

## Forord

Denne oppgaven er skrevet som en avsluttende del av studiet master i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Institutt for kjemi, bioteknologi- og matvitenskap (IKBM). Oppgaven er skrevet innenfor fagområdet matvaretrygghet, kvalitet- og hygiene, omfatter 30 av totalt 120 studiepoeng og ble gjennomført august – desember 2015.

Hovedmålet med denne oppgaven er å kartlegge innhold av termoresistente bakterier i melk fra 2 av TINEs meierier (A og B). Oppgaven er en liten del av et stort prosjekt for dette området og er derfor et samarbeid med denne gruppen, TINE og IKBM.

Jeg vil benytte anledningen til å takke alle som har vært involvert i oppgaven min, fra praktisk arbeid på laboratoriet til god veiledning i disse månedene.

Den største takken er til min hovedveileder Førsteamanuensis Hilde Marit Østlie for den gode veiledningen du har gitt meg, korrekturlesning med mye konstruktiv kritikk og for ditt alltid gode humør. En stor takk min delveileder Professor Siv Skeie for mye god kunnskap om melk, fine diskusjoner som har fått meg til å tenke andre veier og god konstruktiv kritikk. Jeg ønsker i tillegg til å takke overingeniør Zhian Salehian for all din molekylære kunnskap, og tålmodigheten til avdelingsingeniør Ahmed Abdelghani når jeg hadde mange rare spørsmål på laboratoriet. I tillegg til en takk til de søte damene på laboratoriet (Kari, May og Bjørg) som tok meg inn i deres lune havn med god kaffe, kaker, kjeks, is og mye latter. Uten dem hadde ikke tilværelsene med lange dager vært like hyggelig. En takk til TINE for økonomisk støtte.

Til slutt vil jeg rette den aller største takken til min kjære samboer Ole for all støtten, omsorgen, kjærligheten, tålmodigheten og at du har holdt ut med meg. Du er fantastisk!

Uten dere hadde jeg ikke greid å kommet gjennom dette, så tusen hjertelig takk!

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet  
Institutt for kjemi, bioteknologi- og matvitenskap  
Ås, 15 desember 2015

---

Trude Gjæver Reinholdtsen



## Sammendrag

Det er ønskelig å finne mer ut om innhold av termoresistente bakterier i melken, altså melk som har vært varmebehandlet. For denne oppgaven ble melk fra 2 meierier undersøkt over en tidsperiode på 2 måneder (august og september). Det var ønskelig å finne ut hvordan to forskjellige varmebehandlingstemperaturer for melk: pasteurisering (72 °C i 15 sek eller 63 °C i 30 min) og høytemperaturbehandling (100 °C i 30 min), påvirker melkens mikrobiologiske sammensetning. Det var av interesse å finne ut hvilke bakterier som var til stede i melk etter inkubering av utsådde prøver ved 30 °C og 55 °C, og om det var en annen bakterieflora etter 13 dager lagring, samt om det var noen forskjeller mellom meieri A og B.

For analyser utført på mesofilt termoresistent bakterietall ble det bekreftet at melken fra begge meieriene var innenfor EUs reglement for innhold av bakterier i fersk pasteurisert melk, dette ble også vist i pasteurisert melk lagret ved 4 °C i 13 dager. Som forventet var ikke melk lagret ved 8 °C innenfor EUs reglement.

Totalt ble det isolert bakterier fra 8 forskjellige bakterieslekter og 16 forskjellige arter (8 av artene tilhørende slekten *Bacillus*) fra varmebehandlet melk i denne studien. De 3 dominerende slektene var: *Bacillus* (72 %), *Aneurinibacillus* (10 %), og *Kocuria* (9 %), mens de øvrige slektene som var tilstede representerte  $\leq 2$  % av isolatene (*Staphylococcus*, *Brevibacillus*, *Microbacterium*, *Brachybacterium* og *Streptococcus*). Som nevnt representerte *Bacillus* slekten flere arter gjennom hele forsøket, der *Bacillus licheniformis* var den mest dominerende ved begge uttakene, også i melk lagret i 13 dager. Det ble omtrent ikke funnet *B. cereus* gjennom hele forsøket. For bakterieslekten *Aneurinibacillus* var det kun *Aneurinibacillus thermoaerophilus* som ble funnet, mens for slekten *Kocuria* var det *Kocuria rhizophila* som ble isolert fra varmebehandlet melk.

## Abstract

It is desirable to out find more out about the content of thermoresistant bacteria in the milk, that is milk that has been heat treated. In this study milk from 2 dairies was studied over a period of two months (August and September). It was desirable to find out how two different heat treatment temperatures for milk: pasteurization (72 ° C for 15 sec or 63 ° C for 30 min) and high temperature (100 ° C for 30 min), affects the microbiological composition of milk. It was of interest to determine which bacteria that were present in milk after incubation of the seeded samples at 30 ° C and 55 ° C, and if there was another bacterial flora after 13 days of storage, and whether there were any differences between dairy A and dairy B.

For analyzes carried out on mesophilic thermoresistant bacterial count, it was confirmed that milk from both dairies was within the EU's regulations regarding the levels of bacteria in fresh pasteurized milk, this was also shown in pasteurized milk stored at 4 ° C for 13 days. As expected, no milk stored at 8 ° C within the EU's regulations.

From heat-treated milk in this study, a total of 8 different bacterial genera and 16 different species (8 species belonging to the genus *Bacillus*) was isolated. The 3 dominant genera were: *Bacillus* (72%), *Aneurinibacillus* (10%), and *Kocuria* (9%), whereas the other genera present represented  $\leq 2\%$  of isolates (*Staphylococcus*, *Brevibacillus*, *Microbacterium*, *Brachybacterium* and *Streptococcus*). As noted, the *Bacillus* genus represented several species throughout the experiment, in which *Bacillus licheniformis* was the most dominant at both outlets, also in milk stored for 13 days. There was hardly found *B. cereus* throughout the experiment. Regarding the bacterial genus *Aneurinibacillus*, only *Aneurinibacillus thermoaerophilus* found, while for the genus *Kocuria*, *Kocuria rhizophila* isolated from heat-treated milk.

# Innholdsfortegnelse

1.	Introduksjon .....	1
1.1	Melk .....	1
1.1.1	Kilder for/til mikroorganismer i melk .....	1
1.1.2	Bakteriestammer- og arter i rå melk .....	2
1.1.3	Varmebehandling av melk .....	3
1.1.4	Varmeresistente bakterier og sporer .....	4
1.2	Identifisering av bakterier .....	7
1.2.1	Fenotyp identifisering av bakterier .....	7
1.2.2	Genotypisk identifisering ved bruk av sekvensering .....	9
1.3	Hensikt med oppgaven .....	12
2.	Materialer og metoder .....	13
2.1	Melkeprøver og temperaturregimer .....	13
2.2	Mikrobiologiske metoder .....	14
2.2.1	Utplating «Milk plate count agar» (MPCA) .....	14
2.2.2	Renkulturer .....	15
2.2.3	Oppbevaring .....	15
2.3	Fenotyp karakterisering .....	16
2.3.1	GRAM-farging og mikroskopering .....	16
2.3.2	Katalasetest .....	16
2.4	Identifisering ved 16 S rDNA sekvensering .....	16
2.4.1	Isolering av genomisk DNA .....	17
2.4.2	Polymerasekjedereaksjon (PCR) .....	18
2.4.3	Agarosegelelektroforese av PCR-produkter .....	19
2.4.4	Rensing av PCR-produktene .....	20
2.4.5	Sekvensering .....	21
3	Resultater .....	22
3.1	Termoresistente bakterier .....	22
3.1.1	Bakterier og sporer i fersk melk .....	22
3.1.2	Bakterier og sporer i lagret melk .....	24
3.2	Fenotyp karakterisering .....	25
3.2.1	Visuell observasjon BHI buljong, alle uttak .....	25
3.2.2	August uttaket, meieri A .....	26
3.2.3	August-uttaket, meieri B .....	27
3.2.4	September- uttaket, meieri A og B .....	27
3.3	Identifisering ved 16S rDNA sekvensering .....	31
3.3.1	August-uttaket, meieri A .....	32

3.3.2	August-uttaket, meieri B .....	33
3.3.3	September-uttaket, meieri A.....	34
3.3.4	September-uttaket, meieri B.....	34
4	Diskusjon.....	38
4.1	Termoresistente bakterier .....	38
4.1.1	Bakterier og sporer i fersk melk .....	38
4.1.2	Bakterier og sporer i lagret melk .....	40
4.2	Fenotyp karakterisering .....	41
4.2.1	Visuell observasjon BHI buljong, alle uttak.....	41
4.2.2	Mikroskopering, Grams metode og katalase test, alle uttak.....	41
4.3	Identifisering ved 16S rDNA sekvensering.....	42
4.3.1	Isolerte bakterieslekter fra meieri A og B .....	43
4.3.2	Isolerte bakteriearter i fersk melk fra meieri A og B i august .....	44
4.3.3	Isolerte bakteriearter i fersk melk fra meieri A og B i september .....	45
4.3.4	Isolerte bakteriearter i lagret melk fra meieri A og B i august .....	46
4.3.5	Sammenfatning av august og september-uttakene .....	49
4.3.6	Videre arbeid .....	51
5	Konklusjon .....	51
6	Referanser.....	52
	Vedlegg 1. ....	56
	Beregning av glyserol.....	56
	Tillaging av 50xTAE og 1xTAE.....	56
	Vedlegg 2: .....	57
	Rådata.....	57

# 1. Introduksjon

## 1.1 Melk

Melk er næring som pattedyrmoren produserer som mat til sine avkom (Adams og Moss, 2010), og i dagligtale i Norge benyttes ordet «melk» for den melken som kommer fra kua. Melk inneholder i tillegg til vann en rekke viktige komponenter som fett, protein, melkesukker, vitaminer og mineraler. Melk består av mye vann, har en tilnærmet nøytral pH (6,4 – 6,6) og et høyt næringsinnhold noe som gjør det at melken blir lett tilgjengelig for bakterier. Det kreves derfor en høy standard for hygiene under produksjon av melk og melkeprodukter (Adams og Moss, 2010).

I henhold til TINESs årsrapport 2014 har 12 092 ulike norske melkebønder levert i underkant av 1,5 millioner liter melk til TINEs meierier. I Norge har vi et forbruk på omtrent 90 liter melk per person (TINE, 2014).

### 1.1.1 Kilder for/til mikroorganismer i melk

Når melken er inni juret til kuen er den tilnærmet steril, men den blir lett kontaminert under melkeprosessen ved at mikroorganismer på juret og spenene kommer seg lett inn i åpningen på spenene. Disse mikroorganismene vil komme fra at juret har vært i kontakt med jord eller gulvet i fjøsen, eller ved betennelse i jurets melkekjertler. Melk fra en frisk ku har et lavt innhold av bakterier, samt somatiske celler (celletall  $10^2 - 10^3$  cfu/ml<sup>-1</sup>), men ved betennelse i juret vil celletallet i melken bli forhøyet ( $10^8$  cfu/ml<sup>-1</sup>) ved øking av både bakterier og somatiske celler (Adams og Moss, 2010). Av bakteriene som forurensar melk kan flere av disse være med på å redusere holdbarheten til melk- og melkeprodukter (Wouters et al., 2002) og i tillegg vil der være bakterier som er patogene for mennesker og dermed gi sykdommer (Claeys et al., 2013). I tillegg til juret kan også melkingsutstyret være kontaminert med en rekke bakterier og sporer (Buehner et al., 2014), og oppbygging av melkestein i melkeutstyret er også en viktig kilde for forurensning av melk. I tillegg er tilstedeværelse av termoresistente bakterier i pasteurisert melk blitt assosiert med melkestein (Murphy, 1997).



### 1.1.2 Bakteriestammer- og arter i rå melk

Rå melk vil kunne inneholde en rekke bakterieslekter som for eksempel: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*, *Listeria* (Adams og Moss, 2010), *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Brachybacterium*, *Enterobacter*, *Kocuria*, (Vacheyrou et al., 2011) og *Paenibacillus* (Fromm og Boor, 2004). Bakterieslektene som er patogene for mennesker og som kan være tilstede i den ferske melken er for eksempel *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni/coli* og *Mycobacterium tuberculosis* (Adams og Moss, 2010). Personer med nedsatt immunforsvar, kronisk syke, barn og gravide kvinner frarådes derfor å drikke rå melk (Claeys et al., 2013).

Mange arter av *Bacillus*-slekten er patogene for oss mennesker (Gramun, 2012), men det er ikke faren for sykdommer på mennesker som forårsaker de største problemene for meieriindustrien. Det er derimot artene av *Bacillus* som har evnen til dannelsen av enzymer (lipaser og proteaser) som kan gi uønsket lukt og smak i melken og melkeprodukter. Bakterieartene som danner varmostabile enzymer er termoresistente psykrotrofe *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (Chen et al., 2004) og *B. cereus* (Warth, 1980), sammen med den psykrotrofe bakterieslekten *Pseudomonas* (Gilmour og Rowe, 1990). I tillegg til dannelsen av enzymer vil *Bacillus sp.* danne sporer når de utsettes for stress, noe som også er av bekymring for industrien (Chen et al., 2004). For å minimere vekst av psykrotrofe bakterieslekter som for eksempel *Pseudomonas*, utfører ofte meieriindustrien en varmebehandling på den ferske melken før pasteurisering (72 °C, 15 sek). Denne formen for varmebehandling omtales som termisering (63-65 °C, 15 sekunder) og ved drap av bakterieslekten *Pseudomonas* vil en minimere dannelsen av varmostabile enzymer ved videre kjølelagring (Walstra et al., 2005).

Det er som nevnt viktig å ha bakterietallet lavt i melken. Høyt antall av produktødeleggende psykrotrofe bakterier som *Pseudomonas* vil kunne gi en forkortet holdbarhet på pasteurisert melk og andre melkeprodukter. Ved å ha et celletall på 5,5 log cfu/ml av disse bakteriene før pasteurisering og lagring, vil det kunne gi ugunstig lukt og smak den pasteuriserte melken. I tillegg er det vist at produksjon av ost med melk med celletall på 6,5 – 7,5 log cfu/ml av disse bakteriene vil kunne gi et produkt med harsk smak, mens celletall oppimot 7,8 log cfu/ml vil kunne gi en bitter smak på yoghurt (Sørhaug og Stepaniak, 1997). I Norge er det påbudt at alle kommersielle meieriene skal pasteurisere melk som benyttes til konsum og til produksjon av fermenterte produkter.

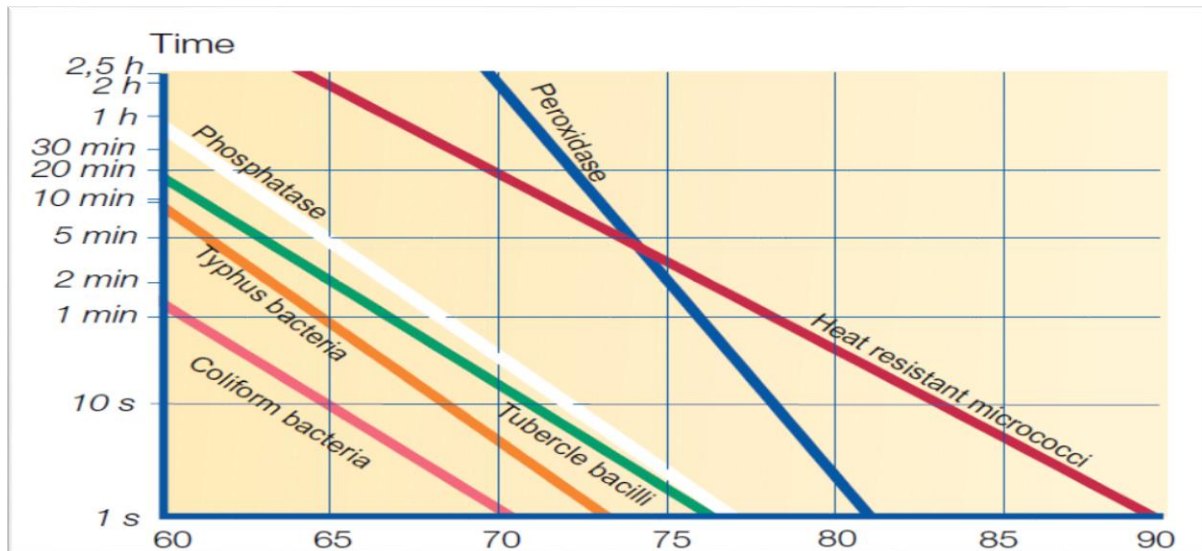
Der er store variasjoner av bakterieinnhold i rå ubehandlet melk gjennom årstidene, der melk fra sommerhalvåret har mindre innhold av mesofile aerobe sporer enn melken som ble analysert om vinteren (Sutherland og Murdoch, 1994) , men ved perioder med mye regn og når jorden er våt vil celletallene være høyere enn ved tørrere dager (Herlin og Andersson, 1996) . Den mest dominerende bakterieslekten er *Bacillus* (Christiansson et al., 1999) og er dominert av artene *B. cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* og *Bacillus thuringiensis*, i form av vegetative celler og sporer (Bartoszewicz et al., 2008). Bakterieslekter som anaerobe som *Clostridium* blir ofte funnet i silo på gårdene. Forholdene inni silo er anaerob og gir dermed gode vekstforhold for denne bakterien (Aureli og Franciosa, 2002) . Om vinteren når kyrne er inne hele tiden vil derfor melken ha et høyere innhold av denne bakterieslekten i melken enn om sommeren når kyrne er ute på beite, sammen med anaerobe og fakultative anaerobe *B. cereus* (Gleeson et al., 2013). *Clostridium* gir problemer i osteproduksjon med smørсыreforgjæring og blåst ost (Walstra et al., 2005)

I tillegg til de uønskede produktødeleggende bakterieslektene- og artene som er tilstede i melken, vil man også finne en rekke bakterier som kan være ønskelig å ha der. Disse bakteriene er mest kjent som melkesyrebakterier (MSB) og vil være mesofile bakterier som vil etablere seg i melken ved lave temperaturer (kjølelagring). MSB er dominert av slektene *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* og *Enterococcus* (Quigley et al., 2011). Hvis man bruker melkesyrebakterier aktivt, vil melkesyrefermentering endre melkens smak, lukt- og tekstur og dermed forlenger melkeproduktenes holdbarhet. MSB er derfor nødvendig for produksjon av en rekke melkeprodukter som ost, kulturmelk, yoghurt o.a.. Uønsket tilstedeværelse av disse bakteriene vil gi «sur» melk ved lagring (Adams og Moss, 2010).

### 1.1.3 Varmebehandling av melk

For å fjerne vegetative bakterieceller (inkludert de patogene bakteriene) blir melken utsatt for varmebehandling. I meieriindustrien brukes «høy temperatur kort tid» pasteurisering som er den vanligste formen for varmebehandling (72 °C i 15 sekunder). Pasteurisering vil ikke fjerne alle bakterieceller, fjerner ikke bakteriesporer og ikke varmestabile toksiner som er tilstede i melken (Claeys et al., 2013). En slik varmebehandling reduserer det totale antallet av bakterier i melken og vil derved gi økt holdbarhet på melken og et tryggere produkt. Når melk blir utsatt for en varmebehandling som pasteurisering, vil noen av bakterieslektene som er tilstede i melken danne en spore i stedet for å dø når temperaturene blir uutholdelige (Gleeson et al., 2013). Sporer som er tilstede i melken før varmebehandlingen kan germinere når melken

varmes opp og bakterien vil da vokse og eventuelt danne toksiner under videre lagring av melken (Claeys et al., 2013). At varmebehandling ikke fjerner alle bakterier er også vist i figur 1. Temperatur og tid er en viktig faktor for eliminering av mange ulike bakterier, og man kan se i figuren at varmeresistente bakterier fra slekten *Micrococcus* vil kunne overleve varmebehandling med høye temperaturer.



Figur 1: Varmebehandlingstemperatur (X-aksen) og tiden (Y-aksen) som er anbefalt for eliminering av en rekke bakterier. Den røde streken indikerer at varmeresistente bakterier som *Micrococcus* vil kunne overleve varmebehandling ved høy temperatur med lang tid (Bylund, 1995)

Ettersom pasteurisering ikke fjerner alle bakterier fra melken (reduserer psykrotrofe- og mesofile bakterier, mens termofile bakterier vil overleve), er det viktig å holde antallet av bakterier i melken på et lavt nivå før melkeprosesseringen starter. Dette kan gjøres ved å ha en god hygiene under melkingen (Gleeson et al., 2013). Juret og spenene vaskes godt og valg av velegnet vaskemetode, vil kunne redusere antall bakterier i melken etter melking (Vissers et al., 2007). *Bacillus* er for eksempel funnet gjennom hele produksjonslinjen på meieriet (fra silo til ferdig tappet melk på kartong) (Svensson et al., 2000).

#### 1.1.4 Varmeresistente bakterier og sporer

Bakterieslektene *Kocuria* (Fromm og Boor, 2004), *Bacillus*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* og *Arthrobacter* er noen eksempler på bakterier som tåler høye temperaturer godt. Av disse bakterieslektene vil kun *Bacillus* ha evnen til å danne sporer når de utsettes for stress (Gleeson et al., 2013), og det har vært vist ifølge Burgess et al. (2010) at en slik sporulering ofte skjer hos *Bacillus sp.* i meieriindustrien.

Som nevnt dannes sporene ved stress som for eksempel høye- og lave temperaturer, tørking og lite næring. Sporer er bakteriens dvaletilstand og dannes for å overleve vanskelige tider. Bakterien lager en spore ved å kopiere dets kromosom som blir omsluttet av en struktur bestående av mange beskyttende lag. Oppbyggingen av denne lagdelte strukturen gjør at sporen er hardfør og vil kunne overleve ekstreme forhold (Gleeson et al., 2013, Madigan et al., 2006).

Den beste metoden for eliminering av sporer på overflater i næringsmiddelindustrien vil ifølge Gramun (2012) være å benytte hypokloritt (pH 7-8) og kvartære ammoniumforbindelser, der hypokloritt har best virkning. Selv ved bruk av hypokloritt er rekontaminering av melk og melkeprodukter etter pasteurisering vanlig i meieriindustrien. Rekontaminering kan skje fra en biofilm bestående av både vegetative celler og sporer dannet på produksjonsutstyr på gården og/eller meieriene. Det er vist at *Bacillus* har evne til å danne biofilm, der sporene fester seg lettest til rustfritt stål i tillegg vil andre bakteriestammer som *Listeria* og *Pseudomonas* kunne overleve i en biofilm (Marchand et al., 2012, Parkar et al., 2001).

Bakterier deles ofte inn i 3 forskjellige grupper med tanke på ved hvilke temperaturer bakterieslektene trives (psykrotrofe, mesofile og termofile) (tabell 1). Tabell 1 viser også hvilke bakterier som er tilstede i fersk og/eller pasteurisert melk, bakteriestammenes metabolisme og om de enkelte bakteriene danner sporer.

Tabell 1: Oversikt over bakterieslekter som kan være tilstede i varmebehandlet melk, ved hvilke temperaturer de vokser, optimumtemperatur, hvilke metabolisme de enkelte slektene har, samt om de har evne til å danne sporer.

	Vokser ved temperaturene °C	Optimum temperatur °C	Bakterieslekter	Referanser
<b>Psykrotrofe termofile</b>	< 0 - 25	≤ 20	<i>Pseudomonas</i> <sup>a</sup> , <i>Bacillus</i> <sup>ad</sup> <i>Clostridium</i> <sup>bd</sup>	(Gleeson et al., 2013) (Adams og Moss)
<b>Mesofile termofile</b>	5 - 50	30 - 37	<i>Bacillus</i> <sup>ad</sup> , <i>Kocuria</i> <sup>a</sup> , <i>Brevibacillus</i> <sup>ad</sup> , <i>Staphylococcus</i> <sup>c</sup> , <i>Microbacterium</i> <sup>a</sup> , <i>Streptococcus</i> <sup>ac</sup> , <i>Brachybacterium</i> <sup>a</sup> , <i>Lactobacillus</i> <sup>be</sup>	(Gleeson et al., 2013) (BacMap, 2015) (Madigan et al., 2006)
<b>Termofile termofile</b>	40 - 60	50 - 55	<i>Bacillus</i> <sup>ad</sup> , <i>Aneurinibacillus</i> <sup>ad</sup>	(Madigan et al., 2006) (Lücking et al., 2013)

a = Aerob metabolisme  
b = Anaerob metabolisme

c = Fakultativ aerob  
d = Sporedanner

e = Aerotolerant

Den dominante bakterieslekten *Bacillus* i pasteurisert melk (Gram-positiv og sporedanner), består for det meste av artene *B. licheniformis* og *B. subtilis* og er dominante sammen med *Bacillus coagulans*, mens artene *Bacillus pumilus* og *B. cereus* er også tilstede i melken men i mindre antall. Med tanke på disse bakterienes tilstedeværelse og eventuell enzymproduksjon vil dette kunne være av stor bekymring for meieriindustrien, spesielt når 67 % av *Bacillus sp.* som er tilstede i melken vil overleve en pasteurisering (Cosentino et al., 1997). I Australsk melkepulverindustri har de problemer med *Anoxybacillus flavithermus* og *Geobacillus ssp* (Flint et al., 2001), mens en artikkel fra Gleeson et al. (2013) forteller at meieriindustrien har problemer og bekymringer med arten *B. cereus*. I tillegg til *Bacillus* vil varmebehandlet melk og melkeprodukter inneholde andre bakteriestammer som: *Streptococcus* (He et al., 2009), *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* (Lücking et al., 2013), *Microbacterium*, *Kocuria* (Fromm og Boor, 2004) og *Brevibacterium* (Ranieri et al., 2009).

I forsøk utført av Fromm og Boor (2004) på fersk melk og lagret melk (14 dager) viser det variasjon av bakteriestammer og variasjon mellom de to lagringsdagene. Den ferske melken hadde et dominerende innhold av *Bacillus* (49 %), der 42 % av isolatene ble identifisert som *B. licheniformis*. Melken inneholdt også andre bakterier som: *Microbacterium lacticum* (30%), *Kocuria varians* (30 %) og *Paenibacillus* (5,7%). Etter 14 dager lagring viser resultatene andre verdier, men omtrent de samme bakteriene er tilstede. For denne melken var *Paenibacillus* blitt den dominerendeslekten med 67 %. De øvrige slektene ble identifisert som *Bacillus* (28 %), der ingen av isolatene var *B. licheniformis*, men 28,6 % av *B. cereus*, *Micrococcus* (2 %) og ingen *Kocuria* tilstede.

Ranieri et al. (2009) fant i sitt forsøk de samme resultatene for fersk melk der *Bacillus* var dominerende og for den lagrede melken var *Paenibacillus* dominerende. I tillegg ble det her funnet *Enterococcus* (1,2%), *Staphylococcus* (1%), *Streptococcus* (0,2%) og *Brevibacillus* (0,2%). Det ble ikke funnet noen Gram-negative bakterieisolater i den pasteuriserte melken.

## 1.2 Identifisering av bakterier

For identifisering av bakterier kan man bruke forskjellige fenotypiske- og molekylære metoder, som benyttes til å klassifisere bakteriene etter slekt, art- og stammenivå. De klassiske mikrobiologiske metodene blir oftest brukt for å kunne «grov» identifisere mikroorganismer. Metodene er dyrkningsavhengige og bygger på fenotypiske egenskaper som for eksempel vekstkrav, morfologi (staver, kokker eller andre former), celleveggs oppbygning (Gram-positiv eller Gram-negativ), morfologien til koloniene (McCartney, 2002), samt bakteriens katalaseaktivitet (Madigan et al., 2006).

De molekylære metodene for DNA sekvensering kan som vist i artikkelen til Quigley et al. (2013) utføres på tre ulike måter og er kulturavhengige metoder, kulturuavhengig metoder og «next generation sequencing» neste generasjon sekvenserings metode. Artikkelen viser også at ved bruk av de forskjellige metodene kan man isolere bakterier som man ikke finner ved de andre metodene. Videre i denne oppgaven er kulturavhengig metode benyttet, og det er fokusert på 16S rRNA genet i bakteriens DNA

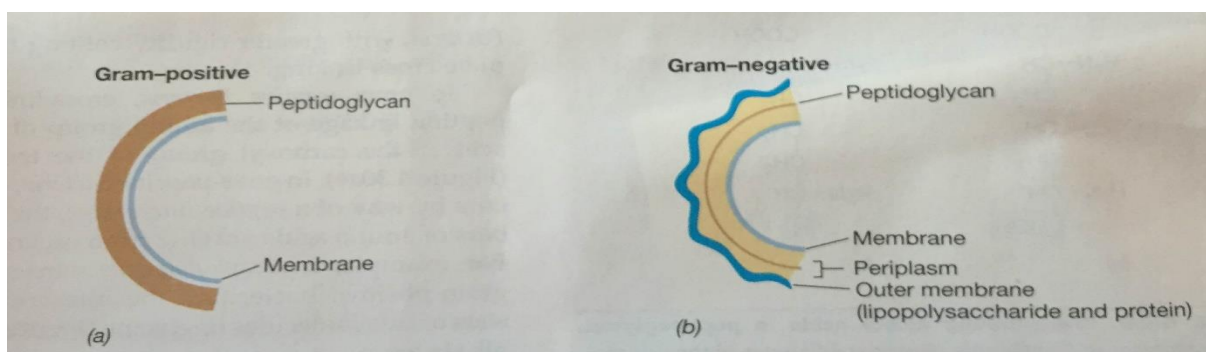
### 1.2.1 Fenotyp identifisering av bakterier

De fenotypiske metodene betegnes som billige, enkle å utføre og med lav brukerterskel, men de er ikke alltid like pålitelige (Temmerman et al., 2004). Metodene har svakheter som for eksempel dårlig reproduksjonsbarhet, dårlig evne til å kunne identifisere bakteriene på arts-nivå (McCartney, 2002) og metodene er i tillegg tidkrevende (Kirschner et al., 2001). Disse metodene kan identifisere isolatene maksimalt til slektsnivå.

#### 1.2.1.1 Gram-farging

Så tidlig som i 1884 oppfant Christian Gram en metode for farging av bakterier og som har fått navnet Gram-farging etter oppfinner. Metoden har siden den gang vært betydningsfull for identifisering av ukjente bakterier. Gram-fargingen vil indikere hvilken oppbygning bakteriens cellevegg har og betegnes henholdsvis som Gram-positive (fiolett) eller Gram-negative (røde) bakterier avhengig av strukturelle forskjeller i oppbygningen av bakteriens cellevegg. De Gram-positive bakteriene har i tillegg til en membran inn mot bakteriens kjerne en tykk cellevegg som består av opptil 25 lag av peptidoglycan, noe som utgjør ca 90 % av bakteriens cellevegg, se figur 2a. Ved fargeprosessen av Gram-positive bakterier vil peptidoglycanlagene i celleveggen dehydrere ved kontakt med etanol og porene lukker seg og medfører at den fiolette fargen fra krystallfiolett blir holdt igjen inne i bakterien. De Gram-negative bakteriene har

derimot en cellevegg bestående av flere komponenter enn de Gram-positive bakteriene. Denne celleveggen består av membran innerst mot kjernen, to lag av periplasma, et tynt lag med peptidoglycan (10%) mellom periplasmalagene og til slutt en ytre membran bestående av lipopolysakkarid og protein, se figur 2b. Når disse Gram-negative bakteriene kommer i kontakt med etanol vil det ikke være noen porer som lukker seg, og den lilla fargen vil bli ekstrahert ut idet også lipidene i cellevegg og cellemembran også ekstraheres ut. Det siste steget i Gram-fargingsmetode, med tilsats av safranin, gir dermed rød farge til de fargeløse Gram-negative bakteriene og hvor de Gram-positive bakteriene forblir fiolette (Madigan et al., 2006). En Gram-positiv bakterie er mer resistente mot varme enn Gram-negative celler (Adams og Moss, 2010). Noen Gram-positive vegetative celler har evnen til å overleve pasteurisering (tabell 1).



Figur 2: Skisse av celleveggs oppbygging av Gram-positive (a) og Gram-negative (b) bakterier (Madigan et al., 2006).

#### 1.2.1.2 Katalase-aktivitet

Hydrogenperoksider er giftige oksygenforbindelser som dannes under respirasjon av de fleste levende organismer. For at organismen skal kunne kvitte seg med disse giftstoffene er det utstyrt med enzymer som angriper hydrogenperoksider og bryter dem ned til ufarlig stoffer. Dette kan for eksempel være enzymet katalase. Man vil finne katalase i alle aerobe og fakultative aerobe mikroorganismer, mens anaerobe mikroorganismer mangler katalase. *Bacillus* og *Micrococcus* som er aerobe organismer, vil for eksempel være katalase positive, mens *Clostridium* og *Streptococcus*, som er henholdsvis anaerobe og aerotolerante vil være katalase negative. Nedbryting av hydrogenperoksid ( $H_2O_2$ ) ved hjelp av enzymet katalase vil danne 2 vannmolekyler og et oksygen molekyl. Ved å teste en bakteriekoloni for om den er katalase-positiv eller katalase-negativ vil man kunne si om bakterien utfører respirasjon eller ikke. En katalase-positiv reaksjon vil boble/bruse når oksygen frigjøres (Madigan et al., 2006).

### 1.2.2 Genotypisk identifisering ved bruk av sekvensering

Når man skal identifisere bakterier med sekvenseringsmetoder må det kun være en bakteriestamme tilstede i kulturen, og det er derfor essensielt å fremstille renkulturer av bakteriearten som skal identifiseres (Madigan et al., 2006).

I 1975 ble primærstrukturen 16S rRNA i et genom forstått og beskrevet for første gang (Woese et al., 1975). Siden den gang har det vært en rask utvikling og forbedring av metodene til identifisering ved hjelp av organismens DNA. Den molekylære metoden 16S rRNA til sekvensering av mikroorganismer blir utført i mange steg. Sekvenseringen er basert på dyrking av bakterien, isolering av genomisk DNA, anrikning av genet som koder for 16S rRNA ved polymerasekjedereaksjon (PCR) før sekvenserings-PCR og behandling av sekvensdata og databasesøk (Watson et al., 2014).

Siden artikkelen til Woese et al. (1975) har det blitt publisert tusenvis av artikler om identifisering av bakterier. Som Weng et al. (2009) viser at man kan benytte bestemte primere for å isolere bestemte sekvenser av genomet til bakterien som for eksempel 16S rRNA genet. I tillegg viser artikkelen PCR amplifisering og identifisering ved sammenlikning av gener i GenBank. 16S rRNA sekvensering er generelt veldig pålitelig til slekts- og artsbestemmelse. Metoden er ikke helt pålitelig når man skal skille mellom arter som er omtrent 100 % identiske i 16S rRNA genet, for eksempel er arter av *Geobacillus* mer enn 99% like (Weng et al., 2009).

#### 1.2.2.1 Polymerasekjedereaksjon (PCR)

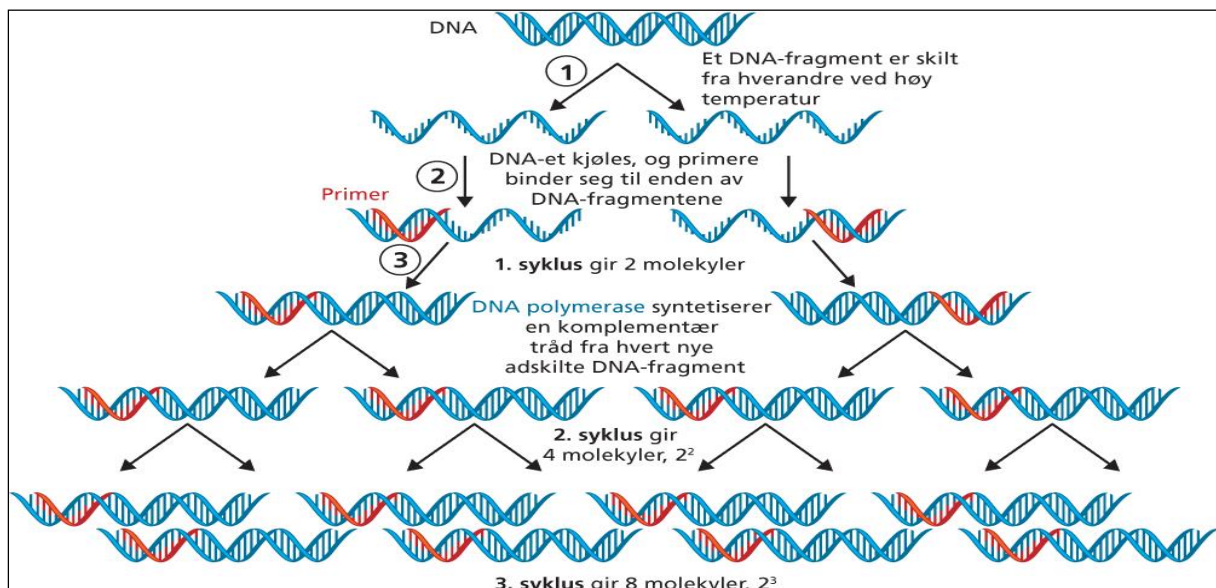
PCR er en metode som benyttes for å mangfoldiggjøre (amplifisere) ønskede sekvenser av et gen. Reaksjonen er biokjemisk hvor en rekke komponenter blir tilført en reaksjonsblanding og replikasjonen av DNA skjer ved bruk av isolert genomisk DNA, uten at vertscellen er tilstede. Amplifiseringsreaksjonsblandingen inneholder komponenter som DNA-templat, to primene der en går fremover (F) og en som går i revers (R), Taq polymerase og dNTP. Det er primerne som «bestemmer» hvilke sekvenser av DNAet som skal amplifiseres (Watson et al., 2014).

En sekvens starter alltid med 5'OH- ender og avsluttes med 3'OH- ender, uansett hvilken retning syntesen foregår i. Primersekvensenes 3'OH- ender er startsignalet for hvor DNA-polymerase kan starte tilføyingen av nye dNTPer (byggesteinene til DNA: dGTP, dATP, dTTP og dCTP) og DNA-templatet bestemmer rekkefølgen av dNPTene (Watson et al., 2014).



For at primerne skal kunne feste seg og starte amplifiseringen må det dobbeltrådet DNA-templatet (dsDNA) denatureres til enkelttrådet DNA (ssDNA). Ved å tilføre varme i reaksjonen (94 °C - 96 °C) vil DNA-trådene separeres og gi to ssDNA-templat. Temperaturen senkes (ca 50 °C - 65 °C) og primerne fester seg til bestemte sekvenser på ssDNA-templatet (primer annealing). Taq DNA-polymerase og dNTP (sammen med en polymerase-buffer) starter elongering av ssDNA-templatene. Det som i grove trekk skjer er at DNA polymerasen setter på plass riktige dNTPer til primer etter «oppskrift» på ssDNA-templatet (primer forlengelse). Elongering vil dermed resultere i dannelsen av 2 dsDNA tråder (Watson et al., 2014).

Amplifiseringen utføres oftest med 20 - 30 repetisjoner og det vil dermed sikre store mengder av den ønskede sekvensen av DNAet (her 16S rRNA genet), og som omtales som PCR-produkt (Watson et al., 2014). Figur 3, hentet fra Grønlien et al. (2008) viser skjematisk hvordan en PCR-reaksjon foregår med eksponentiell mangfoldiggjøring av DNA.

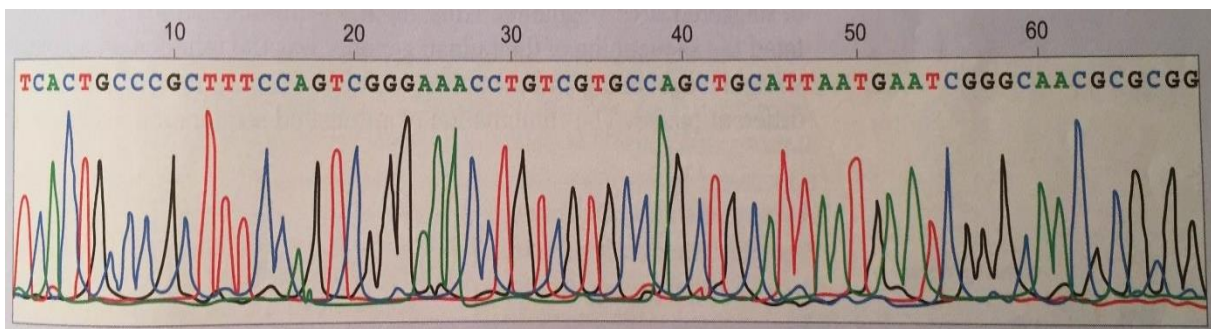


Figur 3: Skjematisk presentasjon av en PCR reaksjon. 1. Denaturering av DNA og dannelse av singeltrådet DNA tråder (ssDNA). 2. Primer fester seg til ssDNA på 3'OH- enden. 3. Polymerase kommer til og starter elongering fra 3'OH- enden til primeren. Det er nå dannet 2 dsDNA tråder i en syklus (Grønlien et al., 2008).

#### 1.2.2.2 Sanger sekvensering

For å kunne identifisere hvilken ukjent bakterie man har, må man foreta en sekvensering av PCR-produktet. Sekvensering er som navnet sier bestemmelse av baserekkefølgen i ønsket DNA-molekyl, her 16S rRNA genet. Dette utføres ved en sekvenserings PCR som inneholder merkede dideoksynukleotider (ddNTP) i tillegg til de vanlig PCR reagensene (DNA templat, DNA polymerase, dNTP) og inneholder kun 1 primer per PCR reaksjon.

Merkingen utføres ved at fluoriserende ddNTP endemerking benyttes, der hver ddNTP får sin farge og terminerer DNA-tråd elongeringen. Sekvensene blir separert ved bruk av en kapilargelelektroforesekolonne, laserdeteksjon og registrering, og benyttes når fragmentene (endemerket med ddGTP, ddATP, ddTTP og ddCTP) blir satt sammen igjen til en sekvens. Dette er illustrert i figur 5. Basen G vil vises som sort, A som grønn, T som rød og C som blå topper i en sekvens (Watson et al., 2014).



Figur 4: Illustrerer hvordan man leser en ferdigstilt sekvens. Hver sekvens er merket med en fluoriserende dideoxynucleotid på endene og sekvensene er deretter separert ved bruk av kapilargelelektroforesekolonne. Dette resulterer i at basen G vises med sort farge og de øvrige med fargene T som rød, A som grønn og C som blå (Watson et al., 2014).

### 1.3 Hensikt med oppgaven

Norske melk- og melkeprodukter har en jevnt over god kvalitet med hensyn på tilstedeværelse av mikroorganismer. Ved Norges største meierikoooperativ TINE blir omtrent 1, 7 % av melken daglig nedgradert (Mellegård, 2015). Uønskede bakterier i melk og melkeprodukter vil kunne gi uønsket lukt, smak, tekstur og farge, og kan i tillegg være patogene for mennesker. Melken som blir nedgradert har en utilstrekkelig kvalitet og gir store økonomiske tap.

Denne oppgaven er en liten del av et stort prosjekt med tittelen «Bakteriefloraen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom», der NMBU og TINE samarbeider. Prosjektet ble dannet for å fremskaffe mer kunnskap om sammensetningen og dynamikken hos bakteriefloraen i norsk melk og melkeprodukter, der resultatene vil kunne være viktige for meierienes arbeid med kvalitetssikring og risikovurdering. Det er med tiden ønskelig å kunne redusere mengde nedgradert melk og annet svinn under og etter produksjonen av melk og melkeprodukter. Prosjektet blir utført ved at prøver samles inn fra forskjellige steder i produksjonen over en lengre periode for å få med årstidsvariasjoner.

Hensikten med denne masteroppgaven er å identifisere termoresistente bakterier i melk fra 2 meierier fra forskjellige steder i produksjonen, samt for melk lagret i kartong i 13 dager. Termoresistente bakterier kan være tilstede i melk og meieriprodukter etter pasteurisering. Det vil bli benyttet dyrkningsavhengige metoder for identifisering av termoresistente bakterier.

## 2. Materialer og metoder

For eliminering av vegetative celler ble melk varmebehandlet ved en høyere temperatur (100 °C i 30 minutter) enn ved pasteurisering (72 °C i 15 sek på meieriet). Disse to varmebehandlingstemperaturene ble benyttet i dette mastergradsforsøket. Det ble også benyttet to forskjellige inkuberingstemperaturer (55 °C i 24-48 timer og 30 °C 48-72 timer) i dette forsøket. For identifisering av bakterieisolater ble det isolert genomisk DNA, som videre ble benyttet for amplifisering av genet som koder for 16 S rRNA. 16 S genet er godt konservert i bakterienes genom og ved å velge universelle primere, vil de fungere på mange ulike bakterier.

### 2.1 Melkeprøver og temperaturregimer

Melken som ble analysert i denne oppgaven kom fra 2 av TINEs meierier (A og B), der melkeprøver ble tatt ut fra følgende steder i produksjonen; silotank/balansetank, silo, ferdigvaretank og kartong. Melken fra kartong ble analysert fersk og etter 13 dager lagring ved to forskjellige lagringstemperaturer. Dette er vist i tabell 2.

Tabell 2: Oversikt over de ulike stedene i produksjonen (1-5) melkeprøvene er hentet ut, om melken ble analysert fersk eller har vært lagret, temperaturer og antall prøver tatt fra hvert uttakssted i produksjonen.

Nummer	Uttakssted	Lagring	Temperatur	Antall (stk)
1	Silotank (A)	Fersk	4 °C	1
1	Balansetank (B)	Fersk	4 °C	1
2	Ferdigvaretank	Fersk	4 °C	1
3	Kartong	Fersk	4 °C	3
4	Kartong	13 dager	4 °C	3
5	Kartong	13 dager	8 °C	3

Varmebehandling: 72 °C, 15 sekunder, ble utført ved meieriene med unntak av prøve 1 der pasteuriseringen ble utført på laboratoriet på NMBU (63 °C i 30 minutter). Betegnes som vanlig pasteurisering.

100 °C, 30 minutter, utført på laboratoriet på NMBU før utplating

Inkubering: 30 °C, 48 – 72 timer

55 °C, 24 – 48 timer

Som vist i tabell 3 ble melken fra alle prøvestedene varmebehandlet ved to forskjellige temperaturer og tider (72 °C, 15 sekunder eller 63 °C, 30 minutter og 100 °C, 30 minutter) før

videre utplating og inkubering ved to temperaturer (30 °C og 55 °C), noe som gir 4 forskjellige regimer; 72 °C/63 °C:30 °C, 72 °C/63 °C:55, 100 °C:30 °C og 100 °C:55 °C. Det ble støpt parallelle skåler av alle prøvene.

Tabell 3: Oversikt over uttakssted av melkeprøver i produksjonen, hvilken form for varmebehandling melken har tatt før utplating og inkuberingsbetingelser for skåler.

Nr	Uttakssted	Varmebehandling			Inkuberingsbetingelser	
		63 °C, 30 min	72 °C, 15 sek	100 °C, 30 min	30 °C	55 °C
1	Silotank (A)	X		X	X	X
1	Balansetank (B)	X		X	X	X
2	Ferdigvaretank		X	X	X	X
3	Kartong		X	X	X	X
4	Kartong		X	X	X	X
5	Kartong		X	X	X	X

## 2.2 Mikrobiologiske metoder

### 2.2.1 Utplating «Milk plate count agar» (MPCA)

Melk ble hentet og oppbevart ved 4 °C inntil prøveuttak, omtrent 24 timer etter prøvene ble tatt ut på meieriene. «Milk plate count agar» MPCA (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) ble tillaget i henhold til produsentens instruksjoner. Fortynningene  $10^0$  og  $10^{-1}$  av melken ble benyttet for alle temperaturregimer med unntak av 13 dager lagret melk på kartong 72 °C:30 °C, der det ble brukt fortynningene  $10^{-3}$  og  $10^{-4}$ . Fortynningsrekke laget med Ringers løsning (Oxoid LTD, Basingstoke, England) og tilberedning av løsningen ble utført i henhold til produsentens instruksjoner. Prøvene ble forsiktig blandet med omtrent 15 ml MPCA i petriskålene. Det ble støpt et lokk på den innstøpte agaren for at minst mulig luft skulle komme til å hindre vekst av spredere. Dette gav omtrent 20 ml MPCA per skål. Skålene ble inkubert etter angitte temperaturregimer som er nevnt over. Etter endt inkubering ble antall kolonier telt direkte, eller skålene ble lagret kjølig (4 °C) til telling og videre analysering. Resultatet ble oppgitt som log «colony forming units» (cfu)/ml.

Av bakteriene som hadde vokst frem etter endt inkubering, ble maksimum 5 kolonier fra hvert temperaturregime og for hvert prøvested i produksjonen (1 – 5) plukket for videre analysering. Antall kolonier som ble plukket ble bestemt ut fra hvor mye vekst det var på hver skål. Fra skåler med vekst av > 40 kolonier ble det plukket 5 kolonier og for skålene med lite vekst (1 – 3 kolonier) ble alle koloniene plukket. Det ble i dette forsøket analysert 394 kolonier.

### 2.2.2 Renkulturer

«Brain heart infusion» (BHI) -buljong (Oxoid) ble laget i reagensrør med topp (2 ml) og autoklavert etter produsentens instruksjoner. Ettersom det var varierende vekst av bakterier ved de forskjellige uttaks-stedene i produksjonen ble det derfor ulike plukket mengder kolonier for hvert sted i produksjonssted. Det ble totalt plukket 393 kolonier fra MPCA skålene for dyrking i buljongen ved hjelp av sterile podeøser (Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland). Rørene med bakteriekoloni ble inkubert ved samme temperatur som skålen den var isolert fra (30 °C og 55 °C) i 24-48 timer. Av de totalt 393 plukkede kolonier ble det påvist synlig vekst i 326 rør og disse ble videre strøket ut på BHI-agar.

For undersøkelse om bakteriekulturene var rene ble det brukt skåler med BHI-agar tillaget ved å tilsette agar (12 g/l) (Oxoid) til BHI-buljong. Videre ble denne tillaget som for BHI-buljong. Bakteriekulturene ble strøket ut på BHI skåler med steril podenål og inkubert ved respektive 30 °C og 55 °C i 24 – 72 timer.

### 2.2.3 Oppbevaring

Ettersom det var mange prøver som skulle håndteres i denne oppgaven var det viktig å lagre dem på best mulig måte for at bakteriekulturene ikke skulle bli ødelagt før identifisering ved 16 S rDNA sekvensering.

De rene bakteriekulturene ble sterilt podet fra BHI-skål til reagensrør med 2 ml BHI-buljong. Buljongen med bakteriekultur ble inkubert med de respektive temperaturene til det ble vist god vekst i røret (24 – 48 timer).

Ved påvist vekst, ble 750 µl bakteriekultur og 250 µl 60 % glyserol (Merck) sterilt overført til et sterilt kryo-rør. Rørene med BHI-renkultur inneholdende 15 % glyserol (v/v) ble satt i – 20 °C fryser i noen dager (minimum over natten) for mellomlagring og deretter overført til – 80 °C fryser. Her ble prøvene oppbevart inntil videre analysering ble utført.

For beregning av mengde bakteriekultur og 60 % glyserol som skulle overføres til kryo-rørene ble følgende utregning benyttet:  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

$C_1$ = konsentrasjon opprinnelig løsning (her glyserolkonsentrasjon oppgitt i %).  $V$ = volum (her oppgitt i µl). For utregning, se vedlegg 1, Beregning av glyserol.

## 2.3 Fenotyp karakterisering

### 2.3.1 GRAM-farging og mikroskopering

Renkulturer fra BHI-skåler ble benyttet. I alle skålene som viste vekst av kolonier, ble en koloni utvalgt (der det var mulig) til GRAM-farging etter Grams metode og mikroskopering. I de BHI-skålene som viste kolonier med ulik morfologi ble det tatt A og B prøver. Etter GRAM-farging ble prøvene undersøkt i et Leica mikroskop (Leica DM750, Heerbrygg, Tyskland) med tilhørende 100x/1,25 olje objektiv. Mikroskopet hadde et innebygd kamera for bildetakning. Mikroskoperingen ble brukt for å undersøke om kulturene var rene og ved tegn på urenheter ble det podet til ny buljong og videre utstrykning på en ny skål. Mikroskoperingen og spesielt bildene derfra ble benyttet til å undersøke om det var noen likheter og/eller ulikheter mellom bakteriene som kom fra de forskjellige temperaturregimene, og til å bestemme hvilke av prøvene som skulle velges ut til sekvensering.

### 2.3.2 Katalasetest

Katalasetest ble utført på alle koloniene som ble GRAM-farget. En liten mengde bakterier ble overført ved hjelp av podenål fra BHI skålen og blandet sammen med en liten dråpe 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) på et objektglass. De katalase-positive bakteriene ble identifisert ved at blandingen begynte å danne gass og det viste bobler i blandingen. De katalase-negative bakteriene viste derimot ingen gassdannelse.

## 2.4 Identifisering ved 16 S rDNA sekvensering

I denne oppgaven skulle maksimum 100 prøver analyseres med tradisjonell Sanger sekvensering. Det ble derfor foretatt en vurdering av hvilke av de 326 prøvene som skulle sendes til sekvensering. Etter utvelgelsen resulterte det i 72 prøver fra uttaket i august (fersk og lagret melk) og 28 prøver fra uttaket i september (fersk melk). Før de utvalgte prøvene kunne sendes til sekvensering, måtte de gjennom en rekke forbehandlinger, og disse er beskrevet under.

### 2.4.1 Isolering av genomisk DNA

De utvalgte rene og nedfrosede bakteriekulturene ble benyttet for isolering av genomisk DNA. 10 µl (fra -20 °C) / en podeskje (fra -80 °C) bakteriekultur ble overført til reagensrør med 5 ml BHI-buljong i sterilbenk. Rørene ble inkubert ved de respektive temperaturene de har hatt gjennom hele forsøket (30 °C og 55 °C) i 12-48 timer. Etter påvist vekst ble bakteriekulturene mikset ved bruk av Vortex-Genie 2 (USA Scientific, Orlando) i noen sekunder før overføring til et cellstar rør (Greiner bio-one, Kremsmünster, Østerrike) og sentrifugering i Kubota sentrifuge (Kubota, Model 2010, Tokyo, Japan) med hastighet 3500 rpm i 10 minutter ved romtemperatur. Supernatanten ble helt av og bakteriepelleten i bunnen av røret ble benyttet videre i isoleringsprosessen.

For isolering av genomisk DNA ble det benyttet E.Z.N.A. ® Plasmid DNA Mini Kit I (OMEGA bio-tek, Norcross, Georgia). Bakteriepelleten ble resuspendert i 400 µl Solution I/RNase A. Mengde Solution I/RNase A ble forhøyet fra 250 µl til 400 µl for hver prøve for at minst 250 µl væske skulle kunne pipetteres av etter knuseprosessen. Bakteriecellene i pelleten ble knust ved hjelp av Fast-Prep metoden. Dette ble utført ved at 0,4 – 0,5 g syrevaskede «glass beads» ( $\leq 160 \mu\text{m}$ ) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) ble veid inn i et FastPrep-rør (MP Biomedicals LLC, Illkirch, Frankrike) før resuspenderte bakterier ble overført til røret. Knusing av bakteriecellene ble utført i et FastPrep®-24 Instrument (MP BioMedicals LLC), med hastighet 6 m/s i 20 sekunder. De øvrige stegene i isoleringsprosessen ble utført i henhold produsentens instruksjoner (OMEGA bio.tek). Sentrifugen Centrifuge 545D (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ble benyttet for alle sentrifugeringstrinnene ved isoleringen av genomisk DNA.

Etter endt isolering ble konsentrasjonen av DNA i prøvene bestemt ved hjelp av NanoDrop spektrofotometer (ND 2000 UV-VIS Spectrophotometer) (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Prøvene ble deretter oppbevart i fryseskap (- 20 °C) til videre analyser ble gjennomført.



### 2.4.2 Polymerasekjedereaksjon (PCR)

For at amplifiseringen av DNAet skal bli vellykket og resultere i rikelig mengde av genet som koder for 16S rRNA (PCR-produkt), ble det valgt ut følgende primere til reaksjonen. Den ene primeren går fremover (F) og den andre i revers (R), her 11 F og 5 R, se tabell 4.

Tabell 4: Oversikt over primere anvendt i denne oppgaven, primernes sekvens og hvilket del av bakteriens genom som skal amplifiseres, her 16S rRNA av DNA.

Primer	Mål	Sekvens
<b>11 F</b>	16S rDNA	<i>E. coli</i> posisjoner 50-70 F 5' - TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG -3'
<b>5 R</b>	16S rDNA	<i>E. coli</i> posisjoner 1492-1510 R 5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'

Tilberedning av reaksjonsblanding for PCR (50 µl) ble utført i henhold til retningslinjer fra New England Biolabs. Det ble laget en miks av de seks øverste komponentene, der mengde dH<sub>2</sub>O ble beregnet som eksemplet under (\*), se tabell 5.

Tabell 5: Reagenser benyttet for PCR amplifisering, konsentrasjon for hver reagens og volum tilsatt hver reaksjonsblanding.

Reagenser	Konsentrasjon	Volum tilsatt
One Taq reaksjonsbuffer (New England Biolabs)	5X	10 µl
dNTP (New England Biolabs)	10 mM	1 µl
Primer 1 (11 F)	10 mM	1 µl
Primer 2 (5 R)	10 mM	1 µl
One Taq DNA Polymerase (New England Biolabs)	1X	0,25 µl
dH <sub>2</sub> O	-	(?)*
DNA-templat	Varierende	1-5 µl**

\* Mengde dH<sub>2</sub>O ble beregnet ut fra hvor mye av de andre komponentene ble benyttet.

Eksempel: De 5 første punktene tilføres som nevnt over sammen med 3 µl DNA templat i røret, dette blir 16,25 µl. Totalt skal det være 50 µl i PCR-røret og da skal det her i dette eksemplet tilføres 33,75 µl dH<sub>2</sub>O.

\*\* Mengde DNA-templat (ng/ µl) som ble tilsatt hvert PCR-rør: < 100 ng/ µl = 5 µl templat, > 100 ng/ µl = 4 µl templat, > 200 ng/ µl = 2 µl templat

PCR-rørene ble lett sentrifugert i minisentrifuge fra BioNordica (BioNordica, Oslo, Norge), dette for å tvinge komponentene nederst i røret og bli godt blandet. Amplifiseringen ble utført med Peltier Thermal Cycler (PTC) –200 DNA Engine (MJ Research, Watertown, USA). PCR-program i denne analysen ble utført omtrent som anbefalt fra New England Biolabs, med unntak av steg 1 som ble forlenget fra 30 sekunder til 3 minutter. Dette fordi en lengre periode med denaturering av DNAet er ønsket, se tabell 6.

Tabell 6: Oversikt over PCR-program benyttet i denne oppgaven. Tid, temperatur og antall repetisjoner er angitt for hvert trinn som ble utført i syklusen.

<b>Program</b> <b>Trinn i syklusen</b>	<b>Tid (Sekunder)</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Repetisjoner</b>
For denaturering	180	96	1
Denaturering	15	94	30
Hybridisering	30	55	
Polymerisering	90	68	
Siste Polymerisering	300	68	1
Hold	Evig	4	—

### 2.4.3 Agarosegelelektroforese av PCR-produkter

For undersøkelse om reaksjonen var vellykket ble PCR-produktet analysert ved hjelp av agarosegelelektroforese. Amplifiseringen skal resultere i dannelsen av 16S rDNA-molekyler med størrelse mellom 1,4 – 1,5 kb, avhengig av hvilke primere som benyttes i amplifiseringen.

Det ble det brukt 50 ml 1% agaroseløsning til hver gelstøpning. Gelen ble laget ved hjelp av følgende resept og utført i henhold til standard prosedyre, vist i tabell 7.

Tabell 7: Resept for lagning av 50 ml 1 % agaroseløsning. De forskjellige komponentene er angitt med volum for hver støpning.

<b>Komponenter</b>	<b>Volum</b>	<b>Produsent</b>
Agarose	0,5 g	SeaKem® LE Agarose, Lonza, Rockland ME USA
1xTAE	50 ml	Merck
Gel Green nucleic Acid stain	2 µl	New England Biolabs

Resept for utblanding av 50xTAE stamløsning og formel benyttet til fortynning av 50xTAE til 1xTAE, se vedlegg 1, Tillaging av 50xTAE og 1xTAE.

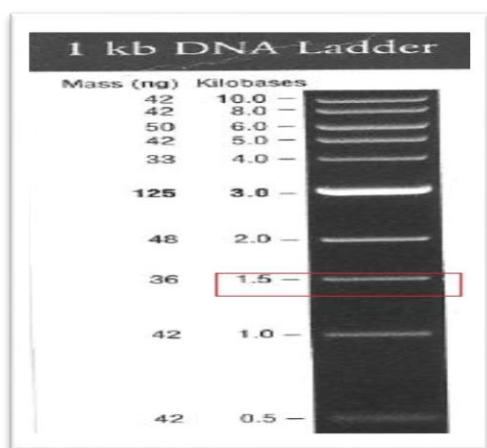
Gel Green nucleic Acid stain (New England Biolabs) ble tilsatt agarosegelløsningen rett før overføring til støpeform (7x10 cm) med brønn-kam.

For å kontrollere at amplifiseringen ga riktig molekyllstørrelse ble 3 µl 1kb DNA ladder (New England Biolabs) påsatt i første brønn på gelen. Alle PCR-produktene ble tilberedt med følgende komponenter, se tabell 8, i et nytt PCR-rør (totalt 10 µl), og sentrifugert lett i minisentrifuge før påsetting i gel.

Tabell 8: Resept for klargjøring av PCR- produkt til kjøring på gel. Følgende komponenter tilstede i blandingen, konsentrasjon, samt volum for hver komponent.

Komponenter	Konsentrasjon	Volum	Produsent
Gel Loading Dye Blue	6X	1 µl	(New England Biolabs)
PCR- produkt	-	3 µl	(Merck)
Sterilt dH <sub>2</sub> O	-	6 µl	(New England Biolabs)

10 µl PCR-produkt blanding ble overført i hver sin brønn i agarosegelen. Elektroforesen ble kjørt ved 90V i 30 minutter (PowerPac 300, BioRad) i et elektroforesekar (BioRad), med 1xTAE buffer. Alle ferdigkjørte geler ble tatt bilde av i et GelDoc TM MP System (BioRad). Det var ønskelig at gel-kjøringen skulle vise resultater som vist i figur 5.



Figur 5: DNA molekyllvektstandard (1 kb ladder, New England Biolabs) benyttet ved kjøring av PCR-produkt på gel. Størrelse på PCR-produktene forventes å være 1,4-1,5 kb, som markert ved rød firkant på figuren.

#### 2.4.4 Rensing av PCR-produktene

Videre ble PCR-produktene rensset ved hjelp av E.N.Z.A® Cycle Pure Kit (Omega Bio-tek). Rensingen utføres for hovedsakelig å fjerne primere, men også andre komponenter som; nukleotider, enzymer, salter og andre urenheter. Rensingen ble utført i henhold til produsentens instruksjoner. Etter endt rensing ble mengde DNA i hver prøve målt med instrumentet NanoDrop spektrofotometer (Thermo Scientific).

### 2.4.5 Sekvensering

Sekvensering av de rensede PCR-produktene ble utført av GATC Biotech (GATC Biotech AG, Cologne, Tyskland) og ble klargjort i henhold til GATCs instruksjoner før sending. Prøvene ble tillaget i eppendorpfrør og i 96 brønns-plater og merket med forhåndsbestilte Lightrun strekkoder til rør og brønn-plater før sending. Volumet for hver av komponentene ble beregnet og overført i hvert rør (totalt volum; 10 µl i hvert rør) som vist under. Hver prøve ble tillaget i to rør til forsendingen, der kun én primer ble tilført hvert rør, se tabell 9.

*Tabell 9: Resept for klargjøring av PCR- produkt til forsending. Følgende komponenter tilstede i blandingen, der kun én primer blir tilført hvert rør, konsentrasjon for primere, samt volum av primer for hvert rør. Volum for de øvrige komponentene regnes ut i henhold til mengde DNA i prøven.*

Komponenter	Konsentrasjon	Volum
DNA	*	**
Primer 11F	10 mM	1 µl
Primer 5R	10 mM	1 µl
Sterilt dH <sub>2</sub> O	-	***

\* Konsentrasjon av DNA varierte mellom alle prøvene (5 – 50 ng/ µl)

\*\* Volum DNA ble beregnet ut fra mengde DNA i prøven etter rensing.

Hvert prøverør skulle inneholde 20 – 80 ng/ µl DNA.

\*\*\* Volum dH<sub>2</sub>O ble beregnet ut fra volum av DNA og Primer i prøven.

Eksempel: 2 µl DNA og 1 µl Primer. Dette gir et volum av 7 µl dH<sub>2</sub>O per rør.

Etter at sekvenseringen av prøvene var fullført og sekvensene mottatt fra firmaet GATC ble det utført en rekke prosesser med sekvensene, før de to sekvensene som tilhørte samme prøve kunne kobles sammen. Ved hjelp av dataprogrammet BioEdit Sequence Alignment Editor (BioEdit, versjon 7.2.5) (Hall, 1999) ble sekvensene først «trimmet» (det vil si fjerne «dårlige områder» i begynnelsen og endene av sekvensene). De to tilhørende sekvensene ble deretter koblet sammen med «CAP contig assembly program Interface» i BioEdit. Resultatet blir da en contig -0 sekvens som ble kopiert i Fasta format og limt inn i databasen BLAST «Basic Local Alignment Search Tool» (BLAST, 2015). BLAST er en GenBank database der gen sekvenser sammenliknes med andre publiserte gen sekvenser. Et BLAST søk gir et forslag med sannsynlighetsgrad for hvilke bakterieslekter og arter prøven inneholder, og gir i tillegg en skår «query cover» for hvor mye av genet som er dekket i identifiseringen (%) og hvor mye av det dekkede genet er identifisert som den gjeldende bakterien (%). Alle resultater fra BLAST for indentifiserte bakterier i denne oppgaven er gitt med både skår og identitet på  $\geq 97$  %.

### 3 Resultater

Melk fra 2 av TINEs meierier (A og B) ble analysert med hensyn til antall bakterier og sporer tilstede i melken før og etter lagring, samt at utvalgte isolat fra utplatingen ble identifisert. Resultater fra utplating av fersk og lagret melk er gitt i kolonidannede enheter cfu/ml. Rådata fra hele forsøket er vist i vedlegg 3, tabellene I, II, III, IV, V og VI

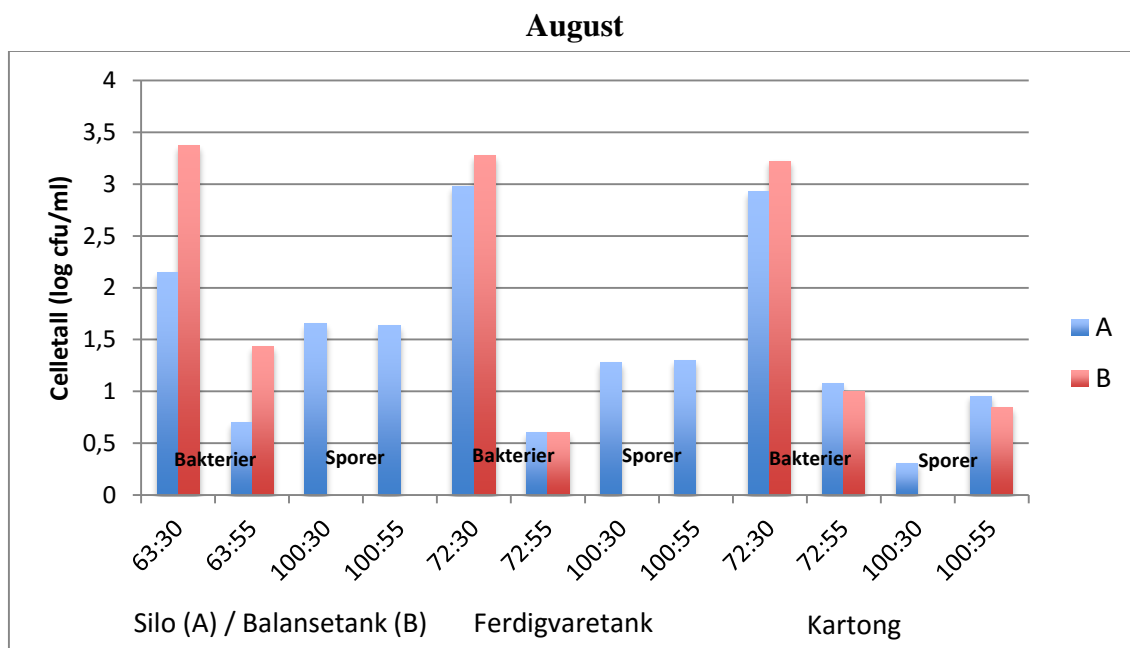
#### 3.1 Termoresistente bakterier

##### 3.1.1 Bakterier og sporer i fersk melk

###### August

I den ferske pasteuriserte melken fra uttaket i august ble det vist vekst av bakterier og sporer fra de fleste stedene i produksjonen, det vil si i både silo og balansetank, ferdigvaretank og kartong. For mesofilt temperaturregime 63 °C/72 °C: 30 °C ble det registrert generelt mer vekst av mesofile termoresistente bakterier fra meieri B (antall bakteriekolonier fra 3,22 – 3,73 log cfu/ml), enn fra meieri A som viste antall bakteriekolonier fra 2,15 – 2,98 log cfu/ml, dette gjaldt for alle stedene i produksjonen. Pasteuriserte melkeprøver som hadde vært inkubert ved 55 °C viste mindre vekst enn dem som var inkubert ved 30 °C, se figur 7. Nivået av termofile termoresistente bakterier varierte mellom 0,7 - 1,1 log cfu/ml på meieri A og mellom 0,6 – 1,4 log cfu/ml på meieri B.

Som figur 7 også viser, ble det registrert germinering av mesofile og termofile sporer fra de fleste stedene i produksjonen fra melken hentet fra meieri A i augustuttaket (celletall 1,65 – 0,95 log cfu/ml), unntatt i melk fra kartong med temperaturregimet 100 °C: 30 °C, hvor det omtrent ikke ble registrert germinering av mesofile sporedannere (0,3 log cfu/ml). Nivå av mesofile og termofile sporedannere var identisk i melk fra silo/balansetank og ferdigvaretank fra meieri A, henholdsvis 1,5 og 1,3 log cfu/ml. Melken fra meieri B viste ingen germinering av mesofile og termofile sporer med unntak av melk fra kartong med temperaturregimer 100 °C: 55 °C (celletall 0,85 log cfu/ml).

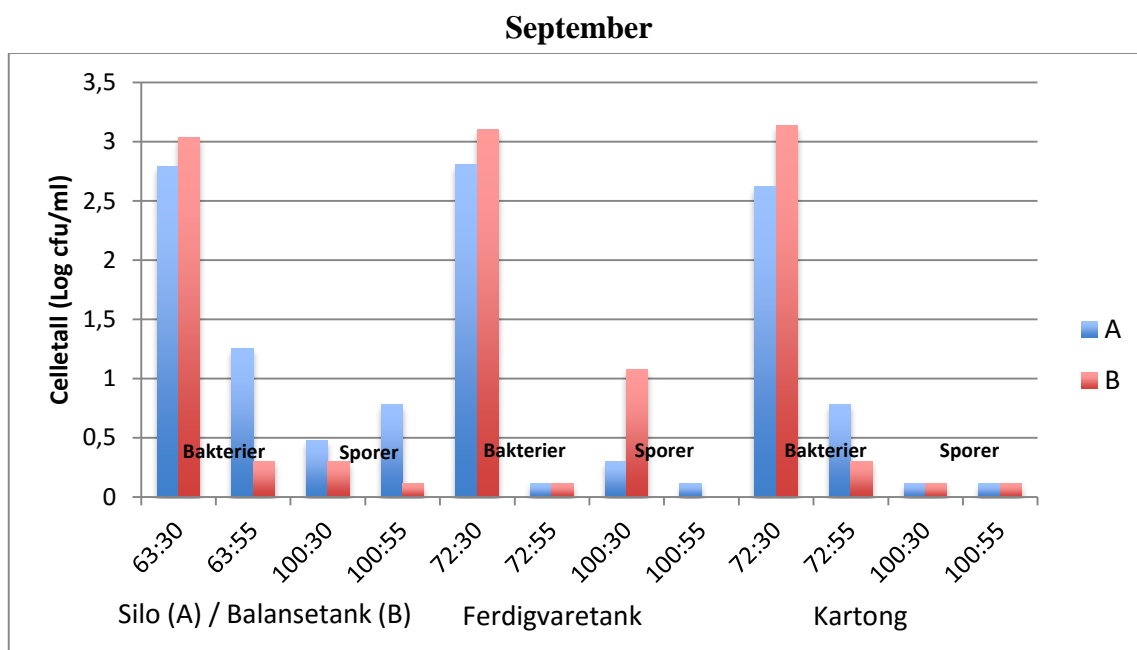


Figur 6: Termoresistente bakterier og sporer i fersk melk fra august ved ulike varmebehandlinger og inkuberingsbetingelser benyttet. Figuren angir de forskjellige uttaksstedene i produksjonen med silo for meieri A og balansetank for meieri B, ferdigvaretank og kartong. X-akse: Første tall angir varmebehandling og tall etter kolon inkuberingstemperatur. Varmebehandling: 63 °C i 30 min, 72 °C i 15 sek eller 100 °C i 30 min hvor 63 og 72 °C varmebehandling angir bakterietall og 100 °C varmebehandling angir sporetall. Inkuberingstemperatur: 30 °C eller 55 °C angir henholdsvis mesofilt termoresistent celletall og termofilt termoresistent celletall (hvor celletallet kan angi både bakterier og sporer avhengig av temperaturbehandling).

## September

For den ferske pasteuriserte melken fra septemberuttaket ble det registrert vekst av termoresistente bakterier og sporer for alle uttaksstedene i produksjonen, men betydelig lavere antall termofile termoresistente bakterier enn antall mesofile termoresistente bakterier, se figur 8. Temperaturregimet 63 °C/ 72 °C: 30 °C for begge meieriene viste mesofilt celletall mellom 2,62 og 3,14 log cfu/ml, der melken fra meieri B hadde mest vekst av mesofile bakterier (3,04 - 3,14 log cfu/ml). Pasteuriserte prøver inkubert ved 55 °C, det vil si termofile termoresistente bakterier, hadde lavere vekst av bakterier med celletall 0,30 - 1,26 log cfu/ml. Melken fra meieri A hadde større vekst av termofile bakterier i silotank og kartong, samt mesofilt og termofilt sporetall i silotank enn tilsvarende melk fra meieri B.

Som også vist i figuren ble det registrert germinering av termoresistente sporer for alle uttaksstedene og alle temperaturregimene med sporetall meieri A: 0,04 - 0,78 log cfu/ml og meieri B: 0,04 - 0,30 log cfu/ml, unntatt i melk fra ferdigvaretanken på meieri B (100 °C og inkubert ved 55 °C) hvor det ikke ble registrert noen germinering av sporer.



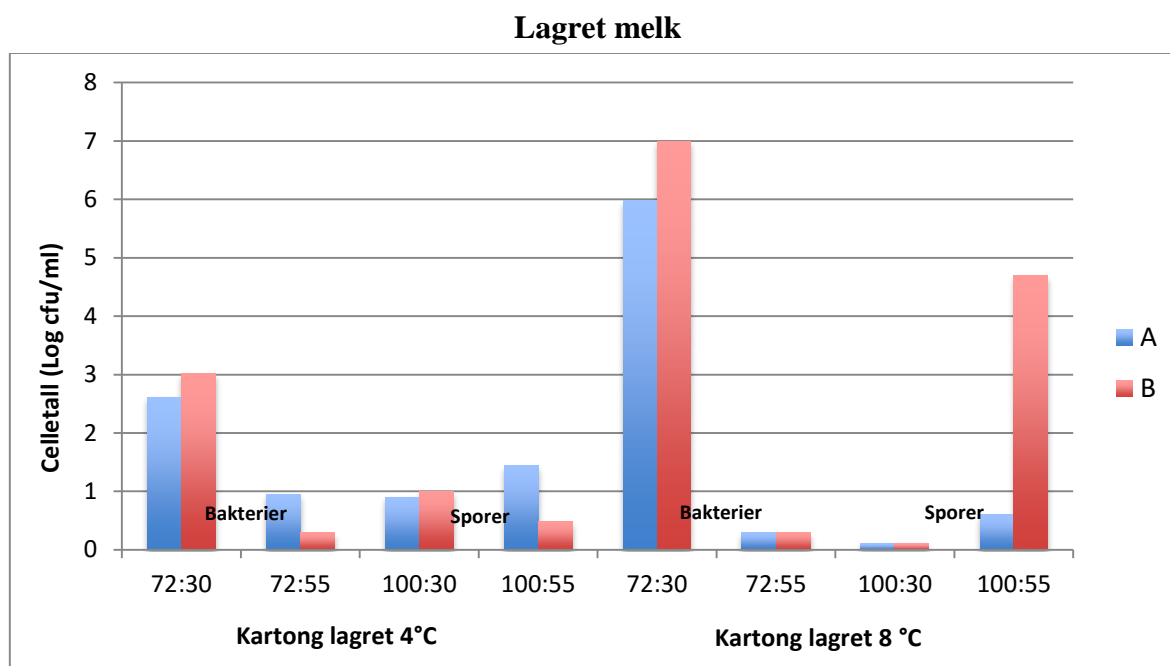
Figur 7: Termoresistente bakterier og sporer i fersk melk fra september ved ulike varmebehandlinger og inkuberingsbetingelser benyttet. Figuren angir de forskjellige uttaksstedene i produksjonen med silo for meieri A og balansetank for meieri B, ferdigvaretank og kartong. X-akse: Første tall angir varmebehandling og tall etter kolon inkuberingstemperatur. Varmebehandling: 63 °C i 30 min, 72 °C i 15 sek eller 100 °C i 30 min hvor 63 og 72 °C varmebehandling angir bakterietall og 100 °C varmebehandling angir sporetall. Inkuberingstemperatur: 30 °C eller 55 °C angir henholdsvis mesofilt termoresistent celletall og termofilt termoresistent celletall (hvor celletallet kan angi både bakterier og sporer avhengig av temperaturbehandling).

### 3.1.2 Bakterier og sporer i lagret melk

Analyser utført på melk tappet i kartong, lagret i 13 dager, resulterte i funn av bakterier og sporer ved begge lagringstemperaturene (4 °C og 8 °C) etter ulike varmebehandlings-temperaturer og inkuberingstemperatur ved begge meieriene.

For begge lagringstemperaturene og ved begge meieriene ble det observert mer vekst av mesofile bakterier enn termofile bakterier, se figur 9. I tillegg ble det observert et betydelig høyere mesofilt celletall i melk lagret i kartong ved 8 °C enn melk lagret ved 4 °C. Melk lagret ved 8 °C, varmebehandlet (72 °C) og inkubert (30 °C), viste et mesofilt celletall i melk fra meieri A på 5,98 log cfu/ml og fra meieri B på 7 log cfu/ml, mens melken lagret ved 4 °C hadde et celletall i melk fra meieri A: 2,62 log cfu/ml og fra meieri B på 3,02 log cfu/ml.

Figur 9 viser også vekst av germinerte sporer, både mesofile og termofile ved begge lagringstemperaturene og ved begge meieriene. Alle temperaturregimene viste lav vekst av germinerte sporer (celletall 0,11 – 1,45 log cfu/ml), unntatt melk fra meieri B lagret ved 8 °C som viste et termofilt sporetall på 4,70 log cfu/ml.



Figur 8: Termoresistente bakterier og sporer i lagret melk fra august ved ulike varmebehandlinger og inkuberingsbetingelser benyttet. Figuren angir de forskjellige de forskjellige lagringstemperaturene (4 °C og 8 °C). X-akse: Første tall angir varmebehandling og tall etter kolon inkuberingstemperatur. Varmebehandling: 72 °C i 15 sek eller 100 °C i 30 min hvor 72 °C varmebehandling angir bakterietall og 100 °C varmebehandling angir sporetall. Inkuberingstemperatur: 30 °C eller 55 °C angir henholdsvis mesofilt termoresistent celletall og termofilt termoresistent celletall (hvor celletallet kan angi både bakterier og sporer avhengig av temperaturlagring).

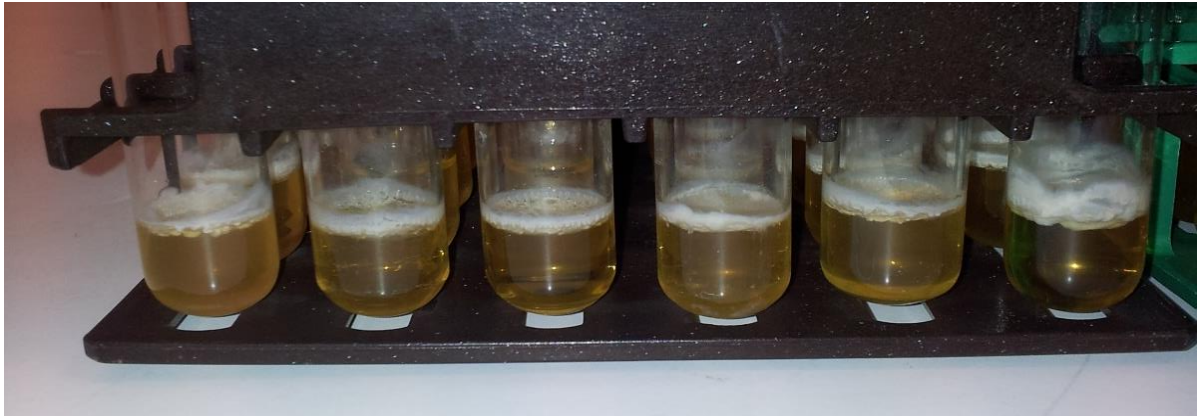
## 3.2 Fenotyp karakterisering

### 3.2.1 Visuell observasjon BHI buljong, alle uttak

Av totalt 393 kolonier som ble dyrket i buljong for isolering av renkulturer ble det påvist vekst i 326 rør. Ved videre analysing ble ytterligere 6 isolat ikke tatt med, noe som resulterte i et utvalg på 320 isolater til fenotyp karakterisering.

Som vist i figur 9 ble det registrert vekst i form av et hvitt belegg på toppen av BHI buljongen etter endt inkubering. Av de totalt 320 isolatene, viste 145 av dem hvitt belegg på toppen av BHI buljongen som vist i tabell 10, 11 og 12, hvorav 42 av disse ble sendt til 16S rRNA sekvensering. Totalt 63 av isolatene kom fra mesofilt temperaturregime (63 °C/72 °C:30 °C), der de fleste var isolert fra septemberuttaket. De øvrige isolatene med hvitt belegg kom fra varmebehandling ved 100 °C og inkubert ved 30 °C og 55 °C.





*Figur 9: Isolater inkubert i BHI buljong ved 55°C i ±24 timer. Disse rørene viser dannelse av hvitt belegg på toppen av BHI buljongen (foto: Privat).*

Det ble ved mikroskopering av Gram-preparatene funnet at omtrent 30 % av isolatene hadde dannelse av sporer.

### 3.2.2 August uttaket, meieri A

Det ble totalt plukket 132 isolater fra MPCA skåler av melk fra meieri A i august. Av disse ble ikke 24 av isolatene videre med i analysene, som et resultat av ingen vekst i buljong. Totalt 108 isolater ble analysert med hensyn til fenotyp karakterisering og om isolatene var Gram-positive eller Gram-negative og om isolatene hadde katalaseaktivitet. Det resulterte i at alle 108 isolatene var Gram-positive og hadde katalaseaktivitet, se tabell 10.

Som tabell 7 viser var 95 isolater av stavformet morfologi (det ble observert sporer i noen av bakteriekulturene som inneholdt stavformede bakterier, dette er ikke fremvist i resultater eller vedlegg) og de ble isolert i melken fra alle stedene i produksjonen og ved alle temperatur-regimene, unntatt i melk fra ferdigvaretanken og fersk melk i kartong begge for temperaturene 100 °C varmebehandling og 30°C inkubering. Det ble også registrert at 13 isolater viste kokkeformet morfologi, der 10 av disse isolatene overlevde pasteuriseringsbetingelsene og vokste opp ved mesofil inkuberingstemperatur. De resterende 3 kokkeformede isolatene ble isolert etter høy varmebehandling og 30 °C inkuberingstemperatur.

### 3.2.3 August-uttaket, meieri B

Det ble totalt plukket 117 isolater fra MPCA skåler av melk fra meieriet på meieri B i august. Av disse ble ikke 16 av isolatene videre med i analysene, som et resultat av ingen vekst i buljong. Det gir 101 isolater som har blitt analysert med hensyn til fenotyp karakterisering og om isolatene var Gram-positive eller Gram-negative og om isolatene hadde katalaseaktivitet. Alle 101 isolatene var Gram-positive og 97 av isolatene viste positiv katalaseaktivitet, se tabell 11. I tillegg viste fenotyp identifisering at 71 av isolatene hadde stavformet morfologi.

Isolatene fra fersk melk som var høytemperaturbehandlet (100 °C, 30 minutter) vokste omtrent ikke opp i BHI-buljong inkubert hverken ved 30 °C eller 55 °C. Derimot i melk lagret på kartong både ved 4 °C og 8 °C og høytemperaturbehandlet ble det observert god overlevelse av isolatene i BHI buljong. Som tabell 11 også viser, ble det kun observert kokker blant isolatene isolert fra melk på kartong, lagret ved 4 °C og 8 °C etter høy temperaturbehandling og 30 °C inkubering. Det ble i tillegg til dette registrert vekst av mesofile kokker som overlevde pasteurisering 63 °C/72 °C ved alle uttaksstedene i produksjonen, med unntak av melk lagret ved 8 °C. Totalt ble det registrert 30 isolater som viste kokkeformet morfologi.

### 3.2.4 September-uttaket, meieri A og B

Det ble totalt plukket 144 isolater fra MPCA skåler av melk fra meieri A og B i september. Av disse ble ikke 33 av isolatene videre med i analysene, som et resultat av ingen vekst i buljong. Det gir 111 isolater som har blitt videre analysert med hensyn til morfologi, Gramfargingsreaksjon og katalasetesting. Det resulterte i at alle 111 isolatene var Gram-positive og hadde katalaseaktivitet, se tabell 12.

Som tabell 12 viser, resulterte analysering av isolatene med Grams fargingsmetode at 93 isolater hadde stavformet morfologi, hvorav 63 av disse isolatene kom fra meieri A, og ble funnet ved alle stedene i produksjonen og ved alle temperaturregimene. Det ble derimot ikke funnet noen bakterier med kokkeformet morfologien i melken fra meieri A. Videre viser tabellen for meieri B at 30 av isolatene var av stavformet morfologi og kom fra alle stedene i produksjonen med unntak av melken fra ferdigvaretanken pasteurisert (72 °C) og inkubert ved (30 °C), der det kun ble registrert isolater av kokkeformet morfologi. I tillegg til dette ble det også funnet høy andel kokker (12 av 18 isolat) i ferdig tappet kartong fra temperaturregimet 72 °C: 30 °C.

Tabell 10: Karakterisering av isolater fra augustuttaket på meieri A hvor uttakssteder (1-5), temperaturregime, antall isolater, morfologi og Gram-farging og katalase resultater, samt registrering av hvitt belegg på BHI buljong er oppgitt. Blanke felt representerer ingen funn.

Meieri	Uttaks- sted	Temp **	Antall isolater		Morfologi		Hvitt belegg	
	*	°C	Totalt n = 132	Ikke analysert n = 24	Staver n = 95	Kokker n = 13	Totalt n = 31	Isolater sekvensert *** n = 13
A	1	63:30	5		4 <sup>a, b</sup>	1 <sup>a, b</sup>		
A	1	63:55	3		3 <sup>a, b</sup>		3	1
A	1	100:30	3	2	1 <sup>a, b</sup>			
A	1	100:55	4	2	2 <sup>a, b</sup>		1	1
A	2	72:30	5	1	2 <sup>a, b</sup>	2 <sup>a, b</sup>	3	
A	2	72:55	3		3 <sup>a, b</sup>			1
A	2	100:30	3	2		1 <sup>a, b</sup>		
A	2	100:55	3	2	1 <sup>a, b</sup>			
A	3	72:30	15	1	7 <sup>a, b</sup>	7 <sup>a, b</sup>	1	
A	3	72:55	8	2	6 <sup>a, b</sup>		5	1
A	3	100:30	3	3				
A	3	100:55	6	2	4 <sup>a, b</sup>			
A	4	72:30	15	1	14 <sup>a, b</sup>		2	2
A	4	72:55	12	1	11 <sup>a, b</sup>		7	2
A	4	100:30	4	1	1 <sup>a, b</sup>	2 <sup>a, b</sup>		
A	4	100:55	11		11 <sup>a, b</sup>		4	2
A	5	72:30	15		15 <sup>a, b</sup>			
A	5	72:55	7	2	5 <sup>a, b</sup>		5	3
A	5	100:30	2	1	1 <sup>a, b</sup>			
A	5	100:55	5	1	4 <sup>a, b</sup>			

\* 1. Silotank, 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk, 4. Kartong 13 dager lagret melk, 4 °C, 5. Kartong 13 dager lagret melk, 8 °C.

\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

\*\*\* 16S rRNA sekvensering

<sup>a</sup> = alle isolater er Gram-positive

<sup>b</sup> = alle isolater er katalase-positive

Tabell 11: Karakterisering av isolater fra augustuttaket på meieri B hvor uttakssteder (1-5), temperaturregime, antall isolater, morfologi og Gram-farging og katalase resultater, samt registrering av hvitt belegg på BHI buljong er oppgitt. Blanke felt representerer ingen funn.

Meieri	Uttaks- sted	Temp **	Antall isolater		Morfologi		Hvitt belegg	
	*	°C	Totalt n = 117	Ikke analysert n = 16	Staver n = 71	Kokker n = 30	Totalt n = 23	Isolater sekvensert*** n = 10
B	1	63:30	5		2 <sup>a, b</sup>	3 <sup>a, 1</sup>		
B	1	63:55	4		4 <sup>a, b</sup>		4	2
B	1	100:30	3	3				
B	1	100:55	3	3				
B	2	72:30	5		1 <sup>a, b</sup>	4 <sup>a, c</sup>		
B	2	72:55	2		2 <sup>a, b</sup>		1	1
B	2	100:30	2	2				
B	2	100:55	2	2				
B	3	72:30	15	1	5 <sup>a, b</sup>	9 <sup>a, b</sup>		
B	3	72:55	7	1	6 <sup>a, c</sup>		1	1
B	3	100:30						
B	3	100:55	2	1	1 <sup>a, b</sup>			
B	4	72:30	15		9 <sup>a, b</sup>	6 <sup>a, b</sup>		
B	4	72:55	11		11 <sup>a, b</sup>		7	1
B	4	100:30	2			2 <sup>a, b</sup>		
B	4	100:55	7	3	4 <sup>a, b</sup>		1	1
B	5	72:30	15		15 <sup>a, b</sup>			
B	5	72:55	7		7 <sup>a, b</sup>		6	2
B	5	100:30	6			6 <sup>a, b</sup>		
B	5	100:55	4		4 <sup>a, b</sup>		3	2

\* 1. Balansetank, 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk, 4. Kartong 13 dager lagret melk, 4 °C, 5. Kartong 13 dager lagret melk, 8 °C.

\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

\*\*\* 16S rRNA sekvensering

<sup>a</sup> = alle isolater er Gram- positive

<sup>b</sup> = alle isolater er katalase-positive

<sup>c</sup> = et av isolatene viser katalase negativ aktivitet, de øvrige isolatene er katalase-positive

Tabell 12: Karakterisering av isolater fra septemberuttaket på meieri A og B hvor uttakssteder (1-3), temperaturregime, antall isolater, morfologi og Gram-farging og katalase resultater, samt registrering av hvitt belegg på BHI buljong er oppgitt. Blanke felt representerer ingen funn.

Meieri	Uttaks- sted	Temp **	Antall isolater		Morfologi		Hvitt belegg	
			Totalt n= 144	Ikke analysert n=33	Staver n=93	Kokker n=18	Totalt n=91	Isolater sekvensert *** n=19
A	1	63:30	6		6 <sup>a, b</sup>		5	1
A	1	63:55	4		4 <sup>a, b</sup>		3	1
A	1	100:30	4	3	1 <sup>a, b</sup>			
A	1	100:55	5		5 <sup>a, b</sup>		3	
A	2	72:30	5		5 <sup>a, b</sup>		5	3
A	2	72:55	3	1	2 <sup>a, b</sup>		2	2
A	2	100:30	2	1	1 <sup>a, b</sup>		1	1
A	2	100:55	3	2	1 <sup>a, b</sup>			
A	3	72:30	18		18 <sup>a, b</sup>		17	2
A	3	72:55	13	1	12 <sup>a, b</sup>		12	1
A	3	100:30	2		2 <sup>a, b</sup>		1	1
A	3	100:55	8	2	6 <sup>a, b</sup>		1	
B	1	72:30	6		6 <sup>a, b</sup>		6	2
B	1	72:55	4		4 <sup>a, b</sup>		3	1
B	1	100:30	3	2	1 <sup>a, b</sup>		1	1
B	1	100:55	6	5	1 <sup>a, b</sup>			
B	2	72:30	6			6 <sup>a, b</sup>	6	
B	2	72:55	2		2 <sup>a, b</sup>		2	1
B	2	100:30	4	3	1 <sup>a, b</sup>			
B	2	100:55	6	6				
B	3	72:30	18		6 <sup>a, b</sup>	12 <sup>a, b</sup>	18	
B	3	72:55	9	2	7 <sup>a, b</sup>		4	1
B	3	100:30	5	4	1 <sup>a, b</sup>		1	1
B	3	100:55	2	1	1 <sup>a, b</sup>			

\* 1. Silotank (A), Balansetank (B), 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk.

\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

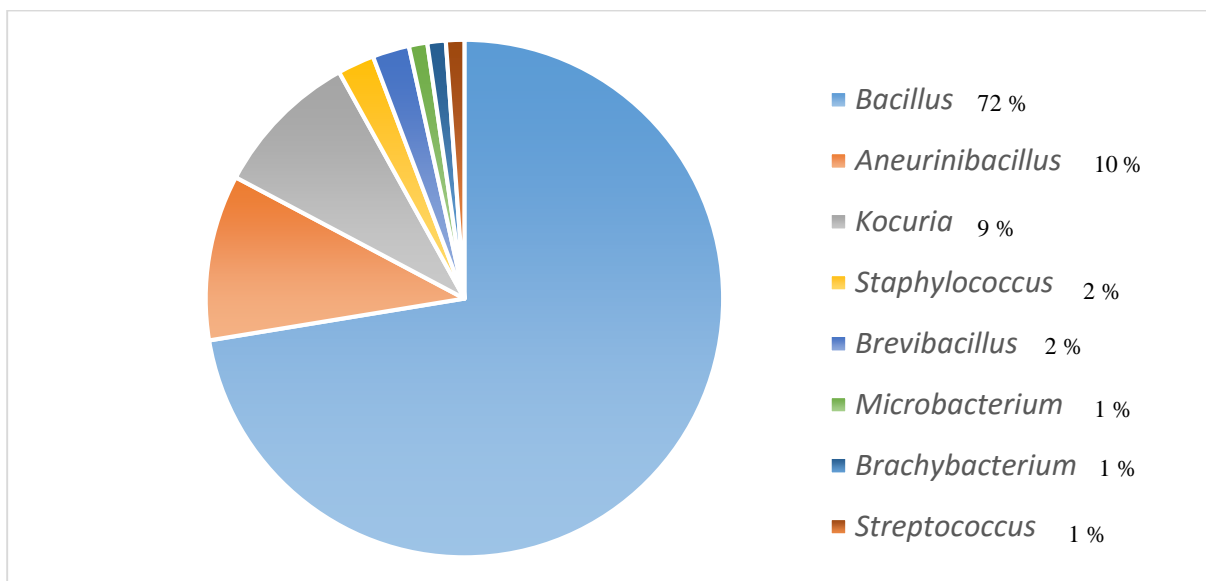
\*\*\* 16S rRNA sekvensering

<sup>a</sup> = alle isolater er Gram-positive

<sup>b</sup> = alle isolater er katalase-positiv

### 3.3 Identifisering ved 16S rDNA sekvensering

For identifisering av bakteriene isolert fra melken ble det i dette forsøket benyttet 16S rDNA sekvensering. Figur 11 viser en oversikt over fordelingen av bakterieisolatene funnet i dette forsøket til slekter, uavhengig av meieri, hvilket sted i produksjonen melken stammer fra og hvilke temperaturregimer som ble benyttet. Det ga et resultat der bakterieslekten *Bacillus* er den dominerende (72 %) blant isolatene, den nest største bakterieslekten er *Aneurinibacillus* (10 %), mens *Kocuria* representerer 9 % av isolatene. De bakteriestammene som representerer 2 % av isolatene er *Staphylococcus* og *Brevibacillus*, mens *Microbacterium*, *Brachybacterium* og *Streptococcus* representerer 1 % av bakteriene som var tilstede i melken hentet fra begge meieriene. Disse isolatene utgjør 87 av de 100 isolatene som ble sendt til sekvensering. Totalt 13 isolater ble utelatt i disse beregningene. Dette var et resultat av at sekvensene var for korte eller, sekvensene hadde for lavt resultat på skår og identitet ved BLAST søk eller, at det ikke ble funnet nukleotider ved sekvenseringen, se vedlegg 2.



Figur 10: Oversikt over hvordan bakterieslektene identifisert ved hjelp av bakterienes gen som koder for 16S rRNA fordeler seg prosentvis i melk fra meieriene A og B fra uttakene i august og september.

For omtrent 44 % av isolatene som er omtalt i denne oppgaven ble det også funnet alternative slekter og arter som gjeldende isolat kunne identifiseres som. De alternative sekvensresultatene med hensyn til slekt- og artsnavn til isolat som hadde > 8 BLAST- treff blant de 100 sekvenstreffene som kom opp er beskrevet i tabell 13, tabell 14 og tabell 15 som en alternativ bakterie.

### 3.3.1 August-uttaket, meieri A

For uttaket i august, ble det på meieri A registrert en hovedvekt av slekten *Bacillus* med 26 av 34 isolater tilhørende denne slekten, se tabell 13. *Bacillus licheniformis* er den dominerende *Bacillus* arten med 17 av 26 isolater tilhørende denne. I tillegg til *B. licheniformis* var det også vekst av *B. mycoides* (19,2 %) der alle ble funnet i lagret melk, og de øvrige bakterieartene *Bacillus sp.*, *B. subtilis* og *Bacillus smithii* som hver bestod av 3,9 % av isolatene.

Som vist i tabell 13 ble det i tillegg til *Bacillus* isolatene funnet andre bakterieslekter og arter fra melken ved meieri A i august. Disse bakteriene er, og representerer følgende prosent av totalt innhold av bakterier i august-uttaket: *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (5,6 %), mens hver av de øvrige bakterieartene representerer 2,9 % av isolatene: *Brachybacterium nesterenkovii*, *Brevibacillus thermoruber*, *Microbacterium schleiferi*, *Staphylococcus hominis* og *Kocuria rhizophila*.

For fersk melk (uttakssted 1 – 3) i produksjonen ble det funnet en hovedvekt av *B. licheniformis* (11 av 16 isolater), mens for de øvrige bakterieartene *Bacillus sp.*, *M. schleiferi*, *Bra. nesterenkovii*, *S. hominis* og *Br. thermoruber* ble det funnet ett isolat av hver art, se tabell 13.

For lagret melk (4 °C og 8 °C) ble bakterieslekten *Aneurinibacillus* funnet i melken som hadde vært høytemperaturbehandlet og inkubert ved 55 °C, ikke ved de øvrige temperaturregimene. *K. rhizophila* ble også funnet i høytemperaturbehandler melk, inkubert 30 °C.

Videre ble det i melken fra meieri A registrert BHI skåler med lite eller ingen vekst og registrert lite vekst i BHI buljong. Dette var i hovedsak isolater med høytemperaturbehandlet melk (100 °C) og inkubert ved 30 °C og 55 °C, se vedlegg 2 tabell II. Derimot ble det isolert en koloni fra hver av disse temperaturene, unntatt melken fra kartong med temperaturregimet 100 °C: 30 °C der det ikke ble vist noen vekst i BHI buljong, se tabell 13.

### 3.3.2 August-uttaket, meieri B

For uttaket i august, ble det på meieri B registrert en hovedvekt av slekten *Bacillus* med 17 av 28 isolater tilhørende denne slekten, se tabell 14. *Bacillus licheniformis* er den dominerende *Bacillus* arten med 9 av 17 isolater tilhørende denne. I tillegg til *B. licheniformis* var det også vekst av *B. cereus* og *B. subtilis*, der begge bestod av 11,8 % av isolatene og de øvrige bakterieartene *B. pumilus* og *B. mycoides* som hver bestod av 5,6 % av *Bacillus* isolatene.

Som tabell 14 også viser ble det i tillegg til *Bacillus* isolatene funnet andre bakterieslekter og arter fra melken ved meieri B i august. Disse bakteriene er, og representerer følgende prosent av totalt innhold av bakterier, for dette uttaket: *K. rhizophila* (21,4 %), *A. thermoaerophilus* (14,3 %) og ett isolat av *Streptococcus thermophilus* som utgjør 3,6 % av isolatene funnet i meieri B.

For den ferske melken (uttakssted 1 – 3 i produksjonen) ble det ikke isolert noen bakterier i melken som var høytemperaturbehandlet ved 100 °C og inkubert ved 30 °C og 55 °C, med unntak av melk i kartong (100 °C: 55 °C) der det ble isolert en *A. thermoaerophilus*. I tillegg ble arten *B. cereus* ble funnet i den ferske melken, mens *B. subtilis* ble funnet i lagret melk ved temperaturregimet 72 °C:55 °C ved begge lagringstemperaturene (4 °C og 8 °C)

Bakterien *Aneurinibacillus* ble kun isolert fra melk som hadde vært høytemperaturbehandlet (100 °C) og inkubert ved 55 °C, der 1 av 4 isolater kom fra fersk melk i kartong. *Kocuria rhizophila* isolatene i melken (5 av 6 isolater) ble isolert fra lagret melk som hadde vært høytemperaturbehandlet (100 °C) og inkubert ved 30 °C, mens det siste *Kocuria* isolatet ble isolert fra ferdigvaretanken med temperaturregimet 72 °C:30 °C.

Videre ble det i melken fra meieri B registrert BHI-skåler med lite eller ingen vekst av kolonier. Dette var i hovedsak skåler med høytemperaturbehandlet melk (100 °C) og inkubert ved 30 °C og 55 °C, se vedlegg 2, tabell II. Det ble plukket kolonier fra skålene med temperaturregimene 100 °C: 30 °C og 100 °C: 55 °C for alle uttaksstedene, unntatt melk fra kartong (100 °C: 30 °C), der det ikke var noen vekst. Derimot ble det isolert en koloni fra kartong (100 °C: 55 °C), se tabell 14.



### 3.3.3 September-uttaket, meieri A

For uttaket i september, ble det for meieri A registrert en hovedvekt av bakterieslekten *Bacillus* med 11 av 12 isolater tilhørende denne slekten, se tabell 15. *Bacillus licheniformis* er den dominerende *Bacillus* arten med 7 av 11 isolater tilhørende denne. I tillegg til *B. licheniformis* var det også vekst av *Bacillus amyloliquefaciens* (18,2 %) og de øvrige bakterieartene *B. subtilis* og *B. pumilus*, som hver bestod av 9,1 % av isolatene.

Som tabell 15 viser ble det i tillegg til *Bacillus* isolatene funnet en annen bakterieslekt og art i melken fra meieri A. *Br. thermoruber* utgjør 8,3 % av totalt isolerte bakterier og ble isolert fra silotanken, varmebehandlet med 100 °C og inkubert ved 55 °C.

Videre ble det ikke registrert vekst av bakterier ved to av uttaksstedene silotankene (63 °C: 30 °C) og for ferdigvaretanken (100 °C: 55 °C), der isolatet fra silo gav for lav skår ved sekvensering og isolatet fra ferdigvaretanken ble det ingen PCR-produkt og derfor ikke sendt til sekvensering.

### 3.3.4 September-uttaket, meieri B

For uttaket i september, ble det for meieri B registrert en hovedvekt av bakterie slekten *Bacillus* med 9 av 13 isolater tilhørende denne slekten, se tabell 15. *Bacillus licheniformis* er den dominerende *Bacillus* arten med 3 av 9 isolater tilhørende denne. I tillegg til *B. licheniformis* var det også vekst av *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* der hver bestod av 22,2 % av bakterieisolatene og de øvrige bakterieartene *B. smithii* og *B. mycoides* som hver bestod av 11,1 % av isolatene.

Som tabell 15 viser ble det i tillegg til *Bacillus* isolatene funnet andre bakterieslekter og arter i melken fra meieriet. Disse bakteriene er, og representerer følgende prosent av totalt innhold av bakterierisolatene funnet i septemberuttaket på meieri B: *A. thermoaerophilus* (15,4 %) og de øvrige bakterieartene *K. rhizophila* og *Staphylococcus warneri* som hver bestod av 7,7 % av isolatene. De to isolatene fra bakterieslekten *Aneurinibacillus* ble funnet ved temperatur-regimene 100 °C: 30 °C og 72 °C: 55 °C.

Videre ble det ikke registrert vekst av bakterier i melken fra ferdigvaretanken (100 °C: 55 °C), der ingen av isolatene plukket fra BHI skål vokste i BHI buljongen. For melken fra meieri B ble det registrert BHI skåler med lite eller ingen vekst, og registrert lite vekst av i BHI buljong. Dette var for høytemperaturbehandlet melk, inkubert ved 30 °C, se vedlegg 2, tabell V og VI.

Tabell 13: Oversikt over 16S rDNA sekvenseringsresultater fra uttaket i august for meieri A. Viser hvor i produksjonen (uttakssted 1 - 5) og ved hvilke temperaturregimer de forskjellige isolatene er varmebehandlet og inkubert ved før isolering. Sekvensresultatene er angitt ved at den/de bakteriene som gav flest treff ved BLAST søk er beskrevet som funn. Der det i tillegg ble vist flere funn, men med høyere antall treff (>8 treff per 100 sekvenstreff), er beskrevet som alternative funn. Blanke felt representerer ikke vekst av isolat ved dyrking i BHI buljong, andre årsaker er oppgitt i tabellen.

### Meieri A

Uttakssted *	Temp ** °C	Ant isolater n = 34 ***	Funn	Alternative funn
1	63:30	1 1	<i>Bacillus</i> sp <i>M. schleiferi</i>	<i>Bacillus simplex</i> og <i>Brevibacillus frigoritolerans</i> <i>M. lacticum</i>
1	63:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
1	100:30	1	<i>B. licheniformis</i>	
1	100:55	2	<i>B. licheniformis</i>	
2	72:30	1	<i>Bra. nesterenkovi</i>	<i>Brachybacterium squillarum</i>
2	72:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
2	100:30	1	<i>S. hominis</i>	
2	100:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
3	72:30	1	<i>B. licheniformis</i>	
3	72:55	2	<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus aerius</i>
3	100:30			
3	100:55	2 1	<i>B. licheniformis</i> <i>Br. thermoruber</i>	<i>B. aerius</i> <i>Brevibacillus borstelensis</i> og <i>Brevibacillus levickii</i>
4	72:30	1 2 1	<i>B. mycoides</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	<i>B. weihenstephanensis</i> og <i>B. cereus</i> <i>Bacillus tequilensis</i> <i>B. aerius</i>
4	72:55	1 2	<i>B. smithinii</i> <i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>
4	100:30	1 1	<i>B. mycoides</i> <i>K. rhizophila</i>	<i>B. weihenstephanensis</i> og <i>B. cereus</i> <i>K. varians</i> og <i>Kocuria marina</i>
4	100:55	1	<i>A. thermoaerophilus</i>	
5	72:30	3	<i>B. mycoides</i>	<i>B. weihenstephanensis</i> og <i>B. cereus</i>
5	72:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
5	100:30	1	<i>B. licheniformis</i>	
5	100:55	2 1	<i>A. thermoaerophilus</i> <i>B. licheniformis</i>	<i>Aneurinibacillus danicus</i>

\* 1. Silotank, 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk, 4. Kartong 13 dager lagret melk, 4 °C,

5. Kartong 13 dager lagret melk, 8 °C.

\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

\*\*\* Ant = Antall isolerte bakterier for hvert temperaturregime

Tabell 14: Oversikt over 16S rDNA sekvenseringsresultater fra uttaket i august for meieri B. Viser hvor i produksjonen (uttakssted 1 - 5) og ved hvilke temperaturregimer de forskjellige isolatene er varmebehandlet og inkubert ved før isolering. Sekvensresultatene er angitt ved at den/de bakteriene som gav flest treff ved BLAST søk er beskrevet som funn. Der det i tillegg ble vist flere funn, men med høyere antall treff (> 8 treff per 100 sekvenstreff) er beskrevet som alternative funn. Blanke felt representerer ikke vekst av isolat ved dyrking i BHI buljong, andre årsaker er angitt i tabellen.

### Meieri B

Uttakssted *	Temp ** °C	Ant isolater n = 28 ***	Funn	Alternative funn
1	63:30	1	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i> og <i>Bacillus toyonensis</i>
		1	<i>St. thermophilus</i>	
1	63:55	2	<i>B. licheniformis</i>	
1	100:30			
1	100:55			
2	72:30	1	<i>K. rhizophila</i>	
2	72:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
2	100:30			
2	100:55			
3	72:30	1	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
3	72:55	2	<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus safensis</i>
		1	<i>B. plumilus</i>	
3	100:30			
3	100:55	1	<i>A. thermoaerophilus</i>	
4	72:30	1	<i>K. rhizophila</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>
		1	<i>B. licheniformis</i>	
4	72:55	2	<i>A. thermoaerophilus</i>	<i>B. tequilensis</i>
		1	<i>B. subtilis</i>	
4	100:30	1	<i>K. rhizophila</i>	
4	100:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
5	72:30	3	<i>B. mycoides</i>	<i>B. weihenstephanensis</i> og <i>B. cereus</i>
5	72:55	1	<i>B. subtilis</i>	<i>B. tequilensis</i>
		1	<i>B. licheniformis</i>	
5	100:30	3	<i>K. rhizophila</i>	
5	100:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
		1	<i>A. thermoaerophilus</i>	

\* 1. Balansetank, 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk, 4. Kartong 13 dager lagret melk, 4 °C,

5. Kartong 13 dager lagret melk, 8 °C.

\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

\*\*\* Ant = Antall isolerte bakterier for hvert temperaturregime

Tabell 15: Oversikt over 16S rDNA sekvenseringsresultater fra uttaket i september for meieri A og B. Viser hvor i produksjonen (uttakssted 1 - 3) og ved hvilke temperaturregimer de forskjellige isolatene er varmebehandlet og inkubert ved før isolering. Sekvensresultatene er angitt ved at den/de bakteriene som gav flest treff ved BLAST søk er beskrevet som funn. Der det i tillegg ble vist flere funn, men med høyere antall treff (> 8 treff per 100 sekvenstreff) er beskrevet som alternative funn. Blanke felt representerer ikke vekst av isolat ved dyrking i BHI buljong, andre årsaker er angitt i tabellen.

### Meieri A

Uttakssted *	Temp ** °C	Ant isolater n = 12 ***	Funn	Alternativt funn
1	63:30		Lav skår ved BLAST søk	
1	63:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
1	100:30	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
1	100:55	1	<i>Br. thermoruber</i>	<i>Br. borstelensis</i>
2	72:30	1	<i>B. pumilus</i>	
2	72:55	2	<i>B. licheniformis</i>	
2	100:30	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
2	100:55			
3	72:30	1 1	<i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	
3	72:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
3	100:30	1	<i>B. licheniformis</i>	
3	100:55	1	<i>B. licheniformis</i>	

### Meieri B

Uttakssted *	Temp ** °C	Ant isolater n = 13 ***	Funn	Alternativt funn
1	63:30	2	<i>B. pumilus</i>	<i>B. safensis</i>
1	63:55	2	<i>B. licheniformis</i>	
1	100:30	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
1	100:55	1	<i>A. thermoaerophilus</i>	
2	72:30	1	<i>S. warneri</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
2	72:55	1	<i>B. licheniformis</i>	
2	100:30	1	<i>B. mycoides</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>
2	100:55			
3	72:30	1	<i>K. rhizophila</i>	
3	72:55	1	<i>A. thermoaerophilus</i>	
3	100:30	1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	
3	100:55	1	<i>B. smithii</i>	

(\*) 1. Silotank (A), Balansetank (B), 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk

\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

\*\*\* Ant = Antall isolerte bakterier for hvert temperaturregime

## 4 Diskusjon

I dette forsøket ble det forsket på melkekvalitet med hensyn til innhold av termoresistente bakterier. Forsøket skulle gå over to måneder (august og september) der fersk melk og lagret melk fra TINEs to meierier (A og B) skulle analyseres. Det ble ikke foretatt analyser på lagret melk i kartong for uttaket i september grunnet utsettelse av uttaksdato for den ferske melken og fordi tiden da ikke strakk til. Dette medfører at det ikke er mulig å sammenlikne resultater for den lagrede melken over en tidsperiode på 2 måneder, kun for den ferske melken mellom de to meieriene.

For melken som ble høytemperaturbehandlet (100 °C) koagulerte proteinene i prøven og dannet hvite flekker i agaren. Det viste seg å være vanskelig å skille mellom disse flekkene og bakteriekolonier. På grunnlag av dette kan det være noe usikkerhet i beregninger av antall termoresistente bakterier og sporer ved disse temperaturene. Dette kan også være en årsak til at det ikke ble registrert vekst av bakterier i BHI-buljong etter plukking av antatt «koloni» og endt inkubering

### 4.1 Termoresistente bakterier

#### 4.1.1 Bakterier og sporer i fersk melk

Det ble i dette forsøket bekreftet at den ferske pasteuriserte melken er innenfor EUs reglement for mesofilt bakterieinnhold i pasteurisert melk der celletall ikke skal overstige 4,47 log cfu/ml ved inkubering 30 °C (Adams og Moss, 2010). For pasteurisert melk fra meieri A viste silo, ferdigvaretank og melk tappet i kartong < log 3 cfu/ml av termoresistente mesofile bakterier. Videre viste tilsvarende prøver for melken fra meieri B < log 3,4 cfu/ml av mesofile termoresistente bakterier. Dette indikerer at den ferske melken fra meieri A og meieri B var av god kvalitet med hensyn på mesofilt termoresistent celletall, dette for alle uttaksstedene i produksjonen.

I den ferske pasteuriserte melken fra uttakene i august og september, ble det registrert mer vekst av bakterier ved mesofil inkubering (30 °C) enn ved termofil inkubering (55 °C). Dette er som forventet fordi inkubering ved 30 °C fører til vekst av både mesofile og termofile bakterier og ved inkubering 55 °C vil kun de termofile bakteriene vokse opp. Dermed vokser det opp færre celler ved termofil inkuberingsbetingelser.

Selv om pasteurisering 72 °C i 15 sek dreper de fleste vegetative cellene som er tilstede i rå melk, vil en rekke bakterieslekter kunne overleve en slik varmebehandling. Man kan spesielt nevne Gram-positive bakteriene som har evnen til å danne sporer når forholdene blir uutholdelige som for eksempel mesofile *Bacillus sp.*. I tillegg vil også bakterier som tilhører de ikkesporedannende slektene *Enterococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, og *Lactobacillus* kunne overleve pasteurisering (Adams og Moss, 2010). I meieriindustrien er rekontaminering etter pasteurisering vanlig ved at Gram-negative psykrotrofe bakterieslekter som *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* og *Psychrobacter* etablerer seg i melken og kan gi problemer ved kjølelagring (Adams og Moss, 2010). Andre problemer i industrien kan være forårsaket av dannelse av biofilm som inneholder bakterieslekter som for eksempel *Bacillus*, *Listeria* og *Staphylococcus* (Marchand et al., 2012) og dannelse av melkestein på overflater ved dårlig vask over tid (Adams og Moss, 2010).

Ved å varmebehandle melk ved høye temperaturer (100 °C) vil det eliminere vekk de aller fleste vegetative cellene som er tilstede i den pasteuriserte melken. De bakteriene som er sporedannere vil kunne overleve en slik behandling. Når forholdene er levelig for bakterien igjen, vil sporen germinere (Madigan et al., 2006). I tillegg vil andre bakterieslekter også kunne overleve høy temperaturbehandling, dette kan for eksempel være den Gram-positive mesofile termoresistente bakterien *Kocuria*, og denne har i tidligere forsøk blitt funnet i myse (Walsh et al., 2012). Chauhan et al. (2013) har funnet den termoresistente *Kocuria* i pasteurisert melk.

Det kunne derfor forventes at begge meieriene, ved alle uttaksstedene i produksjonen og i begge uttakene (august og september) skulle vise tilstedeværelse av sporer. Mesofilt og termofilt sporetall var tilnærmet likt i melk fra silo og ferdigvaretank innhentet i august på meieri A, med henholdsvis 1,6 og 1,3 log cfu/ml. Det ble derimot for uttaket i august på meieri B, ikke registrert noen sporer for melk som hadde vært høytemperaturbehandlet ved 100 °C og inkubert ved 30 °C og 55 °C, unntatt i melk fra kartong med temperaturregimet 100 °C: 55 °C hvor det ble funnet vekst av sporer (0,85 log cfu/ml). Det ble heller ikke vist germinering av sporer i melken fra ferdigvaretanken i september ved meieri B (100 °C:55 °C), men registrert et mesofilt sporetall på 1,1 log cfu/ml i den samme melken. Generelt ble det registrert lavere mesofilt og termofilt sporetall fra september ved begge meieriene (alle uttaksstedene i produksjonen). Årsak for at det ikke ble registrert germinering er trolig at et lavt antall av sporedannende bakterier var tilstede i melken.

#### 4.1.2 Bakterier og sporer i lagret melk

EUs reglement for pasteurisert melk beskriver at melk lagret i 5 dager ved 6 °C ikke skal ha mesofilt celletall som overstiger 4,47 log cfu/ml og ved psykrotrof inkubering (21°C) i 5 dager skal ikke celletallet overstige 5 log cfu/ml (Adams og Moss, 2010). For dette forsøket ble det vist følgende: Pasteurisert melk lagret ved 4 °C i 13 dager viste et mesofilt celletallet < 3 log cfu/ml og dermed godt innenfor hva som kreves etter 5 dager lagring melk. Man kan på bakgrunn av dette si at melk lagret ved 4 °C i 13 dager er av tilfredsstillende mikrobiologisk kvalitet og kan med god sikkerhet drikkes. Derimot anbefales det ikke å drikke melk som har vært lagret ved 8 °C, dette fordi begge meieriene hadde høye celletall ved mesofilt termofilt temperaturregime, meieri A 5,98 log cfu/ml og 7 log cfu/ml på meieri B. Det var som forventet mer vekst i den pasteuriserte melken som hadde vært lagret ved 8 °C enn den som hadde vært lagret ved 4 °C, da høyere lagringstemperatur fremmer vekst av vegetative celler.

For den lagrede melken ble det registrert sporer for alle høytemperaturregimene og ved begge lagringstemperaturene (4 °C og 8 °C). Sporetallene i lagret melk fra begge meieriene viste noe høyere sporetall enn for den ferske melken. Det ble også registrert et uventet høyt celletallet (4,70 log cfu/ml) for melken fra meieri B som hadde vært lagret ved 8 °C, høytemperaturbehandlet og inkubert ved 55 °C. I den ferske melken lå sporetallet på 0,85 log cfu/ml. Den lange inkuberingstiden ved 8 °C har antagelig påvirket grad av sporulering av en termofil sporulerende bakterie og tyder på ulik flora av sporulerende bakterier hos de to meieriene.

I et forsøk utført av (Fromm og Boor, 2004) på pasteurisert fersk og lagret melk (6 °C, 1-17 dager), fra tre meierier, ble det funnet mesofile termoresistente celler i både fersk og lagret melk. De tre meieriene viste følgende respektive celletall fra fersk pasteurisert melk og etter 14 dager lagring; meieri 1. < 2 til 3 log cfu/ml, meieri 2. < 2,5 til 6,5 log cfu/ml og meieri 3. < 3 til 5 log cfu/ml. For resultatene presentert i dette mastergradsforsøket ble den pasteuriserte melken som nevnt lagret ved 4 °C og 8 °C i 13 dager. Sammenliknet med ikke lagret melk fra samme uttak (august), ble det ikke vist nevneverdig forhøyning av celletallet ved lagring ved 4 °C. Derimot ble det registrert et forhøyet mesofilt termoresistent celletall for den pasteuriserte melken som hadde vært lagret på 8 °C. Her ble det i gjennomsnitt registrert en økning på omtrent 3,5 log cfu/ml fra den ferske til den lagrede melken. Den samme tendensen ble vist i forsøket til Fromm og Boor (2004) etter lagring ved 6 °C.

## 4.2 Fenotyp karakterisering

### 4.2.1 Visuell observasjon BHI buljong, alle uttak

Av de prøvene som viste hvitt belegg ble noen av disse (42) sendt til sekvensering og resulterte i at 33 av isolatene var av slekten *Bacillus*, der *B. licheniformis* var den dominerende. Derimot ble ikke alle isolatene i forsøket av *Bacillus* slekten og arten *B. licheniformis* registrert med hvitt belegg. Forklaring til denne observasjonene ble ikke funnet i noe av den litteraturen som er lest i henhold til denne oppgaven. Dette funnet ble derimot diskutert i *Bacillus*-prosjekt gruppen og der kom de frem til at dette kunne være dannelse av biofilm (personlig meddelelse Siv Skeie), noe som kan være tilfelle da forskning har vist at bakterieslekten *Bacillus* og spesielt dens sporer fester seg godt på rustfritt stål (Parkar et al., 2001). Det samme ble funnet i artikkelen til Marchand et al. (2012). I tillegg er det funnet bakteriestammer tilhørende *Bacillus* i ubehandlet melk, pasteurisert melk og i ost, der den dominante arten var *B. licheniformis* (Banykó og Vyletřlová, 2009).

### 4.2.2 Mikroskopering, Grams metode og katalase test, alle uttak

Det ble som forventet at alle isolatene i dette forsøket var Gram-positive bakterier ettersom de generelt er mere hardføre overfor ulike miljøpåvirkninger og deriblant varme enn Gram-negative celler. Årsak for denne hardførheten er grunnet oppbygningen av de Gram-positive bakterienes cellevegg. De Gram-negative bakteriene danner heller ikke sporer og vil derfor bli eliminert ved varmebehandling. Grunnet forurensning postpasteurisering vil man likevel finne Gram-negative produktødeleggende bakterier som bakterieslekten *Pseudomonas* ved kjølelagring og forårsaker «sur» melk (Adams og Moss, 2010).

Den mest dominerende bakterieslekten, og den som oftest blir isolert fra pasteurisert melk er den Gram-positive termoresistente stavformede *Bacillus*, men også andre Gram-positive bakterieslekter som *Microbacterium*, *Anoxybacillus*, *Brachybacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Enterococcus* (Chauhan et al., 2013), *Aneurinibacillus* og *Brevibacillus* (Lücking et al., 2013) er isolert. Dette stemmer overens med funn gjort i denne oppgaven der 60 % hadde isolatene av stavformet morfologi og de øvrige 40 % av isolatene hadde kokkformet morfologi.

Videre i dette forsøket ble det registrert at alle isolatene med unntak av 3 isolater var katalase-positive. Av disse 3 isolatene som var katalase-negative var to av kokkeformet morfologi mens



den siste var av stavformet morfologi. De kokkeformede isolatene kom fra melken hentet i balansetanken ved meieri B, varmebehandlet ved 63 °C og inkubert ved 30 °C, og ferdigvaretanken varmebehandlet 72 °C og inkubert ved 30 °C. Ved undersøkelse i mikroskopet var formen på de 2 kokkeformede isolatene like, mens de øvrige kokkene i dette uttaket var forskjellig fra disse 2. Ettersom det i dette forsøket ble utført aerob inkubering av prøvene var det forventet funn av aerobe bakterier som er katalase-positive. Et av disse 2 isolatene ble sendt til sekvensering og denne viste at den var av bakterieslekten *Streptococcus*. Denne bakterieslekten tilhører melkesyrebakteriene og forventes å være katalase-negativ (Adams og Moss, 2010; Madigan et al., 2006) og funnet var derfor som forventet. Det siste isolatet uten katalaseaktivitet som ble funnet i dette forsøket hadde stavformet morfologi, isolert fra fersk melk i kartong tappet på meieri A og mesofil inkubering. Dette isolatet ble sendt til sekvensering og resulterte i bakteriearten *B. licheniformis*. Dette er ikke som forventet da bakterieslekter av *Bacillus* normalt har positiv katalase aktivitet (Madigan et al., 2006). I tillegg er det også forventet at aerobe bakterieslekter som *Pseudomonas*, *Brachybacterium*, *Microbacterium*, *Brevibacillus*, *Kocuria* og *Aneurinibacillus* skal ha katalase positivaktivitet, noe som også ble vist i dette forsøket.

### 4.3 Identifisering ved 16S rDNA sekvensering

I denne oppgaven ble 100 isolater valgt ut til identifisering. Utgangspunktet for utvelgelsen var 5 isolater per prøveuttakssted, fra hvert meieri som skulle sekvenseres. Dette utgjorde en prøve for hvert temperaturregime, for hvert prøvepunkt i produksjonen og ved lagring (1-5), og i tillegg ble ett vilkårlig isolat valgt ut. Ettersom analysene på lagret melk fra september ikke ble utført, ble det i stedet valgt flere vilkårlige prøver fra både august- og septemberuttakene. Av de totalt 100 isolatene som ble sekvensert er 87 av disse isolatene presentert i denne oppgaven. De øvrige 13 isolatene er utelatt på grunn av ufullstendige sekvenser fra sekvenseringen. Det er få isolater som representerer hvert temperaturregime i dette forsøket. Dersom utvelgelsene av isolatene hadde vært utført annerledes og at flere isolater hadde blitt identifisert ville kanskje resultatene fra dette forsøket blitt noe endret.

#### 4.3.1 Isolerte bakterieslekter fra meieri A og B

Ved 16S rDNA sekvenseringen ble det funnet at isolatene fra dette forsøket stammet hovedsakelig fra bakterieslekten *Bacillus* (72 % av isolatene). De øvrige isolatene tilhørende bakterieslektene *Aneurinibacillus* (10 %), *Kocuria* (9 %), *Staphylococcus* (2 %) og *Brevibacillus* (2 %) og de resterende bakterieisolatene representerte 1 % av isolatene og tilhørte slektene *Microbacterium*, *Brachy bacterium* og *Streptococcus*. At *Bacillus* var den dominerende bakterieslekten i dette forsøket var forventet ettersom Cosentino et al. (1997) fant tilsvarende resultater i sitt forsøk (69 % av isolatene), mens et annet forsøk viste at *Bacillus* representerte 49 % av isolatene (Fromm og Boor, 2004).

Det var også forventet å finne andre bakterieslekter i den varmebehandlede melken. I artikkelen til Fromm og Boor (2004) ble det vist at pasteurisert melk kan inneholde bakterieslekter som *Microbacterium* (30 %), *Kocuria* (30 %) og *Streptococcus* (12%). Mens et annet forsøk viste funn av for eksempel bakterieslektene *Brevibacillus* (0,2 %), *Staphylococcus* (1 %) og *Micrococcus* (1,5 %) (Ranieri et al., 2009). Flesteparten av de nevnte slektene ble også identifisert i dette arbeidet. I tillegg kan en artikkel fra Scott et al. (2007) vise funn av de termofile sporedannende bakterieslektene *Anoxybacillus* og *Geobacillus* i produksjon av melkepulver, der høye temperaturer benyttes. Disse bakteriene ble ikke funnet i dette forsøket og heller ikke ved de høye varmebehandlingstemperaturene som ble benyttet.

Rå upasteurisert melk har et høyt og varierende innhold av psykrotrofe, mesofile og termofile bakterier hvorav noen av disse også kan være patogene for mennesker (Adams og Moss, 2010; Fromm og Boor, 2004; Vacheyrou et al., 2011). For å få ned bakterieinnholdet kan melk bli varmebehandlet først i form av termisering (Walstra et al., 2005) og deretter pasteurisert (Adams og Moss, 2010). Dette gir en melk med et mindre innhold av ødeleggende enzymer fra *Pseudomonas* (termisering) og samtidig eliminering av både kvalitetsødeleggende bakterier og patogene bakterier fra melken med pasteurisering. Selv om dette gjøres rutinemessig i meieriindustrien vil det likevel være produktødeleggende enzymer, bakterier og sporer tilstede i melken. I tillegg til varmebehandling av melk på meieriet må bonden ha fokus på renhold før, under og etter melking. Melk blir lett kontaminert fra de omgivelsene kua lever i, så det er viktig med godt renhold og god hygiene i fjøset generelt og spesielt i forbindelse med melking (Gleeson et al., 2013, Vissers et al., 2007). *Bacillus* og *Clostridium* er bakterier man ofte finner i jord og i silo. Disse bakteriene er sporedannere og man finner de derfor ofte i varmebehandlet melk (Adams og Moss, 2010). *Clostridium* ble ikke funnet i dette forsøket og det var heller ikke forventet ettersom det her ble benyttet aerob inkubering, og *Clostridium* er en anaerob bakterie.

#### 4.3.2 Isolerte bakteriearter i fersk melk fra meieri A og B i august

For pasteurisert melk fra alle uttaksstedene i produksjonen (1-3), inkubert ved 30 °C, ble det for meieri A funnet mesofile termoresistente bakterier (celletall mellom 2 – 3 log cfu/ml), der artene *Bra. nesterenkovii*, *B. licheniformis*, *M. schleiferi* og *Bacillus sp.* var tilstede. I melken fra meieri B ble *B. cereus*, *St. thermophilus*, *K. rhizophila* funnet (celletall rundt 3 log cfu/ml). *Bacillus cereus* representerte 2 av 4 isolater.

Pasteurisert melk fra alle uttaksstedene i produksjonen fra meieri A og meieri B, inkubert ved 55 °C var alle isolatene av *Bacillus* slekten, og tilhørende *B. licheniformis* for melken fra meieri A (celletall 0,6 – 1,1 log cfu/ml). Melken fra meieri B inneholdt isolater tilhørende *B. licheniformis* og *B. pumilus*. Det var forventet å finne et varierende arts mangfold etter pasteurisering og mesofil inkubering.

For høytemperaturbehandlet melk (100 °C), inkubert ved 30 °C og 55 °C, fra alle uttaksstedene (1-3) i produksjonen ved meieri A, var *Bacillus* den dominerende bakterieslekten (75 % av isolatene var *B. licheniformis*), mens de øvrige isolatene var *Staphylococcus* og *Brevibacillus* (celletall 0,3 – 1,7 log cfu/ml). I følge Quigley et al. (2013) vil bakterieslekten *Staphylococcus* være patogene for mennesker og er en bakterie som ofte er funnet i rå ubehandlet melk, der arten *S. hominis* er tidligere blitt isolert fra myse (Walsh et al., 2012). *Staphylococcus aureus* er ofte isolert fra hudens overflate på mennesker og dyr, men også fra vann og jord. Altså kan man finne slekten de fleste steder (Adams og Moss, 2010), der arten *S. hominis* også er blitt isolert fra huden til mennesker (Kloos og Schleifer, 1975). Ut fra dette og funn av *S. hominis* kan man si at denne melken trolig er blitt rekontaminert fra mennesker på en eller annen måte. Enten på gården, fra håndtering ved prøvetakning, fra biofilm, fra melkestein eller ved analysering kan bakterien blitt tilført. Det er ikke mulig å sammenlikne disse funnene med meieri B, da det her ikke ble identifisert bakterier ved den høye inkubasjonstemperaturen, unntatt melk tappet i kartong inkubert ved 55 °C der *A. thermoaerophilus* ble funnet (celletall 0,85 log cfu/ml).

I et annet forsøk utført på *Bacillus* ble det også vist at mangfoldet av artene varierte mellom 3 melkepulverprodusenter, der *B. licheniformis* var dominerende i alle bedriftene (Buehner et al., 2015). Ettersom *B. licheniformis* er dominerende ved bruk av høye temperaturer i melkepulverproduksjon vil det derfor være sannsynlig at arten var å finne ved høytemperaturbehandling av melk, noe det også ble benyttet i dette forsøket. Arten *B. licheniformis* var også dominerende i

høytemperaturbehandlet melk. *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (Lücking et al., 2013) og *Brevibacillus* er også vanlig å finne i høytemperaturbehandlet melk (Scheldeman et al., 2006).

#### 4.3.3 Isolerte bakteriearter i fersk melk fra meieri A og B i september

I pasteurisert melken fra meieri A, inkubert ved 30 °C (bakterie- og sporetall), fra alle uttaksstedene, ble det funnet at alle isolatene tilhørte bakterieslekten *Bacillus*, fortelt på 3 forskjellige arter: *B. pumilus*, *B. subtilis* og *B. licheniformis*. Celletallene for bakteriene var 2,6 – 2,8 log cfu/ml, mens sporetallet viste lavere nivå (0,1 – 1,3 cfu/ml). Med tanke på artsmangfoldet var dette funn som var ulikt fra uttaket i august. Det ble for meieri B ved de samme temperaturregimene funnet et mer varierende artsmangfold bestående av bakterieartene *B. pumilus*, *S. warneri* og *K. rhizophila*. Mesofilt bakterietall var omtrent 3 log cfu/ml for alle uttaksstedene, mens sporetallet var som forventet lavere (snitt for alle uttaksstedene 0,2 log cfu/ml), der arter av *Bacillus* slekten sammen med bakteriearten *A. thermoaerophilus* ble isolert. Funn av *Bacillus* og *Aneurinibacillus* var forventet da de begge tåler høye temperaturer og er ikke uvanlig å finne ved inkubering 55 °C. Derimot var ikke *S. warneri* i likhet med *S. hominis* en bakterieart som ofte blir isolert fra hud til dyr og mennesker og kan trolig kobles rekontaminering av melk (Kloos og Schleifer, 1975). *Staphylococcus warneri* er tidligere funnet i pasteurisert melk (Walsh et al., 2012) og i rå upasteurisert melk (Ercolini et al., 2009, Walsh et al., 2012). Den ikkesporulerende kokkeformede bakterien *K. rhizophila* er funnet i tidligere forsøk i upasteurisert melk (Quigley et al., 2013) og myse (Walsh et al., 2012). I pasteurisert melk er det derimot funnet andre arter av *Kocuria* som *K. varians* og *Kocuria kristinae* (Fromm og Boor, 2004).

I melken fra begge meieriene, fra alle uttaksstedene (1-3), høytemperaturbehandlet (100 °C) og inkubert ved 30 °C, ble det funnet kun bakterieslekten *Bacillus*. Det ble vist et gjennomsnittlig lavt sporetall 0,4 log cfu/ml. Melken fra meieri A og meieri B inneholdt bakteriestammene *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* og *B. mycoides*. Funnene her er vanskelig å sammenlikne med uttaket i august ettersom det ikke ble isolert noen bakterier fra meieri B da, og meieri A viste funn av 2 bakterier (*B. licheniformis* og *S. hominis*). For høytemperaturbehandlet melk, fra alle uttaksstedene (1-3), inkubert ved 55 °C, ble det funnet for meieri A og meieri B et gjennomsnittlig lavt sporetall, 0,3 log cfu/ml. I melken fra meieri A ble det funnet to isolater som har evne til dannelsen av sporer (*Br. thermoruber* og *B. licheniformis*). Bakterieslekten

*Brevibacillus* og bakteriearten *B. licheniformis* er bakterier som tåler varme godt grunnet deres evne til sporulering og de er også funnet i meieriindustrien (Scheldeman et al., 2006).

Ved å studere resultater i artikkelen til Postollec et al. (2012) vil man se at *Brevibacillus* ikke ble funnet i de forskjellige melk- og melkeproduktene som ble presentert, men ble derimot funnet i tørkede produkter. Det ble funnet en alternativ bakterieart til *Br. thermoruber* ved BLAST søk i denne oppgaven og var arten *Br. borstelensis*. Undertegnede synes det har vært vanskelig å finne gode referanser for disse to artene av *Brevibacillus*, men fant fra et forsøk utført på melkepulver der *Br. borstelensis* ble funnet (Yuan et al., 2012), og ifølge Miller et al. (2015) er *Br. borstelensis* funnet i fôr konsentrat. I melken fra meieri B ble arten *A. thermoaerophilus* isolert i tillegg til *B. smithii*. Postollec et al. (2012) viser at bakterien *A. thermoaerophilus* er å finne i melk som har vært behandlet ved høye temperaturer over lengre periode, som i produksjon av melkepulver. Det var derfor sannsynlig at man kunne finne denne bakteriearten i melk som hadde vært behandlet med høye temperaturer i dette forsøket, noe den også ble, selv om høy temperatur over en lengre periode ikke ble benyttet i dette forsøket. *Bacillus smithii* har også vært vanskelig å finne gode nok referanser til, men Buehner et al. (2014) har vist at bakteriearten ble funnet i varmebehandlet melk om vinteren men i lavt antall.

#### 4.3.4 Isolerte bakteriearter i lagret melk fra meieri A og B i august

##### 4.3.4.1 Lagret melk 4 °C, 13 dager

For melk fra meieri A, lagret ved 4 °C i 13 dager, pasteurisert og inkubert ved 30 °C og 55 °C, ble det funnet termoresistente bakterier (2,6 log cfu/ml) og sporer (0,95 log cfu/ml) registrert, der kun bakterieslekten *Bacillus*, henholdsvis artene *B. mycoides*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* og *B. smithii* ble funnet. Melken som kom fra meieri B hadde et mer varierende artsmangfold av bakterier og sporer (*B. licheniformis*, *B. subtilis*, *K. rhizophila* og *A. thermoaerophilus*) der bakterietall var noe høyere (3,1 log cfu/ml) og noe lavere sporetall (0,3 log cfu/ml) enn melken fra meieri A. Som vist hadde den lagrede melken opprinnelig hentet fra meieri A et varierende artsmangfold av bakterieslekten *Bacillus* (4 arter) etter 72 °C varmebehandling og inkubering 30 °C og 55 °C, mens melken fra meieri B hadde et bredere slektsmangfold bestående av 3 forskjellige bakterieslekter. De fleste av artene tilhørende *Bacillus* slekten er mesofile og har evnen til å vokse ved lave temperaturer, men ikke så kaldt som 4 °C (Madigan et al., 2006).

Det ble det ikke forventet forhøyning av bakterie- og sporetall i melken som hadde vært lagret i 13 dager ved 4 °C, inkubert 30 °C og 55 °C, sammenliknet med fersk melk tappet i kartong, dette for begge meieriene, noe som også ble vist i dette masterforsøket. Altså: Fersk pasteurisert melk, fra augustuttaket, tappet i kartong, snitt fra begge meierier: 3 log cfu/ml (30 °C) og 1 log cfu/ml (55 °C), mens lagret melken (4 °C) viste celletall 3 log cfu/ml (30 °C) og 1 log cfu/ml (55 °C). Hadde melken derimot vært inkubert ved lavere temperaturer (psykrotrofe betingelser) ville man kunnet se et forhøyet mesofilt celletall da for eksempel bakterien *Pseudomonas* vokser ved 4 °C.

Det ble ikke fanget opp noen isolater av *B. cereus* for den ferske melken, derimot ble det funnet et isolat ved lagring i melken fra meieri B. Denne arten er fakultativ anaerob sporedanner som vokser ved temperaturer fra 5-55 °C (Adams og Moss). Man finner den overalt og det er en bakterie som kan gi sykdommer til mennesker og i tillegg danner den enzymer som kan gi produktødeleggende lukt og smak (Adams og Moss). Ettersom denne melken ble lagret ved 4 °C var det ikke forventet å finne mye av bakterien, men som sporedanner var det forventet å finne den. *Kocuria rhizophila* ble isolert fra den ferske melken hentet på meieri B, og det var derfor også forventet å kunne finne den i lagret kartong, noe den også ble. Bakterien er mesofil, danner ikke sporer og kan den ikke overleve pasteurisering. I følge El-Sharouny et al. (2013) er det ikke registrert at arten produserer noen form for enzymer, og vil derfor ikke gi noen form for produktødeleggelser. Videre er det viktig å huske at det ikke er mange år siden denne bakteriearten het noe annet. I følge Tang and Gillevet (2003) er bakterien *K. rhizophila* blitt omdøpt fra bakteriearten *Mi. luteus*. Det har vært vanskelig å finne gode artikler om *K. rhizophila* i varmebehandlet melk, og ved søk er det heller ikke det mange artikler om varmebehandlet melk og bakterien *Mi. luteus*. Walsh et al. (2012) har i sitt forsøk isolert bakterien *Mi. luteus* fra pasteurisert melk, som i stedet kunne ha vært arten *K. rhizophila*. De dominante mesofile artene av slekten *Bacillus* er *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* og *B. cereus*, der *B. cereus* og *B. pumilus* i tillegg kunne vokse ved lave temperaturer, det samme kunne *B. licheniformis* (Sutherland og Murdoch, 1994).

#### 4.3.4.2 Lagret melk 8 °C, 13 dager

Mesofile bakterier kan vokse ved lave temperaturer ( $\geq 5$  °C), jo høyere lagringstemperatur desto flere bakterier klarer å vokse opp (Madigan et al., 2006). Det ble derfor som forventet og vist i dette forsøket en økning av termoresistent mesofilt bakterietall (inkubering 30 °C) melk lagret i 13 dager, 8 °C sammenliknet med fersk melk tappet i kartong. For meieri A: fra 2,6 log cfu/ml til 6 log cfu/ml, hvor isolatene fra 8 °C melk ble kun arten *B. mycoides* identifisert (3 isolater). For meieri B hadde den ferske melken et bakterietall på 3,1 log cfu/ml og økte til 7 log cfu/ml ved 8 °C lagring, hvor bare arten *B. mycoides* også ble isolert (3 isolater). Det ble altså vist et litt høyere bakterietall ved mesofil temperaturbehandling og 8 °C lagring for meieri B enn ved meieri A etter endt lagring.

I kjølelageret melk er det ofte psykrotrofe bakterier som gir problemer (Adams og Moss, 2010), men ettersom det i dette forsøket kun er analysert for mesofile og termofile termoresistente bakterier vil ikke disse problemskapende bakterieslektene bli funnet her. Derimot er en rekke psykrotrofe arter av slekten *Bacillus* tidligere blitt registrert som kilde til matforgiftning (Adams og Moss, 2010). I melken for mesofilt termoresistent sporetall ble det registrert lav vekst (0,3 log cfu/ml), dette for begge meieriene. Det ble som også forventet at sporene ble identifisert som tilhørende slekten *Bacillus*.

Det ble for begge meieriene registrert et lavt innhold av mesofile sporulerende bakterier (0,1 log cfu/ml) etter 100 °C varmebehandling, der melk var lagret ved 8 °C i 13 dager. Disse bakterieisolatene ble identifisert som artene *B. licheniformis* (meieri A) og *K. rhizophila* (meieri B). Videre ble det for meieri A registrert et termofilt sporetall på 0,6 log cfu/ml mens for meieri B var sporetallet 4,7 log cfu/ml, hvor det høye sporetallet fra meieri B var uventet. Begge meieriene hadde funn av *B. licheniformis* og *A. thermoaerophilus* blant identifiserte isolat, og derfor er det uvisst av hvilken årsak det er at det uventede høye sporetallet inntraff.

#### 4.3.5 Sammenfatning av august og september-uttakene

Totalt ble det isolert 8 forskjellige bakterieslekter som representerer 16 forskjellige arter (8 av artene av slekten *Bacillus*) fra varmebehandlet melk i denne studien. De 3 dominerende slektene var: *Bacillus* (72 %), *Aneurinibacillus* (10 %), og *Kocuria* (9 %), mens de øvrige slektene som var tilstede representerte  $\leq 2$  % av isolatene (*Staphylococcus*, *Brevibacillus*, *Microbacterium*, *Brachybacterium* og *Streptococcus*). *Bacillus licheniformis* var den dominerende arten ved begge uttakene, også i melk lagret i 13 dager. Det ble omtrent ikke funnet noen arter av *B. cereus* gjennom hele forsøket. For bakterieslekten *Aneurinibacillus* var det kun arten *A. thermoaerophilus* som ble funnet, mens for slekten *Kocuria* var det *K. rhizophila* som ble isolert.

Ved å se på artsmangfoldet for den ferske melken, ved de to uttakene (august og september) og uttakssted 1-3, viste meieri A at melken derfra hadde et artsmangfold på 6 arter i august og i september var artsmangfoldet på 5. For uttaket i august bestod 2 av 6 isolater bakterieslekten *Bacillus* mens for september var 4 av 5 isolater bakterieslekten *Bacillus*. Melken fra begge uttakene viste en dominans av bakteriearten *B. licheniformis*, men et større artsmangfold av *Bacillus* i melken fra september enn melken fra august. Med tanke på de øvrige bakteriene som var tilstede i melken ved de to uttakene, ble det et større artsmangfold i melken fra august (4 arter) enn melken fra september (1 art), der *Br. thermoruber* var bakterien som ble funnet begge steder.

Melk hentet fra meieri B hadde et artsmangfold for august på 6 arter og melken fra uttaket i september hadde et artsmangfold på 8 arter. For uttaket i august bestod 8 av 11 isolater bakterieslekten *Bacillus* og var dominerende av *B. licheniformis* (5 av 11 isolater). Melken fra uttaket i september hadde også en dominans av bakterieslekten *Bacillus* (9 av 13 isolater), der arten *B. licheniformis* hadde en liten dominans (3 av 9 isolatene). Melken fra uttaket i september viste et større artsmangfold av *Bacillus* enn melken fra august med respektive 5 arter og 3 arter. Med tanke på de øvrige bakteriene som var tilstede i melken fra begge uttakene hadde melken fra august 3 andre arter mens september 4 arter.

Det ble i tillegg funnet en forskjellig artssammensetning av bakterieflora i uttakene fra august og september, noe som var forventet da bakterieinnholdet varierer med årstidene og nedbør. *B. amyloliquefaciens* ble for eksempel kun funnet i uttaket i september og ikke ved uttaket i august, dette for begge meieriene. August var en mer våt måned enn september. Det har vært en ganske varm høst, så kyrne var trolig fremdeles ute å beitet og har ikke vært inne i lengre perioder. I tillegg er det godt kjent at det kan være store variasjoner i artsmangfold av mikroorganismer



fra sted til sted. Ettersom gårdene melken kommer fra er spredt rundt i 2 fylker, vil dette også trolig ha av innvirkning for innholdet og mangfold av bakteriene i melken, både før og etter pasteurisering. Dette kan også stemme overens med funnene gjort i forsøket til Buehner et al. (2014). I den artikkelen ble det vist store årstidsvariasjoner i henhold til innhold av bakterier i fersk melk. Det ble funnet at melken om vinteren hadde et mindre mangfold av bakteriearter enn melken som ble analysert om sommeren. Dette kan indikere at melk og dens innhold av mikroorganismer er påvirket av omgivelsene kua lever i.

Sammenliknet med melken fra meieri A og meieri B, lagret melk (4 °C og 8 °C), mesofil inkubering (30 °C), hadde melken fra meieri B flest av bakterien *K. rhizophila* tilstede i melken. Selv om 29 % av isolatene fra den lagrede melken fra meieri B inneholdt denne bakterien, er det ikke av bekymring ettersom den trolig ikke danner enzymer.

Det ble ikke vist noen betydningsfulle forskjeller i celletallet fra melken som ble tatt ut ved de forskjellige stedene i produksjonen (silotank/balansetank, ferdigvaretank og fersk pasteurisert melk tappet i kartong og melk tappet i kartong lagret ved 4 °C i 13 dager. Melken som hadde vært lagret i 8 °C i 13 dager skiller seg ut fra de andre med betydelig høyere mesofilt celletall, samt det uventede høye celletallet ved 100 °C:55 °C.

I dette forsøket ble det ikke funnet noen Gram-negative bakterier, dette var forventet ettersom de ikke overlever pasteurisering (Adams og Moss, 2010), og i tillegg ble dette vist i artikkelen til Ranieri et al. (2009). I tillegg er det verd å nevne at ifølge Chen et al. (2004) er det uheldig at melk og melkeprodukter inneholder bakterieslekten *Bacillus*. Årsak for det er at de har evnen til å produsere både enzymene proteaser og lipaser. Disse enzymene er varmemestabile og kan være aktive selv i melkepulver, noe som også er nevnt tidligere oppgaven.

For å kunne presentert et mere reelt resultat av dette forsøket hadde det absolutt vært en fordel å ha sekvensert alle isolatene som ble isolert. Det ville da ha gitt for de fleste uttaksstedene og temperaturregimene gitt flere bakteriestammer og trolig flere arter å kunne sammenliknet med.

#### 4.3.6 Videre arbeid

Angående videre arbeid kunne det vært av interesse å undersøke vekst til en del av *Bacillus* isolatene ved lave temperaturer, f. eks 10 grader (da kjølelageret melk kan eksponeres for litt høyere temperatur ved brutt kjølekjede (på frokostbordet, oppbevaring i varm bil osv.). Videre også deres kvalitetsødeleggingspotensiale ved for eksempel tilstedeværelse av proteinaser, lipaser og fosfolipaser, samt helt klart identifisering av et større antall fra hvert uttak.

Resultatene fra oppgaven kan være nyttige for meieriindustriens arbeid om kvalitetssikring og risikovurdering, samt kunne redusere svinn under og etter produksjon av melk om melkeprodukter.

### 5 Konklusjon

Det ble for dette mastergradsforsøket funnet flest av den termoresistente bakterieslekten *Bacillus*, der den enzymproduserende arten *B. licheniformis* ble funnet som den mest dominante, dette for begge meieriene. For fersk varmebehandlet melk fra meieri A var 76 % av isolatene *Bacillus* og for meieri B var 61 % av isolatene tilhørende denne slekten. For den lagrede melken ble det funnet ut at 92 % av isolatene var *Bacillus* for meieri A, og 69 % av isolatene var tilhørende *Bacillus* slekten for meieri B. De samme tendensene ble også sett i melken ved de forskjellige uttakspunktene i produksjonen ved begge meieriene fra august og i melken fra meieri A i september. Melken fra meieri B i september skiller seg ut med funn av et større spekter av arter.

Totalt sett ble det ikke registrert mye vekst av termofile bakterier og sporer ved de forskjellige stedene i produksjonen, men ettersom de fleste av bakteriene som var tilstede i melken er mesofile, vil de kunne vokse opp ved ugunstig/dårlig kjølekjede i produksjonen og hos kundene/forbrukerne. Et høyt nivå av bakteriearten *B. licheniformis* sammen med andre enzymproduserende og sporedannende arter i melk, vil trolig være en av årsakene til at melk blir degradert på meieriene. På grunnlag av dette, vil det derfor være viktig for meieriindustrien å få ned innholdet av de termoresistente bakteriene i melken før, under og etter pasteurisering.

## 6 Referanser

- ADAMS, M. R. & MOSS, M. O. 2010. *Food microbiology*, University of Surrey, Guildford. U K, RSC Publishing.
- AURELI, P. & FRANCIOSA, G. 2002. *Clostridium spp.* *Encyclopedia of dairy sciences*, 1, 456-463.
- BACMAP, G. A. 2015. *Kocuria rhizophila* DC2201 [Online]. Available: <http://bacmap.wishartlab.com/organisms/688> [Accessed 02 desember 2015].
- BANYKÓ, J. & VYLETĚLOVÁ, M. 2009. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in applied microbiology*, 48, 318-323.
- BARTOSZEWICZ, M., HANSEN, B. M. & SWIECICKA, I. 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food microbiology*, 25, 588-596.
- BLAST. 2015. *Basic Local Alignment Search Tool* [Online]. Available: [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) [Accessed 11 oktober 2015].
- BUEHNER, K. P., ANAND, S. & DJIRA, G. D. 2015. Prevalence of thermophilic bacteria and spores in nonfat dry milk powders of Midwest origin. *Journal of dairy science*, 98, 2861-2866.
- BUEHNER, K. P., ANAND, S. & GARCIA, A. 2014. Prevalence of thermophilic bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. *Journal of dairy science*, 97, 6777-6784.
- BURGESS, S. A., LINDSAY, D. & FLINT, S. H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology*, 144, 215-225.
- BYLUND, G. S. 1995. *Dairy processing handbook*, Sverige, TetraPak processing systems AB.
- CHAUHAN, K., DHAKAL, R., SEALE, R. B., DEETH, H. C., PILLIDGE, C. J., POWELL, I. B., CRAVEN, H. & TURNER, M. S. 2013. Rapid identification of dairy mesophilic and thermophilic sporeforming bacteria using DNA high resolution melt analysis of variable 16S rDNA regions. *International journal of food microbiology*, 165, 175-183.
- CHEN, L., COOLBEAR, T. & DANIEL, R. M. 2004. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus sp.* isolated from milk powder production lines. *International dairy journal*, 14, 495-504.
- CHRISTIANSSON, A., BERTILSSON, J. & SVENSSON, B. 1999. *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of dairy science*, 82, 305-314.
- CLAEYS, W. L., CARDOEN, S., DAUBE, G., DE BLOCK, J., DEWETTINCK, K., DIERICK, K., DE ZUTTER, L., HUYGHEBAERT, A., IMBERECHTS, H., THIANGE, P., VANDENPLAS, Y. & HERMAN, L. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food control*, 31, 251-262.
- COSENTINO, S., MULARGIA, A. F., PISANO, B., TUVERI, P. & PALMAS, F. 1997. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International journal of food microbiology*, 38, 235-238.
- EL-SHAROUNY, E. E., BELAL, M. A. & YUSEF, H. H. 2013. Isolation and characterization of two novel local psychrotolerant *Kocuria spp.* with high affinity towards metal cations biosorption. *Life science journal*, 10.
- ERCOLINI, D., RUSSO, F., FERROCINO, I. & VILLANI, F. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food microbiology*, 26, 228-231.

- FLINT, S. H., WARD, L. J. H. & WALKER, K. M. R. 2001. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S–23S internal spacer region. *Systematic and applied microbiology*, 24, 539-548.
- FROMM, H. I. & BOOR, K. 2004. Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of food science*, 69, M207-M214.
- GILMOUR, A. & ROWE, M. 1990. Microorganisms associated with milk. *Dairy microbiology*, 1, 37-75.
- GLEESON, D., O'CONNELL, A. & JORDAN, K. 2013. Review of potential sources and control of thermotolerant bacteria in bulk-tank milk. *Irish journal of agricultural and food research*, 52, 217-227.
- GRAMUN, P. E. (ed.) 2012. *Matforgiftning, næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, Kristiansand: Høyskoleforlaget AS
- GRØNLIEN, H. K., RYVARDEN, L. & TANDBERG, C. 2008. **Bi2 Grunnbok**, Gyldendal norsk forlag AS.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- HE, H., DONG, J., LEE, C. N. & LI, Y. 2009. Molecular analysis of spoilage-related bacteria in pasteurized milk during refrigeration by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of food protection*, 72, 572-577.
- HERLIN, A. H. & ANDERSSON, I. 1996. *Soil ingestion in farm animals*, Department of agricultural biosystems and technology, Swedish university of agricultural sciences.
- KIRSCHNER, C., MAQUELIN, K., PINA, P., NGO THI, N. A., CHOO-SMITH, L.-P., SOCKALINGUM, G. D., SANDT, C., AMI, D., ORSINI, F., DOGLIA, S. M., ALLOUCH, P., MAINFAIT, M., PUPPELS, G. J. & NAUMANN, D. 2001. Classification and identification of *Enterococci*: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of clinical microbiology*, 39, 1763-1770.
- KLOOS, W. E. & SCHLEIFER, K. H. 1975. Isolation and characterization of staphylococci from human skin II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *International journal of systematic bacteriology*, 25, 62-79.
- LÜCKING, G., STOECKEL, M., ATAMER, Z., HINRICHS, J. & EHLING-SCHULZ, M. 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International journal of food microbiology*, 166, 270-279.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. & BROCK, T. D. 2006. *Brock, Biology of microorganisms*, prentice hall Upper Saddle River, NJ.
- MARCHAND, S., DE BLOCK, J., DE JONGHE, V., COOREVITS, A., HEYNDRICKX, M. & HERMAN, L. 2012. Biofilm formation in milk production and processing environments; Influence on milk quality and safety. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 11, 133-147.
- MCCARTNEY, A. L. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British journal of nutrition*, 88, s29-s37.
- MELLEGÅRD, H. 2015. Prosjektbeskrivelse for prosjekt: Bakteriefloren og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukter: potensiale for forringelse og sykdom.
- MILLER, R. A., KENT, D. J., BOOR, K. J., MARTIN, N. H. & WIEDMANN, M. 2015. Different management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk. *Journal of dairy science*, 98, 4338-4351.

- MURPHY, S. 1997. Raw milk bacteria tests: Standard plate count, preliminary incubation count, lab, pasteurization count and coliform count. What do they mean for your farm. *Natl. mastitis council. reg. mtg., syracuse, New York. Natl. mastitis council, Inc., Madison, WI*, 34-41.
- PARKAR, S. G., FLINT, S. H., PALMER, J. S. & BROOKS, J. D. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 90, 901-908.
- POSTOLLEC, F., MATHOT, A.-G., BERNARD, M., DIVANAC'H, M.-L., PAVAN, S. & SOHIER, D. 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International journal of food microbiology*, 158, 1-8.
- QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F. & COTTER, P. D. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International journal of food microbiology*, 150, 81-94.
- QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., STANTON, C., BERESFORD, T. P., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F. & COTTER, P. D. 2013. The complex microbiota of raw milk. 37, 664-698.
- RANIERI, M. L., HUCK, J. R., SONNEN, M., BARBANO, D. M. & BOOR, K. J. 2009. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal of dairy science*, 92, 4823-4832.
- SCHELDEMAN, P., HERMAN, L., FOSTER, S. & HEYNDRIX, M. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of applied microbiology*, 101, 542-555.
- SCOTT, S. A., BROOKS, J. D., RAKONJAC, J., WALKER, K. M. R. & FLINT, S. H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International journal of dairy technology*, 60, 109-117.
- SUTHERLAND, A. D. & MURDOCH, R. 1994. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International journal of food microbiology*, 21, 279-292.
- SVENSSON, B., ENEROTH, Å., BRENDENHAUG, J., MOLIN, G. & CHRISTIANSSON, A. 2000. Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by *Bacillus cereus* in a commercial dairy plant. *Journal of dairy research*, 67, 455-460.
- SØRHAUG, T. & STEPANIAK, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in food science & technology*, 8, 35-41.
- TANG, J. S. & GILLEVET, P. M. 2003. Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53, 995-997.
- TEMMERMAN, R., HUYS, G. & SWINGS, J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in food science & technology*, 15, 348-359.
- TINE 2014. Årsrapport 2014.
- VACHEYROU, M., NORMAND, A.-C., GUYOT, P., CASSAGNE, C., PIARROUX, R. & BOUTON, Y. 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International journal of food microbiology*, 146, 253-262.
- VISSERS, M. M. M., TE GIFFEL, M. C., DRIEHUIS, F., DE JONG, P. & LANKVELD, J. M. G. 2007. Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. *Journal of dairy science*, 90, 281-292.

- WALSH, C., MEADE, J., MCGILL, K. & FANNING, S. 2012. The biodiversity of thermotolerant bacteria isolated from whey. *Journal of Food Safety*, 32, 255-261.
- WALSTRA, P., WALSTRA, P., WOUTERS, J. T. & GEURTS, T. J. 2005. *Dairy science and technology*, CRC press.
- WARTH, A. 1980. Heat stability of *Bacillus cereus* enzymes within spores and in extracts. *Journal of bacteriology*, 143, 27-34.
- WATSON, J. D., GANN, A., BAKER, T. A., LEVINE, M., BELL, S. P., LOSICK, R. & HARRISON, S. C. 2014. *Molecular biology of the gene*, Person education, USA.
- WENG, F. Y., CHIOU, C. S., LIN, P. H. P. & YANG, S. S. 2009. Application of recA and rpoB sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species. *Journal of applied microbiology*, 107, 452-464.
- WOESE, C. R., FOX, G. E., ZABLEN, L., UCHIDA, T., BONEN, L., PECHMAN, K., LEWIS, B. J. & STAHL, D. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 83-6.
- WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J. & SMIT, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International dairy journal*, 12, 91-109.
- YUAN, D.-D., LIU, G.-C., REN, D.-Y., ZHANG, D., ZHAO, L., KAN, C.-P., YANG, Y.-Z., MA, W., LI, Y. & ZHANG, L.-B. 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food control*, 25, 752-757.

## Vedlegg 1.

### Beregning av glyserol

$$60 \% \times V_1 = 15\% \times 1 \text{ ml}$$

$$V_1 = 250 \text{ }\mu\text{l 60\% glyserol}$$

$$750 \text{ }\mu\text{l bakteriekultur}$$

Der:  $C_1$  = % glyserol i opprinnelig løsning,  $V_1$  = mengde glyserol i  $\mu\text{l}$ ,  $C_2$  = % glyserol i bakteriekultur og  $V_2$  = endelig volum (1 ml) av bakteriekultur i BHI tilsatt 15 % glyserol og % glyserol i røret.

### Tillaging av 50xTAE og 1xTAE

#### 50xTAE stamløsning (1L)

- 242 g Tris Base (Merck)
  - 57,1 ml Isedikk (Merck)
  - 100 ml 0,5M EDTA, pH 8 (Sigma-Aldrich)
    - Tris Base løses opp i 600 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Deretter tilsettes EDTA og isedikk.
- Til slutt tilsettes det  $\text{dH}_2\text{O}$  i løsningen til men har totalt 1 liter 50xTAE.

#### 1xTAE (2L)

Fortynning av 50xTAE til 1xTAE. Følgende utregning benyttes:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$C_1$  = 50xTAE,  $V_1$  = mengde 50xTAE (ml),  $C_2$  = 1xTAE,  $V_2$  = Total mengde 1xTAE

- $50\text{xTAE} \times V_1 (50\text{xTAE, ml}) = 1\text{xTAE} \times 2000 \text{ ml}$
- $V_1 = 50\text{xTAE} = 40 \text{ ml}$ , som fortynnes med  $\text{dH}_2\text{O}$  til 2L 1xTAE

## Vedlegg 2:

### Rådata fra hele uttaket. Prøve 1- 393, fordelt på tabell I, II, III, IV, V og VI

Tabell I: Oversikt over rådata for uttaket i august fra prøve 1 – 68. Tabellen angir varmebehandlingstemperatur, morfologi til dyrket koloni, morfologi ved mikroskopering, samt 16S rDNA sekvenserings-resultater (Bakterie isolat) for meieri A og B (der parentes representerer alternative funn ved sekvenseringen). Blanke felt i kolumnene for morfologi representerer ingen vekst i BHI buljong og blanke felt i Bakterie kolumnene representerer prøver som ikke ble analysert med 16S rDNA sekvensering. Rød tekst i tabellen er sekvenser som ikke ble medberegnert i resultatene, der årsak er notert.

Prøve	Uttak-sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie isolat	Prøve	Uttak-sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie isolat
1	1	B	63:30	Store	Staver <sup>ab</sup>		36	3.1	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
2	1	B	63:30	Store	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. cereus (B.thuringensis og B. toyonensis)</i>	37	3.1	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
3	1	B	63:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		38A	3.1	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
4	1	B	63:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		38B	3.1	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
5	1	B	63:30	Små	Kokker <sup>ac</sup>	<i>St. thermophilus</i>	39A	3.1	A	72:30	Små	Kokker	
6	2	B	72:30	Store	Staver <sup>ab</sup>		39B	3.1	A	72:30	Små	Kokker	<i>Microbacterium (feil morfologi)</i>
7	2	B	72:30	Små	Kokker <sup>ac</sup>		40	3.1	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
8	2	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		41	3.2	A	72:30	Spreder	Sporer <sup>ab</sup>	*
9	2	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		42	3.2	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
10	2	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i>	43	3.2	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
11	3.1	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		44	3.2	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
12	3.1	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		45	3.2	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
13	3.1	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	Lav skår ved 16S rDNA sekvensering	46	3.3	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
14	3.1	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		47	3.3	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
15	3.1	B	72:30	Store	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. cereus (B. thuringensis)</i>	48	3.3	A	72:30	Små	Staver <sup>ac</sup>	<i>B. licheniformis</i>
16	3.2	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		49	3.3	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
17	3.2	B	72:30	Store	Kokker <sup>ab</sup>		50	3.3	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
18	3.2	B	72:30	Store	Kokker <sup>ab</sup>		51	1	A	63:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
19	3.2	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		52	1	A	63:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
20	3.2	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		53	1	A	63:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
21	3.3	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		54	2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
22	3.3	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		55	2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
23	3.3	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		56	2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
24	3.3	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		57	3.1	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
25	3.3	B	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		58	3.1	A	72:55			
26	1	A	63:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		59	3.1	A	72:55			
27	1	A	63:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		60	3.2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
28	1	A	63:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		61	3.2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> * ( <i>B. aerius</i> )
29	1	A	63:30	Store	Staver <sup>ab</sup>	<i>Bacillus sp.</i>	62	3.3	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
30	1	A	63:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	<i>M. schleiferi (M. lacticum)</i>	63	3.3	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
31	2	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		64	3.3	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis (B. aerius)</i>
32	2	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		65	1	B	63:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
33	2	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	<i>Bra. nesterenkovii (Bra. Squillanum)</i>	66	1	B	63:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
34	2	A	72:30				67	1	B	63:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
35	2	A	72:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>		68	1	B	63:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*

\* Hvitt belegg på BHI-buljong etter inkubering

\*\* 1. Silo (A), Balansetank (B), 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk.

\*\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

a = isolatet er Gram-positiv

b = isolatet registrert med katalase-positiv aktivitet

c = isolatet registrert med katalase-negativ aktivitet



Tabell II: Oversikt over rådata for uttaket i august fra prøve 69 – 132. Tabellen angir varmebehandlingstemperatur, morfologi til dyrket koloni, morfologi ved mikroskopering (Morf.), samt 16S rDNA sekvenseringsresultater (Bakterie isolat) for meieri A og B (der parentes representerer alternative funn ved sekvenseringen). Blanke felt i kolumnene for morfologi representerer ingen vekst i BHI buljong og blanke felt i Bakterie kolumnene representerer prøver som ikke ble analysert med 16S rDNA sekvensering.

Prøve	Uttaks- sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie	Prøve	Uttaks- sted **	Meieri	Temp (°C) ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie
69A	2	B	72:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	102	1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>
69B	2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *	103	2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>
70A	2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		104	2	A	100:55			
70B	2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		105	2	A	100:55			
71	3.1	B	72:55				106	3.1	A	100:55			
72	3.1	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>	107	3.1	A	100:55	Små	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> * ( <i>B. aerius</i> )
73	3.2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		108	3.2	A	100:55			
74	3.2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		109	3.2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
75	3.2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		110	3.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> ( <i>B. aerius</i> )
76	3.3	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>	111	3.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>Br. thermoruber</i> ( <i>Br. borstelensis</i> og <i>Br. levikii</i> )
77	3.3	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. pumilus</i> ( <i>B. safensis</i> )	112A	4.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
78	1	B	100:30				112B	4.1	B	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
79	1	B	100:30				113	4.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
80	1	B	100:30				114	4.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> )
81	2	B	100:30				115	4.1	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
82	2	B	100:30				116	4.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
83	1	B	100:55				117	4.2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
84	1	B	100:55				118	4.2	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
85	1	B	100:55				119	4.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
86	2	B	100:55				120	4.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
87	2	B	100:55				121	4.2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
88	3.3	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i>	122A	4.3	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
89	3.3	B	100:55				122B	4.3	B	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> ( <i>B. sonorensis</i> )
90	1	A	100:30				123	4.3	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
91	1	A	100:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>	124A	4.3	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
92	1	A	100:30				124B	4.3	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
93	2	A	100:30				125	4.3	B	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	
94	2	A	100:30				126	4.3	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
95	2	A	100:30	Spreader	Kokker <sup>ab</sup>	<i>S. hominis</i>	127A	5.1	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
96	3.1	A	100:30				127B	5.1	B	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
97	3.2	A	100:30				128	5.1	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
98	3.3	A	100:30				129	5.1	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
99	1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>	130	5.1	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
100	1	A	100:55				131	5.1	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
101	1	A	100:55				132	5.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	

\* Hvitt belegg på BHI-buljong etter inkubering

\*\* 1. Silo (A), Balansetank (B), 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk, 4. Kartong lagret melk 4 °C, 13 dager, 5. Kartong lagret melk 8 °C, 13 dager

\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

a = isolatet er Gram-positiv    b = isolatet registrert med katalase-positiv aktivitet

Tabell III: Oversikt over rådata for uttaket i august fra prøve 133 – 201. Tabellen angir varmebehandlingstemperatur, morfologi til dyrket koloni, morfologi ved mikroskopering (Morf.), samt 16S rDNA sekvenseringsresultater (Bakterie isolat) for meieri A og B (der parentes representerer alternative funn ved sekvenseringen). Blanke felt i kolumnene for morfologi representerer ingen vekst i BHI buljong og blanke felt i Bakterie kolumnene representerer prøver som ikke ble analysert med 16S rDNA sekvensering.

Prøve	Uttaks -sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie	Prøve	Uttaks -sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie
133	5.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		167	5.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
134	5.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		168	5.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycoises</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )
135	5.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		169	5.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
136	5.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycooides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )	170	5.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
137	5.3	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		171	5.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
138	5.3	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycooides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )	172	4.1	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i>
139	5.3	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycooides</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )	173	4.1	B	72:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
140	5.3	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		174	4.1	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
141	5.3	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		175	4.2	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
142	4.1	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		176	4.2	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
143	4.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycoises</i> ( <i>B. weihwnstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )	177	4.2	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i>
144	4.1	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. subtilis</i> * ( <i>B. tequilensis</i> )	178	4.3	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
145	4.1	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. subtilis</i> * ( <i>B. tequilensis</i> )	179	4.3	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
146	4.1	A	72:30				180	4.3	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. subtilis</i> * ( <i>B. tequilensis</i> )
147	4.2	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		181	4.3	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
148	4.2	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> ( <i>B. aerius</i> )	182	4.3	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
149	4.2	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>		183	4.1	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
150	4.2	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>		184	4.1	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
151	4.2	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>		185	4.1	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
152	4.3	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>		186	4.1	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
153A	4.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		187	4.2	A	72:55	Tørr hvit	Sopp (?)	*
153B	4.3	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>		188	4.2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
154	4.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		189	4.2	A	72:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. smithinii</i>
155	4.3	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		190	4.2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
156	4.3	A	72:30	Små	Staver <sup>ab</sup>		191	4.2	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
157	5.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		192	4.3	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
158	5.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycoises</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )	193	4.3	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> * ( <i>B. subtilis</i> )
159	5.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		194	4.3	A	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
160	5.1	A	72:30	Spreder	Staver <sup>ab</sup>		195	5.1	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
161	5.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		196	5.1	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	
162	5.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		197	5.2	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. subtilis</i> * ( <i>B. tequilensis</i> )
163	5.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		198	5.2	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
164	5.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		199	5.2	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
165	5.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		200	5.3	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*
166	5.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycoises</i> ( <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )	201	5.3	B	72:55	Spreder	Staver <sup>ab</sup>	*

\* Hvitt belegg på BHI-buljong etter inkubering

\*\* 4. Kartong lagret melk 4 °C, 13 dager, 5. Kartong lagret melk 8 °C, 13 dager

\*\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

a = isolatet er Gram-positiv

b = isolatet registrert med katalase-positiv aktivitet

Tabell IV: Oversikt over rådata for uttaket fra prøve 202 – 338 for september. Tabellen angir varmebehandlingstemperatur, morfologi til dyrket koloni, morfologi ved mikroskopering (Morf.), samt 16S rDNA sekvenseringsresultater (Bakterie isolat) for meieri A og B (der parentes representerer alternative funn ved sekvenseringen). Blanke felt i kolumnene for morfologi representerer ingen vekst i BHI buljong og blanke felt i bakterie kolumnene representerer prøver som ikke ble analysert med 16S rDNA sekvensering. Rød tekst i tabellen er sekvenser som ikke ble medberegnet i resultatene, der årsak er notert.

Prøve	Uttaks- sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterier	Bakterie	Prøve	Uttaks- sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie
202	5.1	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	236	4.1	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	Ingen nukleotider ved sekvensering
203	5.1	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *	237	4.1	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> )
204	5.2	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		238	5.1	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
205	5.2	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> * (kort sekvens)	239	5.3	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
206	5.3	A	72:55	Hvit tørr	Sopp (?)	*	240	5.3	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> )
207A	5.3	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	241	5.3	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	
207B	5.3	A	72:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	242	5.3	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> )
208	5.3	A	72:55				243	5.3	B	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> )
209	5.1	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *	244	4.1	A	100:30			
210	5.1	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	Ingen Signifikante Funn*	245	4.3	A	100:30	Hvite	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihwnstephanensis</i> , <i>B. cereus</i> )
211	5.3	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	246	4.3	A	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	Ingen Signifikante Funn
212	5.3	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i>	247	4.3	A	100:30	Små	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> )
213	5.1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		248	5.2	A	100:30	Små	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>
214	5.1	A	100:55				249	5.3	A	100:30			
215	5.1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i> ( <i>A. danicus</i> )	250	1	B	63:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
216	5.2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i>	251	1	B	63:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
217	5.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>	252	1	B	63:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
218	4.1	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		253	1	B	63:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>
219	4.1	B	100:55				254	2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
220	4.1	B	100:55				255	2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
221	4.2	B	100:55				256	3.1	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
222	4.2	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	Ingen Signifikante Funn	257	3.1	B	72:55			
223	4.3	B	100:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>Oxybacillus flavithermus</i> (kort sekvens)	258	3.2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
224	4.3	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *	259	3.2	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
225	4.1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. Thermoaerophilus</i> *	260	3.3	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
226	4.1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	261	3.3	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
227	4.1	A	100:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		262	3.3	B	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i>
228	4.1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	For lav skår	263	3.3	B	72:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
229	4.2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		264	3.3	B	72:55			
230	4.2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	265	1	A	63:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
231	4.2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	Ingen Signifikante Funn *	266	1	A	63:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
232	4.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		267	1	A	63:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
233	4.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		268	1	A	63:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
234	4.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		269	2	A	72:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *
235	4.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		270	2	A	72:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *

\* Hvitt belegg på BHI-buljong etter inkubering

\*\* 1. Silo (A), Balansetank (B), 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk, 4. Kartong lagret melk 4 °C, 13 dager, 5. Kartong lagret melk 8 °C, 13 dager

\*\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur.

a = isolatet er Gram-positiv, b = isolatet registrert med katalase-positiv aktivitet

Tabell V: Oversikt over rådata for uttaket fra prøve 271 – 338 for september. Tabellen angir varmebehandlingstemperatur, morfologi til dyrket koloni, morfologi ved mikroskopering, samt 16S rDNA sekvenseringsresultater (bakterie isolat) for meieri A og B (der parentes representerer alternative funn ved sekvenseringen). Blanke felt i kolumnene for morfologi representerer ingen vekst i BHI buljong og blanke felt i bakterie kolumnene representerer prøver som ikke ble analysert med 16S rDNA sekvensering. Rød tekst i tabellen er sekvenser som ikke ble medberegnet i resultatene, der årsak er notert.

Prøve	Uttaks-sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie	Prøve	Uttaks-sted **	Meieri	Temp °C***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie
271	2	A	72:55	Hvit, tørr	Sopp (?)		305	2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	Ingen PCR produkt
272	3.1	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	306	2	A	100:55			
273	3.1	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	307	3.1	A	100:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>Br. borstelensis</i> (kort sekvens)
274	3.1	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	308	3.1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
275	3.1	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	309	3.2	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i>
276	3.1	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	310	3.2	A	100:55			
277	3.2	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	311	3.2	A	100:55			
278A	3.2	A	72:55	Hvit tørr	Sopp (?)		312	3.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
278B	3.2	A	72:55	Tørr	Sopp (?)		313	3.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
279	3.2	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	314	3.3	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
280	3.2	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	315	1	B	63:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. pumilus</i> * ( <i>B. safensis</i> )
281	3.3	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	316	1	B	63:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
282	3.3	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	317	1	B	63:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
283	3.3	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	318A	1	B	63:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
284	3.3	A	72:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *	318B	1	B	63:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
285	1	B	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>A. thermoaerophilus</i>	319	1	B	63:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
286	1	B	100:55				320	1	B	63:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. pumilus</i> ( <i>B. safensis</i> )
287	1	B	100:55				321	2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
288	1	B	100:55				322	2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
289	1	B	100:55				323	2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
290	1	B	100:55				324	2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
291	2	B	100:55				325	2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	<i>S. warneri</i> ( <i>S. pasteurii</i> )
292	2	B	100:55				326	2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
293	2	B	100:55				327	3.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
294	2	B	100:55				328	3.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
295	2	B	100:55				329	3.1	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	
296	2	B	100:55				330	3.1	B	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
297	3.1	B	100:55				331	3.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
298	3.2	B	100:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. smithii</i>	332	3.1	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
299	1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>		333	3.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> (lav skår identitet)
300	1	A	100:55	Små	Staver <sup>ab</sup>	*	334	3.2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
301	1	A	100:55	Tørre	Staver <sup>ab</sup>		335	3.2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	<i>K. rhizophila</i> ( <i>K. varians</i> , <i>K. marina</i> )
302	1	A	100:55	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	336	3.2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
303	1	A	100:55	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>Br. thermoruber</i> *( <i>Br. borstelensis</i> )	337	3.2	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>	
304	2	A	100:55				338	3.2	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	

\* Hvitt belegg på BHI-buljong etter inkubering

\*\* 1. Silo (A), Balansetank (B), 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk

\*\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

a = isolatet er Gram-positiv,

b = isolatet registrert med katalase-positiv aktivitet

Tabell VI: Oversikt over rådata for uttaket fra prøve 339 - 393 for september. Tabellen angir varmebehandlingstemperatur, morfologi til dyrket koloni, morfologi ved mikroskopering (Morf.), samt 16S rDNA sekvenseringsresultater (bakterie isolat) for meieri A og B (der parentes representerer alternative funn ved sekvenseringen). Blanke felt i kolumnene for morfologi representerer ingen vekst i BHI buljong og blanke felt i bakterie kolumnene representerer prøver som ikke ble analysert med 16S rDNA sekvensering. Rød tekst i tabellen er sekvenser som ikke ble medberegnet i resultatene, der årsak er notert.

Prøve	Uttaks- sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie	Prøve	Uttaks- sted **	Meieri	Temp °C ***	Morf. koloni	Morf. bakterie	Bakterie
339	3.3	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>		366	3.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
340	3.3	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>		367	3.2	A	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
341	3.3	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>		368	3.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
342	3.3	B	72:30	Hvit	Kokker <sup>ab</sup>		369	3.3	A	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
343	3.3	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		370	3.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
344	3.3	B	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>		371	3.3	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*
345	1	A	63:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	372	3.3	A	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
346	1	A	63:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	373	3.3	A	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*
347A	1	A	63:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. altitudinis</i> (67% cover)*	374	1	B	100:30			
347B	1	A	63:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	375	1	B	100:30			
348	1	A	63:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	376	1	B	100:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. amyloliquefaciens</i> * ( <i>B. subtilis</i> )
349	1	A	63:30		Staver <sup>ab</sup>		377	2	B	100:30			
350	1	A	63:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	378	2	B	100:30			
351	2	A	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	*	379	2	B	100:30			
352	2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	380	2	B	100:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. mycoides</i> ( <i>B. weihenstephansensis</i> )
353	2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	381	3.1	B	100:30			
354	2	A	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. pumilus</i> *	382	3.1	B	100:30			
355	2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	383	3.1	B	100:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. amyloliquefaciens</i> *
356	3.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	384	3.2	B	100:30			
357	3.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	385	3.3	B	100:30			
358	3.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	386	1	A	100:30			
359	3.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	387	1	A	100:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. amyloliquefaciens</i> ( <i>B. subtilis</i> )
360	3.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	388	1	A	100:30			
361	3.1	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	389	1	A	100:30			
362	3.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	390	2	A	100:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. amyloliquefaciens</i> * ( <i>B. subtilis</i> )
363	3.2	A	72:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. subtilis</i> *	391	2	A	100:30			
364	3.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *	392	3.3	A	100:30	Spreader	Staver <sup>ab</sup>	
365	3.2	A	72:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	*	393	3.3	A	100:30	Hvit	Staver <sup>ab</sup>	<i>B. licheniformis</i> *

\* Hvitt belegg på BHI-buljong etter inkubering

\*\* 1. Silo (A), Balansetank (B), 2. Ferdigvaretank, 3. Kartong fersk melk

\*\*\* Temp = varmebehandlingstemperatur : inkuberingstemperatur

a = isolatet er Gram-positiv,

b = isolatet registrert med katalase-positiv aktivitet



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)