	Acinetobacter johnsonii	2.017	Acinetobacter johnsonii	1.765
G9(-) (C)	5 9	not reliable identification	0.982	not reliable identification	0.977
G10(-) (C)	5 10	not reliable identification	1.159	not reliable identification	1.109
G11(-) (C)	5 11	not reliable identification	1.313	not reliable identification	1.185
G12(-) (C)	5 12	Macrocococcus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.304
F7(+) (B)	6 1	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.681
F8(-) (C)	6 2	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.48
F9(-) (C)	6 3	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.674
F10(-) (C)	6 4	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.231
F11(-) (C)	6 5	Kluyveromyces lactis	2.000	not reliable identification	1.606
F12(-) (C)	6 6	Lactobacillus brevis	1.700	not reliable identification	1.152
E6(+) (B)	7 1	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.708
E7(-) (C)	7 2	Raoultella ornithinolytica	1.700	not reliable identification	1.376
E8(-) (C)	7 3	Klebsiella oxytoca	1.843	not reliable identification	1.31
E9(-) (C)	7 4	not reliable identification	1.122	not reliable identification	1.052
E10(+) (B)	7 5	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.724
E11(+) (B)	7 6	Lactococcus garvieae	1.728	not reliable identification	1.361
E12(-) (C)	7 7	not reliable identification	0.911	not reliable identification	0.832
F1(+) (B)	7 8	Corynebacterium variabile	1.76	not reliable identification	1.652
F2(-) (C)	7 9	not reliable identification	1.317	not reliable identification	0.957
F3(+) (B)	7 10	Citrobacter braakii	2.000	not reliable identification	1.685
F4(-) (C)	7 11	Kluyveromyces lactis	2.000	not reliable identification	1.602
F5(+) (B)	7 12	Microbacterium maritipicum	2.000	not reliable identification	1.342
F6(+) (B)	7 13	Macrocococcus caseolyticus	2.000	Macrocococcus caseolyticus	1.81
D11(-) (C)	8 1	Lactococcus garvieae	1.757	not reliable identification	1.179
D12(++) (A)	8 2	Enterococcus faecalis	2.201	Enterococcus faecalis	2.196
E1(-) (C)	8 3	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.182
E2(-) (C)	8 4	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.114
E3(+) (B)	8 5	Lactococcus garvieae	1.886	Lactococcus garvieae	1.802
E4(-) (C)	8 6	Lactococcus garvieae	1.709	not reliable identification	1.211
E5(++) (A)	8 7	Enterobacter cloacae	2.031	Enterobacter cloacae	1.959
D5(-) (C)	9 1	not reliable identification	1.228	not reliable identification	1.197
D6(-) (C)	9 2	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.129
D7(-) (C)	9 3	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.514
D8(+) (B)	9 4	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.651
D9(-) (C)	9 5	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.493
D10(+) (B)	9 6	Enterococcus faecalis	2.000	Enterococcus faecalis	1.812
C3(+) (B)	10 1	Acinetobacter johnsonii	2.029	Acinetobacter johnsonii	1.942
C4(-) (C)	10 2	not reliable identification	1.521	not reliable identification	1.189
C5(-) (C)	10 3	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.299

C6(-)(C)	10 4	Enterobacter cloacae	1.700	not reliable identification	1.348
C7(+)(B)	10 5	Klebsiella pneumoniae	2.000	not reliable identification	1.693
C8(-)(C)	10 6	not reliable identification	0.775	not reliable identification	0.724
C9(+)(B)	10 7	Enterobacter cloacae	2.000	Enterobacter cloacae	1.871
C10(+)(B)	10 8	Enterobacter asburiae	1.869	Enterobacter kobei	1.74
C11(+)(B)	10 9	Chryseobacterium gleum	2.000	not reliable identification	1.537
C12(-)(C)	10 10	not reliable identification	1.232	not reliable identification	1.176
D1(-)(C)	10 11	Corynebacterium sp	1.700	not reliable identification	1.304
B6(-)(C)	11 1	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.138
B7(-)(C)	11 2	not reliable identification	1.279	not reliable identification	1.258
B8(-)(C)	11 3	not reliable identification	1.037	not reliable identification	1.034
B9(-)(C)	11 4	Raoultella ornithinolytica	1.700	not reliable identification	1.238
B10(-)(C)	11 5	Pseudomonas sp	1.700	not reliable identification	1.46
B11(-)(C)	11 6	not reliable identification	1.138	not reliable identification	1.013
B12(-)(C)	11 7	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.398
C1(++)(A)	11 8	Flavobacterium lindanitolerans	2.435	not reliable identification	1.144
C2(-)(C)	11 9	not reliable identification	0.902	not reliable identification	0.887
A8(+)(C)	12 1	Klebsiella oxytoca	2.000	Raoultella ornithinolytica	1.804
A9(-)(C)	12 2	not reliable identification	1.152	not reliable identification	1.146
A10(++)(C)	12 3	Raoultella ornithinolytica	2.034	Raoultella ornithinolytica	1.977
A11(-)(C)	12 4	not reliable identification	1.118	not reliable identification	1.037
A12(-)(C)	12 5	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.487
B1(-)(C)	12 6	not reliable identification	1.205	not reliable identification	1.192
B2(-)(C)	12 7	not reliable identification	0.908	not reliable identification	0.886
B3(-)(C)	12 8	Acinetobacter johnsonii	2.000	not reliable identification	1.08
B4(-)(C)	12 9	not reliable identification	1.355	not reliable identification	1.05
B5(-)(C)	12 10	Rhodococcus erythropolis	1.700	not reliable identification	1.308
A1(-)(C)	13 1	not reliable identification	1.069	not reliable identification	1.034
A2(-)(C)	13 2	not reliable identification	1.009	not reliable identification	0.995
A3(-)(C)	13 3	not reliable identification	1.15	not reliable identification	0.877
A4(-)(C)	13 4	not reliable identification	0.951	not reliable identification	0.95
A5(-)(C)	13 5	not reliable identification	1.22	not reliable identification	1.217
A6(-)(C)	13 6	not reliable identification	1.15	not reliable identification	1.043
A7(-)(C)	13 7	not reliable identification	1.068	not reliable identification	0.976
H10(-)(C)	14 1	not reliable identification	1.362	not reliable identification	1.161
H11(++)(A)	14 2	Enterococcus faecalis	2.183	Enterococcus faecalis	2.178
H12(-)(C)	14 3	not reliable identification	0.991	not reliable identification	0.936
B10(++)(A)	14 4	Lactococcus lactis	2.038	Lactococcus lactis	1.952
B11(-)(C)	14 5	not reliable identification	1.028	not reliable identification	1.002
B12(-)(C)	14 6	Macroccoccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.434
H1(-)(C)	15 1	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.489

H2(-)(C)	15 2	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.385
H3(+)(B)	15 3	Stenotrophomonas maltophilia	1.701	not reliable identification	1.117
H4(+)(B)	15 4	Enterococcus faecalis	2.000	not reliable identification	1.677
H5(-)(C)	15 5	Enterococcus faecalis	1.700	not reliable identification	1.566
H6(++)(A)	15 6	Enterococcus faecalis	2.037	Enterococcus faecalis	1.973
H7(-)(C)	15 7	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.162
H8(-)(C)	15 8	Microbacterium liquefaciens	1.700	not reliable identification	1.483
H9(++)(A)	15 9	Stenotrophomonas maltophilia	2.003	Stenotrophomonas maltophilia	1.817
G4(+)(B)	16 1	Acinetobacter johnsonii	1.734	not reliable identification	1.673
G5(-)(C)	16 2	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.054
G6(-)(C)	16 3	Enterococcus faecalis	2.000	not reliable identification	1.426
G7(-)(C)	16 4	not reliable identification	1.201	not reliable identification	1.155
G8(-)(C)	16 5	Enterococcus faecalis	1.700	not reliable identification	1.391
G9(-)(C)	16 6	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.322
G10(-)(C)	16 7	not reliable identification	1.123	not reliable identification	1.051
G11(-)(C)	16 8	not reliable identification	1.266	not reliable identification	1.163
G12(+)(B)	16 9	Macrococcus caseolyticus	1.853	Macrococcus caseolyticus	1.831
F3(-)(C)	17 1	Macrococcus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.454
F4(-)(C)	17 2	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.377
F5(-)(C)	17 3	not reliable identification	1.475	not reliable identification	1.251
F6(++)(A)	17 4	Acinetobacter johnsonii	2.045	Acinetobacter johnsonii	1.993
F7(+)(B)	17 5	Lactococcus garvieae	1.776	not reliable identification	1.309
F8(-)(C)	17 6	Stenotrophomonas maltophilia	1.700	not reliable identification	1.492
F9(++)(A)	17 7	Enterobacter cloacae	2.043	Enterobacter cloacae	1.983
F10(-)(C)	17 8	Chryseobacterium gleum	1.700	not reliable identification	1.193
F11(++)(A)	17 9	Microbacterium liquefaciens	2.055	Microbacterium liquefaciens	1.913
F12(-)(C)	17 10	Stenotrophomonas maltophilia	1.700	not reliable identification	1.409
G1(-)(C)	17 11	Moraxella osloensis	1.911	not reliable identification	1.215
G3(+)(B)	17 12	Moraxella_sg_Moraxella osloensis	1.911	not reliable identification	1.648
E4(+)(B)	18 1	Enterobacter cloacae	1.771	Enterobacter cloacae	1.731
E5(-)(C)	18 2	not reliable identification	1.333	not reliable identification	1.102
E7(++)(A)	18 4	Lactococcus lactis	2.094	Lactococcus lactis	2.089
E8(-)(C)	18 5	not reliable identification	1.306	not reliable identification	1.223
E9(-)(C)	18 6	not reliable identification	1.253	not reliable identification	1.253
E10(+)(B)	18 7	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.663
E11(-)(C)	18 8	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.44
E12(-)(C)	18 9	not reliable identification	1.237	not reliable identification	1.233
F1(+)(B)	18 10	Microbacterium maritopicum	1.785	not reliable identification	1.564

F2(-) (C)	18 11	Lactobacillus curvatus	1.700	not reliable identification	1.322
G2(+) (B)	18 12	Rhodococcus erythropolis	1.754	Rhodococcus erythropolis	1.706
D10(+) (B)	19 1	Lactococcus garvieae	1.78	not reliable identification	1.345
D11(-) (C)	19 2	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.388
D12(+++) (A)	19 3	Enterococcus faecalis	2.33	Enterococcus faecalis	2.204
E1(-) (C)	19 4	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.098
E2(++) (A)	19 5	Enterococcus faecalis	2.264	Enterococcus faecalis	2.247
E3(+) (B)	19 6	Lactococcus garvieae	1.812	not reliable identification	1.282
D2(-) (C)	20 1	Enterobacter cloacae	1.700	not reliable identification	1.472
D3(++) (A)	20 2	Lactococcus lactis	2.293	Lactococcus lactis	2.278
D4(+) (B)	20 3	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.912
D5(++) (A)	20 4	Lactococcus lactis	2.193	Lactococcus lactis	2.103
D6(-) (C)	20 5	Candida rugosa	1.700	not reliable identification	1.259
D7(++) (A)	20 6	Lactococcus lactis	2.09	Lactococcus lactis	2.083
D8(-) (C)	20 7	not reliable identification	1.254	not reliable identification	1.161
D9(+) (B)	20 8	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.574
C1(+) (B)	21 1	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.908
C2(++) (A)	21 2	Lactococcus lactis	2.157	Lactococcus lactis	2.047
C3(-) (C)	21 3	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.414
C4(++) (A)	21 4	Lactococcus lactis	2.245	Lactococcus lactis	2.231
C5(+) (B)	21 5	Lactococcus garvieae	2.000	Lactococcus garvieae	1.734
C6(++) (A)	21 6	Lactococcus lactis	2.256	Lactococcus lactis	2.256
C7(+++) (A)	21 7	Lactococcus lactis	2.366	Lactococcus lactis	2.353
C8(-) (C)	21 8	Microbacterium liquefaciens	1.700	not reliable identification	1.432
C9(+) (B)	21 9	Acinetobacter johnsonii	2.000	Acinetobacter johnsonii	1.859
C10(+) (B)	21 10	Microbacterium maritypicum	2.000	Microbacterium liquefaciens	1.767
C11(++) (A)	21 11	Acinetobacter johnsonii	2.085	Acinetobacter johnsonii	1.758
C12(++) (A)	21 12	Acinetobacter baumannii	2.053	Acinetobacter baumannii	1.853
D1(+) (B)	21 13	Enterobacter ludwigii	1.817	Enterobacter asburiae	1.778
F6(+) (B)	1K 2	Lactococcus garvieae	1.772	not reliable identification	1.608
F7(+) (B)	1K 3	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.929
F8(+) (B)	1K 4	Lactococcus garvieae	2.000	not reliable identification	1.443
F9(+) (B)	1K 5	Chryseobacterium joostei	1.897	not reliable identification	1.458
F10(+) (B)	1K 6	Enterobacter cloacae	2.000	Enterobacter cloacae	1.826
F11(+) (B)	1K 7	Macrocooccus caseolyticus	1.712	not reliable identification	1.496
F12(+) (B)	1K 8	Chryseobacterium joostei	1.841	not reliable identification	1.602
G2(-) (C)	1K 10	not reliable identification	1.192	not reliable identification	1.119
G3(-) (C)	2K 1	Enterobacter cloacae	1.700	not reliable identification	1.627
G4(-) (C)	2K 2	not reliable identification	1.34	not reliable identification	1.307
G6(+) (B)	2K 4	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.586
G7(+) (B)	2K 5	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.886

G8(+) (B)	2K 6	Lactococcus lactis	1.769	Lactococcus lactis	1.708
G9(+) (B)	2K 7	Enterobacter cloacae	1.74	Enterobacter asburiae	1.713
G10(+) (B)	2K 8	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.776
G11(-) (C)	2K 9	not reliable identification	1.372	not reliable identification	1.111
G12(++) (A)	2K 10	Acinetobacter guillouiae	2.103	not reliable identification	1.399
H1(+) (B)	2K 11	Acinetobacter guillouiae	1.87	not reliable identification	1.244
H2(-) (C)	2K 12	Staphylococcus succinus	1.700	not reliable identification	1.409
H3(+) (B)	2K 13	Chryseobacterium joostei	1.830	not reliable identification	1.202
H4(++) (A)	3K 1	Acinetobacter johnsonii	2.003	Acinetobacter johnsonii	1.911
H5(++) (A)	3K 2	Acinetobacter johnsonii	2.046	Acinetobacter johnsonii	2.037
H6(-) (C)	3K 3	Enterobacter cloacae	1.700	not reliable identification	1.566
H7(++) (A)	3K 4	Acinetobacter johnsonii	2.108	Acinetobacter johnsonii	2.094
H8(++) (A)	3K 5	Enterococcus faecalis	2.05	Enterococcus faecalis	1.894
H9(+) (B)	3K 6	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.66
H10(-) (C)	3K 7	Macroccoccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.403
H11(-) (C)	3K 8	not reliable identification	1.242	not reliable identification	1.212
H12(++) (A)	3K 9	Acinetobacter johnsonii	2.102	Acinetobacter johnsonii	2.022
A1(+) (B)	4K 1	Lactococcus garvieae	1.858	not reliable identification	1.346
A2(++) (A)	4K 2	Lactococcus lactis	2.323	Lactococcus lactis	2.173
A3(+) (B)	4K 3	Lactococcus garvieae	2.000	not reliable identification	1.573
A4(+) (B)	4K 4	Lactococcus garvieae	1.759	not reliable identification	1.481
A5(+) (B)	4K 5	Lactococcus garvieae	1.774	not reliable identification	1.391
A6(-) (C)	4K 6	not reliable identification	1.333	not reliable identification	1.32
A7(++) (A)	5K 1	Lactococcus lactis	2.121	Lactococcus lactis	2.037
A8(-) (C)	5K 2	Lactococcus garvieae	1.729	not reliable identification	1.292
A10(++) (A)	5K 4	Lactococcus lactis	2.096	Lactococcus lactis	1.878
A11(+) (B)	6K 1	Lactococcus lactis	1.778	Lactococcus lactis	1.71
A12(+) (B)	6K 2	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.761
B1(+) (B)	6K 3	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.709
B4(-) (C)	6K 6	not reliable identification	1.199	not reliable identification	1.119
B5(-) (C)	7K 1	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.537
B6(-) (C)	7K 2	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.279
B7(+) (B)	7K 3	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.685
B8(-) (C)	7K 4	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.21
B9(-) (C)	7K 5	not reliable identification	1.697	not reliable identification	1.597
B10(-) (C)	8K 1	Candida rugosa	1.700	not reliable identification	1.049
B11(-) (C)	8K 2	not reliable identification	1.405	not reliable identification	1.228
B12(-) (C)	8K 3	not reliable identification	1.165	not reliable identification	1.132
C1(++) (A)	8K 4	Enterococcus faecalis	2.133	Enterococcus faecalis	1.905
C2(-) (C)	8K 5	not reliable identification	1.325	not reliable identification	1.315
C3(-) (C)	8K 6	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.19
C4(-) (C)	8K 7	Stenotrophomonas	1.722	not reliable identification	1.497

		maltophilia			
C5(-)(C)	9K 1	not reliable identification	1.2	not reliable identification	1.148
C7(-)(C)	9K 3	Kluyveromyces lactis	2.000	not reliable identification	1.496
C8(+)(B)	9K 4	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.789
C9(-)(C)	9K 5	Kluyveromyces lactis	1.700	not reliable identification	1.389
C10(+)(B)	10K 1	Enterobacter ludwigii	1.775	Enterobacter cloacae	1.753
C11(+)(B)	10K 2	Lactococcus garvieae	1.701	not reliable identification	1.582
D2(+)(B)	10K 5	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.67
D5(-)(C)	10K 8	not reliable identification	1.355	not reliable identification	1.184
D6(-)(C)	10K 9	Macroccoccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.535
D7(-)(C)	10K 10	Kluyveromyces lactis	2.000	not reliable identification	1.457
D8(+)(B)	10K 11	Macroccoccus caseolyticus	2.000	Macroccoccus caseolyticus	1.748
D9(-)(C)	11K 1	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.218
D10(+)(B)	11K 2	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.562
E3(-)(C)	11K 6	not reliable identification	1.166	not reliable identification	1.154
E4(-)(C)	11K 8	not reliable identification	1.47	not reliable identification	1.38
E5(-)(C)	12K 1	Lactococcus lactis	2.004	not reliable identification	1.666
E6(-)(C)	12K 2	not reliable identification	1.116	not reliable identification	1.004
E8(-)(C)	12K 4	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.387
E9(-)(C)	12K 5	Kluyveromyces lactis	2.000	not reliable identification	1.508
E12(-)(C)	12K 8	Issatchenkia orientalis	1.700	not reliable identification	1.308
F1(+)(B)	12K 9	Raoultella ornithinolytica	1.731	not reliable identification	1.661
F2(-)(C)	12K 10	not reliable identification	1.328	not reliable identification	1.241
F3(-)(C)	12K 11	Macroccoccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.478
F4(+)(B)	12K 12	Kluyveromyces lactis	2.031	not reliable identification	1.687
F5(-)(C)	13K 1	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.312
F9(-)(C)	13K 5	not reliable identification	1.465	not reliable identification	1.346
F10(+)(B)	13K 6	Kluyveromyces lactis	2.000	not reliable identification	1.688
F11(-)(C)	13K 7	not reliable identification	1.224	not reliable identification	1.146
F12(-)(C)	13K 8	not reliable identification	1.206	not reliable identification	1.183
G1(+)(B)	13K 9	Raoultella ornithinolytica	2.000	Raoultella ornithinolytica	1.703
G2(++)(A)	14K 1	Acinetobacter johnsonii	2.048	Acinetobacter johnsonii	2.035
G3(+)(B)	14K 2	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.776
G4(+)(B)	14K 3	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.684
G6(-)(C)	14K 5	Issatchenkia orientalis	2.000	not reliable identification	1.178
G7(+)(B)	14K 6	Lactococcus lactis	1.878	Lactococcus lactis	1.853
G8(-)(C)	14K 7	not reliable identification	1.13	not reliable identification	1.098
G9(-)(C)	14K 8	Acinetobacter johnsonii	2.048	not reliable identification	1.385
G10(+)(B)	14K 9	Microbacterium maritopicum	1.87	Microbacterium liquefaciens	1.798
G11(-)(C)	14K 10	Macroccoccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.158
H1(+)(B)	15K 2	Lactococcus garvieae	2.000	not reliable identification	1.325
H2(+++)(A)	15K 3	Enterococcus faecalis	2.330	Enterococcus faecalis	2.209

H3(+) (B)	15K 4	Enterococcus faecalis	1.896	Enterococcus faecalis	1.794
H4(++) (A)	15K 5	Enterococcus faecalis	2.234	Enterococcus faecalis	2.072
H5(+) (B)	15K 6	Enterococcus faecalis	1.888	Enterococcus faecalis	1.753
H6(-) (C)	16K 1	Enterobacter cloacae	1.700	not reliable identification	1.592
H7(++) (A)	16K 2	Enterococcus faecalis	2.168	Enterococcus faecalis	2.031
H8(-) (C)	16K 3	Enterococcus faecalis	1.712	not reliable identification	1.39
H9(-) (C)	16K 4	not reliable identification	1.185	not reliable identification	1.099
A2(-) (C)	16K 9	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.347
A4(+) (B)	16K 11	Lactococcus lactis	2.000	Lactococcus lactis	1.726
A6(++) (A)	16K 13	Macrocooccus caseolyticus	2.011	Macrocooccus caseolyticus	1.978
A7(+) (B)	16K 14	Stenotrophomonas maltophilia	2.000	Stenotrophomonas maltophilia	1.761
A9(+) (B)	17K 2	Lactococcus garvieae	1.821	not reliable identification	1.286
A10(-) (C)	17K 3	not reliable identification	1.108	not reliable identification	0.992
A11(+) (B)	17K 7	Lactococcus garvieae	1.721	not reliable identification	1.194
B1(+) (B)	17K 5	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.609
B3(-) (C)	17K 8	Issatchenkia orientalis	1.700	not reliable identification	1.371
B4(+) (B)	17K 9	Candida pararugosa	1.829	not reliable identification	1.533
B5(-) (C)	17K 10	Candida rugosa	1.700	not reliable identification	1.272
B6(+) (B)	18K 1	Kluyveromyces lactis	1.821	Kluyveromyces lactis	1.73
B8(-) (C)	18K 3	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.162
B9(-) (C)	18K 4	not reliable identification	1.308	not reliable identification	1.025
B10(-) (C)	18K 5	not reliable identification	1.313	not reliable identification	1.26
B12(-) (C)	18K 7	not reliable identification	1.31	not reliable identification	1.104
C1(-) (C)	18K 8	Macrocooccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.583
C2(+) (B)	18K 9	Macrocooccus caseolyticus	2.000	Macrocooccus caseolyticus	1.757
C3(-) (C)	18K 10	not reliable identification	1.366	not reliable identification	1.236
C4(-) (C)	19K 1	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.245
C5(-) (C)	19K 2	not reliable identification	1.019	not reliable identification	1.013
C7(-) (C)	19K 4	not reliable identification	1.349	not reliable identification	1.267
C8(-) (C)	19K 5	Enterococcus faecalis	2.000	not reliable identification	1.665
C10(-) (C)	20K 1	not reliable identification	1.252	not reliable identification	1.236
D1(+) (B)	20K 4	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.631
D2(-) (C)	20K 5	Lactococcus lactis	1.700	not reliable identification	1.658
D5(+) (B)	20K 8	Kluyveromyces lactis	2.000	not reliable identification	1.666
D6(-) (C)	20K 9	not reliable identification	1.281	not reliable identification	1.218
D8(-) (C)	21K 1	not reliable identification	1.005	not reliable identification	0.98
D9(+) (B)	21K 2	Enterococcus faecalis	2.000	Enterococcus faecalis	1.787
D12(+) (B)	21 K 5	Lactococcus lactis	2.000	not reliable identification	1.644
E2(++) (A)	21K 7	Escherichia coli	2.205	Escherichia coli	2.011
E3(-) (C)	21 K 8	Lactococcus garvieae	1.700	not reliable identification	1.135
E5(-) (C)	21 K 10	not reliable identification	1.204	not reliable identification	1.178

E6(-)(C)	21 K 11	not reliable identification	1.083	not reliable identification	1.014
E7(-)(C)	21K 12	not reliable identification	1.146	not reliable identification	1.105
E8(+)(B)	21K 13	Microbacterium maritypicum	1.893	not reliable identification	1.589
E9(-)(C)	21K 14	Macrocooccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.578
E10(++)(A)	21K 15	Stenotrophomonas maltophilia	2.015	Stenotrophomonas maltophilia	1.925
E11(-)(C)	21 K 16	Microbacterium liquefaciens	1.700	not reliable identification	1.484
E12(-)(C)	21 K 17	Macrocooccus caseolyticus	1.700	not reliable identification	1.428

Nina Lovrić rođena je 14.01.1996. godine u Zagrebu, Republika Hrvatska. Odrasla je i živi u Svetoj Nedelji. Školovanje je započela 2002. godine u OŠ Matka Laginje u Zagrebu gdje je bila odličan učenik. Nakon završene osnovne škole upisala je 2010. godine prirodoslovno-matematičku, XV. gimnaziju (MIOC) u Zagrebu, informatički smjer. Polaganjem mature 2014. godine završila je srednjoškolsko obrazovanje te se iste godine u rujnu upisala na Agronomski fakultet u Zagrebu - smjer Animalne znanosti. Preddiplomski studij Animalne znanosti završila je 2018. godine čime je stekla akademski naziv sveučilišnog prvostupnika animalnih znanosti. U rujnu 2018. godine upisala je diplomski studij Proizvodnja i prerada mlijeka na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Stručnu praksu odrađivala je u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode u sklopu preddiplomskog i diplomskog studija. Posjeduje odlično znanje engleskog jezika u govoru i pismu te iznimno dobro poznaje rad na računalu. Slobodno vrijeme provodi u prirodi, bavi se sportom – stolnim tenisom, bicikliranjem i teretanom.