



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 sp
Fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

Mikrobiell kvalitet av melk gjennom verdikjeden – med fokus på *Bacillus cereus*

Microbial quality of milk through the value chain –
with focus on *Bacillus cereus*

Monica Håland
Matvitenskap – Mattrygghet, kvalitet og hygiene

Forord

Denne oppgaven ble skrevet i samarbeid med Tine og Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (KBM) ved Norges Miljø og Biovitenskaplige Universitet (NMBU) som en del av prosjektet «Bakteriefloraen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukt: potensiale for forringelse og sykdom» (Mellegård, 2015). Oppgaven er en avsluttende del av mastergraden i Matvitenskap- mattrygghet, kvalitet og hygiene 2017 og tilsvarer 30 sp av totalt 120 sp av graden.

Hovedveileder og biveileder for oppgaven var Professor Siv Skeie og Postdoc Davide Porcellato. Takk til dere begge for god veiledning.

Takk til May Aalberg og Ahmed Abdelghani for god hjelp på laboratoriet, Francesco Tomarchio for utførelse av ddPCR, Christine de Billiot for utplating av prøvene og Inga Horntvedt Thorsen for godt samarbeid. Stor takk også til melkemottaket og tankbilsjåførene ved Tine for hjelp med innsamling av prøver, og Julie Wiik og Roger Skau for informasjon om melkerom og gårdstan.

Sammendrag

Ved identifisering av total mikrobiota ved hjelp av kultur-uavhengige metoder ved utvalgte punkt i verdikjeden til lettmelk, og ved bruk av sjekklister for ulike faktorer på gård, var det mulig å identifisere faktorer og utstyr som påvirket den mikrobielle kvaliteten til melken. Det har tidligere blitt vist at både biofilm, melkeanlegg og meieriutstyr kan påvirke mikrobiotaen i melk.

Prøvepunktene i verdikjeden hvor det ble tatt ut melkeprøver var på gårdstank, lass fra tankbil, silotank på meieri, ferdigvaretank etter pasteurisering, melk på kartong ved produksjonsdag og melk på kartong ved utgått holdbarhet etter 14 dager, lagret ved 4, 6 og 8 °C. Ut i fra disse prøvepunktene var det mulig å se at den mikrobielle kvaliteten til rå melk kunne påvirke den mikrobielle kvaliteten ved utgått holdbarhet på kartong, samt at blanding av melk med melk fra andre ruter som hadde en annen bakterieflora kunne forårsake en mulig utblandingseffekt som førte til mindre *Bacillus* ved utgått holdbarhet. Resultatene viste at ved utgått holdbarhet dominerte *Pseudomonas* og *Bacillus* ved alle tre lagringstemperaturene, med størst mengde *Bacillus* ved lagring på 8 °C. Størst mengde *Bacillus* ved utgått holdbarhet, for lagring ved 4 og 6 °C, ble sett for uttakene med størst mengde *Bacillus* i rå melken på gård. Det ble også observert at en mulig biofilmdannelse i tankbil, pasteureren eller ferdigvaretanken på meieriet kan bidra med bakterier til melken.

På gårdene ble det sett på ulike faktorer som kunne påvirke det mikrobielle innholdet i melken; vask av gårdstank (automatisk eller manuell), type gårdstank (Wedholms eller Landteknikk), fôrsupplement (potet eller fôrsukkerbeter i tillegg til surfôr og kraftfôr), fjøstype (bås eller løsdrift), melkesystem (robot, melkestall eller rørmelkesystem), proppen til tappestussen på gårdstanken (av eller på) og om fjøsdøren var åpen inn til melkerommet. Av disse faktorene ble det funnet at automatisk vask av Wedholmstank ga større mengde og spredning i type bakterier enn ved automatisk vask av Landteknikkstank. Fôrsupplement med potet i tillegg til surfôr og kraftfôr ga også et høyere antall bakterier enn uten potet i fôret. De andre faktorene ga ingen påvirkning.

Tre ulike metoder (Bactocount, plating og droplet digital polymerasekjedereaksjon (ddPCR)) ble brukt til identifisering av total bakterietall i rå melk fra gård for å se på korrelasjonen mellom dem. Det var liten korrelasjon mellom metodene, hvor minst korrelasjon ble sett mellom ddPCR og plating. Størst korrelasjon ble sett mellom Bactocount og plating.

Abstract

By identifying the total microbiota, by the use of culture independent methods on selected samples along the supply chain of low-fat milk and by the use of a check list on the farm, it was possible to identify factors and equipment that influenced the bacterial content in the milk. It is already known that biofilm, milking and dairy equipment can influence the microbiota in milk.

The milk samples selected in the supply chain was taken from the farmtank, the milk truck, silo tank at the dairy, holdertank after pasteurization, carton at production day and carton after 14 days storage at 4, 6 and 8 °C. From this sampling it was possible to observe that the raw milk quality can influence the quality of the milk at the end of shelf life, as well as mixing of milk which differ in its bacterial flora resulted in a dilution effect that gave less amount of *Bacillus* after storage. At the end of shelf life the bacterial content in the cartons was dominated by *Pseudomonas* and *Bacillus* at all three storage temperatures. The largest amount of *Bacillus* was observed in cartons at 8 °C storage. The largest amount of *Bacillus* in milk samples at the end of shelf life, stored at 4 and 6 °C, was seen in the samples were the largest amount of *Bacillus* in the raw milk on the farm also was seen. Also biofilm in the milk truck and in the dairy equipment, either in the pasteur or in the holdertank after pasteurization, affected the microbial content of the milk.

There were different factors on the farm that was investigated for microbail influence on the milk; cleaning system of farm tank (automatic or manual), type of farm tank (Wedholms or Landteknikk), feed supplementation (potato or feed sugar beet in addition to silage and feed concentrates), type of barn (tie stall barn or free-stall), milkingsystem (robot, milking parlor or pipeline milkingsystem), lid on the pipe of the farm tank (on or off), barn door open or closed in the milking room. Of these factors, it was observed an increase in the amount and distribution of bacteria when cleaning a Wedholms tank by an automatic cleaning system compared to using automatic cleaning of a Landteknikk tank. It was also observed an increase in bacterial content by adding potato to the feed. Non of the other factors gave any significant effect on the bacterial content.

Three different methods (Bactocount, plating and digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR)) were used to identify the total bacterial content of the raw milk from the farms to see if there was a correlation between the methods. It was little correlation between the methods. The lowest correlation was observed between plating and ddPCR and the largest correlation between plating and bactocount.

Innhold

1. Introduksjon.....	1
1.1 Melk og dens mikrobielle innhold	1
1.1.1 Mikrobiologisk innhold i rå melk.....	1
1.1.2 Mikrobiologisk innhold i melk etter pasteurisering.....	2
1.1.3 Sporedannere.....	3
1.1.4 Mikrobiota i melk ved utgått holdbarhet.....	4
1.2 Bacillus cereus gruppen.....	4
1.2.1 Utbredelse, matforgiftning og patogenese.....	5
1.3 Kontaminasjonsfaktorer som kan påvirke mikrobiota i melk	6
1.3.1 Biofilm i meieriindustri.....	7
1.4 Kultur-uavhengige metoder for analyse av bakterieinnhold i melk.....	8
1.5 Hensikt med oppgaven.....	9
2. Metodisk teori.....	10
2.1 Utplating	10
2.2 Bactocount.....	11
2.3 Strømningscytometer	12
2.4 DNA ekstraksjon	13
2.4.1 Cellepellet fra melk ved hjelp av sentrifugering	13
2.4.2 Ekstrahering av DNA fra bakterieceller	13
2.5 Propidium monoazide (PMA) behandling av bakterieceller	14
2.6 Polymerasekjedereaksjon (PCR) og droplet digital PCR.....	15
2.7 Sekvensering.....	16
3. Materialer og metoder	19
3.1 Prøveuttak og analyser	19
3.2 Gårdsbesøk	21
3.3 Uttak av prøver på meieri.....	22
3.4 Transport av prøver	22
3.5 Bactocount.....	22
3.6 Utplating	22
3.7 Pellet.....	23
3.8 Pellet med PMA-behandling.....	23

3.9	DNA ekstraksjon (Bead-beating og Mag Midi Kit).....	24
3.10	Droplet Digital PCR	24
3.11	Illumina sekvensering	25
3.12	Behandling av data	26
4.	Resultater	27
4.1	Total mikrobiota fra gård til kartong	27
4.2	Gårdsfaktorer sin påvirkning på mikrobiotaen i melk.....	42
4.3	Bruk av PMA for å skille mellom levende og døde celler etter pasteurisering	49
4.4	Metoder for identifisering av totalt bakterietall i gårdsprøver.....	50
5.	Diskusjon	52
5.1	Praktiske hensyn	52
5.2	Mikrobiota i rå og pasteurisert melk	53
5.3	Mikrobiell påvirkning fra gård, tankbil og meieriutstyr	57
5.3.1	Mikrobiell påvirkning fra gård	57
5.3.2	Mikrobiell påvirkning under transport og meieriutstyr	60
5.4	Metoder for identifisering av totalt bakterietall og differensiering av døde og levende celler (PMA-behandling)	61
5.5	Veien videre	62
6.	Konklusjon.....	64
7.	Referanser	65
	Vedlegg 1.....	71
	Vedlegg 2.....	72
	Vedlegg 3.....	75
	Vedlegg 4.....	76
	Vedlegg 5.....	79

1. Introduksjon

1.1 Melk og dens mikrobielle innhold

Melk er mat med høyt innhold av næringsstoffer som proteiner, fett, karbohydrater, vitaminer, mineraler og essensielle aminosyrer. Melk kommer fra flere forskjellige mammalske dyr som ku, geit, sau og mennesker (Quigley et al., 2013b). I denne oppgaven blir ordet melk brukt om melk fra kyr.

Ettersom melk har høy vannaktivitet, nøytral pH og masse næringsstoffer er det et godt vekstmedium for bakterier (Quigley et al., 2013b). Noen bakterier kan gi forringelse av melken, samt være en fare for mattryggheten (Sørhaug and Stepaniak, 1997, Raats et al., 2011, Dogan and Boor, 2003, Andersson et al., 1995, Lücking et al., 2013).

1.1.1 Mikrobiologisk innhold i rå melk

Det er forskjellige metoder for identifisering av bakterier; kulturavhengige og kultur-uavhengige. Disse metodene blir nøyere omtalt i seksjon 1.4 nedenfor. Hvilke metoder som blir brukt til identifisering av bakterier vil ha innvirkning på resultatet.

I de fleste studier på bakterieinnhold i rå melk blir det brukt kulturavhengige metoder for fremvekst av bakterier; (Desmaures et al., 1997, Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007, Sørhaug and Stepaniak, 1997). Det er tenkt at de fleste bakterier i melken lar seg kultivere (Raats et al., 2011). Ved bruk av kulturavhengige metoder ble det funnet at de dominerende bakteriene i rå melk var melkesyrebakterier (*Lactococcus ssp.* og *Lactobacillus ssp.*), *Pseudomonas ssp.*, *Micrococcus ssp.* og *Staphylococcus ssp.* fra gruppen *Micrococaceae*. Utenom disse bakteriene er det også noen typer gjær. Mindre dominerende bakterier som ble funnet i rå melk er *Leuconostoc*, *Streptococcus* og *Enterococcus ssp.*, *Bacillus*, *Clostridium* og *Listeria ssp.*, og *Enterobacteriaceae* (Lafarge et al., 2004, Desmaures et al., 1997).

Det har vist seg at flere bakterier i melk ikke lar seg kultivere, og dermed vil man ikke få frem alle bakterietypene i melken ved bruk av kultivering (Raats et al., 2011). I senere år har det blitt gjort flere analyser av rå melk ved hjelp av kultur-uavhengige metoder. Quigley et al. brukte i 2013 DNA til identifisering av bakterier i rå og pasteurisert melk. Bakteriene som

dominerte i rå melk var melkesyrebakteriene av typene *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* og *Enterococcus ssp.* (Quigley et al., 2013b). *Pseudomonas*, *Acinobacter* og *Aeromonas ssp.* var også å finne i større mengder i melken. Disse bakteriene vokser opp under kjølige forhold (Quigley et al., 2013b, Raats et al., 2011). *Pseudomonas* og *Acinobacter ssp.* er psykrotolerante bakterier som vokser når det er lave temperaturer, som ved kjøling av melken på gårdstankene og ellers inne på meieriet. Disse bakteriene produserer varmeresistente enzym som vil overleve pasteurisering, selv om man får eliminert *Acinetobacter* og redusert mengden *Pseudomonas*. Enzymene har lipolytisk og proteolytisk aktivitet og vil kunne gi en forringende effekt på melken (Raats et al., 2011, Dogan and Boor, 2003, Quigley et al., 2013a). Ved bruk av HTS (High Throughput Sequencing) ble det påvist bakterieslekter i melk som ikke hadde blitt påvist før; *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* og *Catenibacterium* (Quigley et al., 2013a).

1.1.2 Mikrobiologisk innhold i melk etter pasteurisering

Pasteurisering av melk blir gjort for å eliminere patogene bakterier samtidig som holdbarheten øker. Pasteurisering er en mild varmebehandling (72°C, 15sek) (Flint et al., 1997) hvor man tilfører varme til en råvare ved en bestemt temperatur og en bestemt tid før en rask nedkjøling. Pasteuriseringsprosessen har til hensikt å redusere bakterieantallet, men det er en mild varmebehandling hvor ikke alle bakterier blir eliminert (Fellows, 2011). Det er dermed bakterier som ikke blir drept ved en slik mild varmebehandling. De fleste vegetative cellene blir drept, men flere termoresistente bakterier, noen grampositive staver og sporer kan overleve (Nada et al., 2012). Pasteurisert melk har blitt sett på som melk med lav diversitet i mikrobiota. I senere år er det sett med molekylære metoder at det er større diversitet enn først antatt (Quigley et al., 2013a).

Som nevnt ovenfor vil psykrotrofe bakterier som *Acinetobacter* ikke overleve pasteurisering, men de kan produsere termotolerante enzymer med proteolytisk og lipolytisk aktivitet som ikke vil bli brutt ned (Raats et al., 2011, Dogan and Boor, 2003). Enzymene produsert av *Pseudomonas* (før og etter pasteurisering) og *Acinetobacter* (før pasteurisering) vil derfor ha en innvirkning på melke kvaliteten og holdbarheten (Quigley et al., 2013a).

Spordannende bakterier i sin sporform overlever pasteurisering. For meieriindustrien er spordannere som *Bacillus cereus* et stort problem. Dersom melken ikke blir kontaminert etter

pasteurisering er det innholdet av *B. cereus* som vil avgjør holdbarheten til produktet. *B. cereus* er ansvarlig for søt koaguleringen av melk (Andersson et al., 1995, Lücking et al., 2013), fettakkumulering (Billing and Cuthbert, 1958, Stone and Rowlands, 2009), bismak (Shipe et al., 1978) og matforgiftning (se seksjon 1.2). Anaerobe sporformere, som *Clostridium ssp.*, er et problem ved osteproduksjon. Store mengder ost kan gå tapt ved vekst av disse sporedannerne i osten. *Clostridiale* sporer i melken kan forårsake smørsyrefermentering og oppblåst ost dersom den er tilstede i ystemelken (Klijn et al., 1995).

1.1.3 Sporedannere

Enkelte typer bakterier kan danne endosporer gjennom en sporuleringsprosess. Endosporene som blir dannet er resistente mot både varme, kjemikalier og stråling. Sporedannerne starter endospordannelsen (sporulering) ved ugunstige vekstforhold, som økt temperatur, tørke og mangel på næring. Som spore er bakteriene i en sovende tilstand frem til aktivering. Det er tre steg i aktiveringen av en endospore; aktivering, germinering og utvekst. Aktivering av sporer skjer ved forekomst av høy temperatur over flere minutt. For at germinering skal forekomme må det være næringsstoffer, som aminosyrer tilstede. Ved utvekstfasen begynner sporen å svulle opp på grunn av opptak av vann. Syntese av RNA, DNA og produksjon av proteiner blir også igangsatt ved denne fasen. I slutten av utvekstfasen vil en vegetativ celle bryte ut fra endosporen å begynne og vokse (Madigan, 2012c).

Bacillus er en typisk endospordanner (Madigan, 2012c). *Bacillus* arten *B. cereus* er et stort problem for meieriindustrien nettopp på grunn av sine spordannende egenskaper. *B. cereus* er i utgangspunktet ikke en konkurransedyktig bakterie, men pasteuriseringsprosessen favoriserer dens fremvekst ved reduksjon av andre bakterier. Varmebehandlingen induserer også aktivering av sporene (Andersson et al., 1995).

1.1.4 Mikrobiota i melk ved utgått holdbarhet

Både mengden og hvilke typer bakterier som dominerer floraen i melken ved utgått holdbarhet vil påvirke kvaliteten til melken. Rå melk kvaliteten og lagringstemperaturen spiller en viktig rolle for mikrobiotaen ved utgått holdbarhet (Schmidt et al., 2012, Huck et al., 2007). De kvalitetsforringende bakteriene ved forlenget holdbarhetsmelk (pasteurisert ved 77-79 °C, 18-30 sek) er hovedsakelig gramnegative *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Psychrobacter* og *Shpingomonas*, og de grampositive *Microbacterium* og spordannerne *Bacillus cereus* og *Paenibacillus* (Schmidt et al., 2012, Fromm and Boor, 2004, Huck et al., 2007).

1.2 Bacillus cereus gruppen

Bacillus cereus er store grampositive, aerobe, sporedannende, stavformede bakterier med en størrelse på 1-1,2 µm x 3-3,5 µm (Arnesen et al., 2008, Granum and Lund, 1997). Opprinnelig var *Bacillus cereus* sett på som en mesofil bakterie som vokste mellom 10 og 50 °C med optimal vekst ved 35 til 40 °C. De siste tiårene har det derimot blitt observert flere psykotolerante *Bacillus* som vokser under 7 °C og opp mot 43 °C. Denne psykotrofen kalles *Bacillus weihenstephanensis* og har blitt observert til å vokse ved temperaturer ned til 4 °C (Arnesen et al., 2008, Lechner et al., 1998).

Bacillus cereus gruppen, også kalt *Bacillus cereus sensu lato*, består av *Bacillus cereus sensus stricto*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* og *Bacillus weihenstephanensis* (Lechner et al., 1998, Bartoszewicz et al., 2008, Arnesen et al., 2008). *B. cereus (sensus stricto)* er en opportunistisk human patogen som under de rette forholdene kan forårsake sykdom hos mennesker (Bartoszewicz et al., 2008, Helgason et al., 2004). *B. thuringiensis* er en insektspatogen som blir brukt som kilde til insektsdrepende toksin. Den er ikke human patogen, men human sykdom kan forekomme (Helgason et al., 2004). *B. anthracis* er bakterien som forårsaker den dødelige sykdommen Anthrax (Helgason et al., 2004, Bartoszewicz et al., 2008). *B. weihenstephanensis* og *B. mycoides* er psykotrofe bakterier i denne gruppen (Prüß et al., 1999). *B. weihenstephanensis* vokser ved lavere temperaturer enn de andre mesofile og har samme enterotoxin gen som *B. cereus* (Helgason et al., 2004, Arnesen et al., 2008).

1.2.1 Utbredelse, matforgiftning og patogenese

Som en vanlig jordsaprophytt finner man *B. cereus* i jord og på planter (Granum, 2007, Vilain et al., 2006). Den sprer seg dermed lett videre til matvarer og blir funnet i grønnsaker, egg, kjøtt og meieriprodukter. Den kan også smitte over fra beitemark til jur på kyr og kommer over i melken ved melking. *B. cereus* blir også isolert fra avføring fra kyrne (Granum, 2007, Magnusson et al., 2007). Denne bakterien har forårsaket flere tilfeller av matforgiftning. Eksempler på matvarer som har forårsaket sykdom på grunn av *B. cereus* er eksempelvis vaniljesaus, gryterett, potetstappe, kjøttkaker i brun saus, eggerøre, fiken, lapskaus, kjøttrett med ris, saus, fiskesuppe, bløtkake, softis, melk og grillet kylling. Alle produktene ovenfor har blitt pasteurisert eller kokt og blir dermed mer utsatt for fremvekst av *Bacillus*. Som nevnt ovenfor, så er ikke *B. cereus* en konkurransedyktig bakterie. Ettersom den er sporedanner vil den kunne overleve pasteurisering og koking, og vokse i matvarene etter varmebehandling da det er mindre konkurranse. En fellesnevner for flere av matvarene nevnt ovenfor er at man har antatt at det var melk som var smittekilden. I flere av disse produktene; vaniljesaus, potetstappe, eggerøre, bløtkake, softis og melk var melk ingrediens (Granum, 2007).

B. cereus kan produsere to hovedtyper toksiner som forårsaker to forskjellige typer matforgiftning, en emetisk sykdom og en diarèsykdom. Ved den emetiske typen blir toksinet produsert i maten før konsum, mens ved diarètypen er matforgiftningen forårsaket av enterotoksinproduksjon i tarmen som følge av vegetativ vekst av *B. cereus* (Arnesen et al., 2008, Granum, 2007, Granum and Lund, 1997). Den emetiske type av *B. cereus* finner man som oftest i stivelsesrike matvarer som fritert eller kokt ris, pasta eller nudler (Arnesen et al., 2008). Diarètypen finner man i proteinrik mat som kjøtt, melk, melkeprodukter og vegetabilier. Det er dermed enterotoksinproduserende *B. cereus*-stammer som er størst problem for meieriindustrien, og det er denne typen som vil bli omtalt videre (Granum, 2007).

Som nevnt ovenfor, er diarètypen forårsaket av enterotoksinproduksjon i tarmen som følge av vegetativ vekst av *B. cereus*. Denne typen matforgiftning starter med magesmerter etterfulgt av vandig diarê og kvalme. Symptomene kommer normalt sett etter 8 til 16 timer og har en varighet på opp mot 36 timer (Granum, 2007, Granum and Lund, 1997, Arnesen et al., 2008).

Det er tre enterotoksin som blir produsert av *B. cereus* og som gir diarè sykdom. Alle tre er protein, hvor to av dem, Hbl og Nhe, har trekomponent struktur, mens Cyt K har en enkomponent struktur (Arnesen et al., 2008, Granum, 2007). Hbl og Nhe er begge cytotoxiske. De ødelegger epitelcellene i tarmhulen som resulterer i diarè (Granum, 2007). Som nevnt tidligere blir disse toksinene produsert og frigitt i tarmhulen ved vegetativ vekst av *B. cereus*. Rundt 50 % av stammene som forårsaker diarè sykdom produserer både Hbl og Nhe, mens rundt 99 % produserer Nhe. Nhe blir dermed den viktigste virulensfaktoren ved diarè sykdom (Granum, 2007).

Den infektive dosen av *B. cereus* er observert til å være 10^5 - 10^7 celler totalt konsumert, men tallet er mindre ved konsum av sporer (10^3 - 10^5) i forhold til vegetative celler ettersom ikke alle vegetative celler overlever magesyrebarrieren (Arnesen et al., 2008, Granum, 2007).

1.3 Kontaminasjonsfaktorer som kan påvirke mikrobiota i melk

Den mikrobiologiske kvaliteten på melken avhenger av flere faktorer. Først og fremst vil rå melk kvaliteten ha stor betydning for den endelige mikrobiota på det pasteuriserte produktet. Det mikrobiologiske innholdet i rå melk blir påvirket av flere faktorer, som innholdet av mikroorganismer i jurkanalen og overflaten til juret (Braem et al., 2012, Vacheyrou et al., 2011), miljøet og luften rundt (Vacheyrou et al., 2011), i fôret (te Giffel et al., 2002) og i vannforsyningen. Ellers er hygiene rundt på gården en bidragsyter til den mikrobielle kvaliteten på melken, som renhold av fjøs og utstyr som er i kontakt med melken (Quigley et al., 2013a). Det ble også observert en forskjell mellom løsdrift og bås fjøs, hvor kontaminasjonen i melken av bakteriefloraen fra omgivelsene var størst ved bås fjøs (Vacheyrou et al., 2011).

På meieriet er det også faktorer som kan påvirke mikrobiota i melken. Adhesjon av bakterier (som *B. cereus*) til overflaten av meieriutstyret (Andersson et al., 1995), samt dannelse av biofilm kan være en bidragsyter til melkens mikrobiota (Flint et al., 1997).

1.3.1 Biofilm i meieriindustri

Biofilm er en aggregering av mikrobielle celler og deres produserte ekstracellulære polymeriske substans (EPS) som er festet til og vokser på en overflate (Flint et al., 1997). Det er fem trinn i biofilmdannelse: 1. Første feste av en platonisk celle til en overflate, 2. Produksjon av EPS, 3. Kolonisering og utsendelse av kjemiske signal, 4. Modning av biofilmmoppbygging, 5. Spredning av celler (Winkelströter et al., 2014).

Det er to grupperinger av biofilm i meieriindustrien; 1. Prosessbiofilm, biofilm som er spesifikk for hver enkelt prosessindustri, og 2. Biofilm som er i all matrelatert prosessindustri. Biofilm som er spesifikk for meieriindustrien (prosessbiofilm) kan eksempelvis bli dannet ved at flytende medium er i kontakt med en overflate, slik som en platevarmeveksler eller lignende. Biofilm i meieriindustrien er forskjellig fra annen næringsmiddelindustri. Det er ofte kun en type bakterie som dominerer i biofilmen, og utviklingen skjer fort. Bakterier som dominerer biofilm i meieriutstyret er *Bacillus* og *Staphylococcus thermophilus* (Flint et al., 1997). Det har også blitt observert biofilm i meieriutstyret før pasteuren, hvor bakteriene som ble funnet var i hovedsak grampositive *Bacillus ssp.* etterfulgt av *Lactococcus ssp.*, *Streptococcus ssp.* og *Staphylococcus ssp.*, og noen gramnegative bakterier som *Shigella ssp.*, *Escherichia coli* og *Enterobacter aerogenes*. Biofilm observert etter pasteuren besto hovedsakelig av psykrotrofe bakterier (Sharma and Anand, 2002). Ved dannelse av biofilm i platevarmeveksleren kan man få kontaminert den pasteuriserte melken med mer enn 10^6 celler per ml melk. Biofilmdannelse på meieri er dermed et kvalitets- og mattrygghetsproblem (Flint et al., 1997).

Det er ikke bare biofilm på meieriet som kan være av problem for melke kvaliteten, også biofilm i gårdutstyr som er i kontakt med rå melk kan være av betydning (Latorre et al., 2010).

1.4 Kultur-uavhengige metoder for analyse av bakterieinnhold i melk

Daglig blir det sett på bakterieinnholdet i rå og pasteurisert melk på meieriene for å kontrollere melke kvaliteten. Metodene som blir brukt til dette er kulturavhengige metoder som bruker medium for å få fremvekst av bakterier (Quigley et al., 2013a). Man har gått ut fra at en stor andel av bakteriene i melk lar seg kultivere, men det er fremdeles en andel som ikke vil komme til syne ved bruk av slike metoder. Det tar også lang tid før man får resultat. Dersom man heller bruker kultur-uavhengige metoder vil man kunne få frem hele mikrobiota i rå og pasteurisert melk (Raats et al., 2011). Eksempler på studier som har brukt kultur-uavhengige metoder for identifisering av bakterieflora i rå melk er; (Quigley et al., 2011, Quigley et al., 2012, Quigley et al., 2013a, Ogier et al., 2004, Lafarge et al., 2004, Delbès et al., 2007, Giannino et al., 2009, Kuang et al., 2009, Rasolofo et al., 2010). I disse studiene tar de for seg ulike kultur-uavhengige metoder som High Throughput Sequencing (HTS), Real-time Quantitative PCR (RT-qPCR), Strømningscytometer, DNA ekstraksjon med PCR amplifisering av 16S rRNA, PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) og Temperature Gradient gel electrophoresis (TTGE).

I denne oppgaven tar vi for oss følgende kultur-uavhengige metoder; en hurtigmetode for måling av bakterieceller (Bactocount) og molekylære metoder, hvor DNA ekstraheres fra bakteriecellene i melken, kvantifiseres ved hjelp av droplet digital polymerasekjedereaksjon (ddPCR) og identifiseres ved illumina sekvensering.

1.5 Hensikt med oppgaven

I denne oppgaven blir det sett på den totale mikrobiotaen i melk ved bruk av kultur-uavhengige metoder på flere punkter spredt i hele verdikjeden til lettmelk (gård, lassprøve fra tankbil, silotank, ferdigvaretank, kartong og kartong ved utgått holdbarhet) for å prøve og identifisere ulike faktorer som kan påvirke kvaliteten med tanke på både forringelse og mattrygghet. Det blir også brukt er kontrollskjema på gård for å avdekke en mulig påvirkning av ulike gårdsfaktorer på det mikrobielle innholdet i rå melken.

Det blir også brukt tre ulike metoder for identifisering av total bakterieantall i rå melk fra gårdsprøvene (ddPCR, Bactocount og plating). Disse metodene blir sammenlignet for å se om man kan finne en korrelasjon mellom metodene.

2. Metodisk teori

Det finnes ulike metoder for identifisering av bakterier. Som nevnt ovenfor blir det i denne oppgaven hovedsakelig brukt kulturavhengige metoder. Bactocount og ddPCR blir brukt for identifisering av total bakterie mengde i rå melk prøvene og sammenlignet med tradisjonell utplating på PCAagar (kulturavhengig metode) for å se om det er en korrelasjon mellom metodene. For identifisering av total mikrobiota i alle melkeprøvene, både rå melk og pasteurisert ble det brukt ddPCR. For å kunne skille mellom levende og døde celler i pasteuriserte prøver, ble det brukt Propidium monoazide (PMA)-behandling. Alle prøvene ble sekvensert for å kunne finne total mikrobiota i melken ved forskjellige plasser i verdikjeden. I denne seksjonen blir det tatt for seg teorien til de ulike kultur-uavhengige metodene som blir brukt i denne oppgaven, samt den kulturavhengige metoden (utplating) som blir brukt ved sammenligning av metoder.

2.1 Utplating

Ved utplating blir det brukt et kulturmedium rikt på næringsstoffer som bakteriene trenger for å vokse. Et slikt medium blir brukt ved fremvekst av levende bakterieceller i laboratoriet (Madigan, 2012g). En levende celle blir betegnet som en enkelt bakteriecelle som har muligheten for å dele seg og formere seg slik at det blir dannet en koloni. For å kunne detektere disse blir enten platespredning eller innstøpning på agarplate brukt (Madigan, 2012d). Agar er et naturlig polysakkarid som blir brukt for å få næringsmedium for bakterier til å være i fast form (SigmaAldrich, u.å.-a). Ved spredning på agarplate blir prøven pipetert over og strøket ut over platen ved bruk av en steril stav før inkubering. Dersom innstøpning blir brukt, blir prøven overført aseptisk til en plate. Deretter blir et sterilt medium helt over og blandet med prøven for deretter å stivne før inkubering. Etter inkubering med en gitt tid og temperatur kan koloniene som har oppformert seg bli telt (Madigan, 2012d).

Dersom prøven som skal analyseres for bakterietall, inneholder mye bakterier er det mulig å lage fortynningsrekke med flere tidoblet fortytning, eksempel 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Dette tilsvarer henholdsvis 10, 100 og 1000 ganger fortytning av den opprinnelige prøven. Dette kan eksempelvis blir gjort ved bruk av 9 ml rør med sterilt vekstmedium og tilsette 1 ml prøve og blande godt for å få 10^{-1} -fortytning, før 1ml av 10^{-1} -fortytning blir tilsatt et nytt 9 ml rør for

å få 10^{-2} -fortynning og så videre. De ulike fortynningene kan bli utplattet, og antall bakterier kan bli utregnet etter oppgangning med fortynningsfaktor (Madigan, 2012d).

Det finnes forskjellige vekstmedium. Noen favoriserer fremvekst av enkelte typer bakterier, og andre tar for seg alle typer bakterier (Madigan, 2012g). For å kunne bruke utplattingsmetoden til å finne totalt antall bakterier i en prøve, må man bruk et vekstmedium som tillate fremvekst av alle bakterier. «Plate count agar» (PCA) er en ikke-selektiv agar som blir brukt for å bestemme totalt antall bakterier i vann, melk og andre melkeprodukt (SigmaAldrich, u.å.-b).

2.2 Bactocount

Ved mottak av melk bruker TINE en Bactocount for å sikre at bakterietallet ikke er for høyt i melken som skal bli tappet inn på anlegget. Dette er en hurtig genotypisk metode for mål av bakterieceller i rå melk. Bactocounten består av tre deler; en datamaskin, en inkubator og en teller. Datamaskinen tar kontinuerlig sjekk av instrumentet for å passe på at det til enhver tid fungerer. Inkubatoren holder prøvene varme under inkuberingsprosessen, samtidig som det skjer mekaniske og kjemiske reaksjoner for å fjerne forstyrrende komponenter og få farget dobbeltrådet DNA. Telleren består av et strømningscytometer som inneholder en kraftig laser, en strømningscelle, et mikroskop, et filter og en høysensitiv fotomultiplikator (se seksjon 2.2).

Bactocount gir mål på antall bakterieceller i rå melk i kIBC (kilo individual bacteria count)(Bentley, 2012, Cassoli et al., 2007). Dette blir gjort ved å tilsette en inkubasjonsløsning til rå melk, som består av en klarifiseringsbuffer, proteolytiske enzymer og fluoriserende markør. Dette blir tilsatt for å få kjemisk nedbrytning av uønskede komponenter samt bryte ned cellevegg på bakterie og farge DNA. Inkubasjonsløsningen lyserer de somatiske cellene, løser opp fettkuler og protein, samt trenger gjennom bakteriecellene for å farge dobbeltrådet DNA. Blandingen blir sonikert (tilført energi) under inkuberingen for mekanisk nedbrytning. Sonikeringen hjelper til med den kjemiske nedbrytningen av de forstyrrende partiklene og bryter opp de resterende bakterieklyngene for å få enkeltstående bakterieceller. Ved å sonikere får man lettere rett mål av bakterier i løsningen og mindre bakgrunnsfluorosens. Etter inkuberingsperioden blir prøven flyttet til et strømningscytometer hvor løsningen blir utsatt for en kraftig laser som får bakteriecellene, tilsatt en fluoriserende markør, til å

fluorisere. Fluorescensen blir detektert av en fotomultiplikator og mengden fluorescens blir omgjort til kIBC ved hjelp av en omformingsligning (Bentley, 2012).

2.3 Strømningscytometer

Strømningscytometer blir brukt til forskjellige analyser for detektering av celler og molekyl (Rieseberg et al., 2001, Shapiro, 1983). I denne oppgaven blir det brukt strømningscytometer til detektering av celler og DNA ved tre ulike metoder; bactocount, ddPCR og Illumina sekvensering.

Et strømningscytometer analyserer prøver ved å sende en og en celle, eller partikkel, gjennom en laserstråle/ lyskilde i en direkte væskestrøm. Hydrodynamikk, ved at en væske strømmer i laminær strømning, blir brukt for å få cellene/partiklene til å gå en og en gjennom lysstrålen. Interaksjonen mellom laseren og celle/partikkelen blir målt ved absorpsjon, spredning og/eller fluorescens (Rieseberg et al., 2001). Man får spredning i to retninger, en fremover og en til siden. Målingene blir tatt opp av en detektor og sendt til en datamaskin for analysering. Det er fem hovedbestanddeler i et strømningscytometer; Lyskilde av laser eller kvikksølvlampe, en strømningscelle for strømning av celler og partikler, en optisk filterenhet for å ta opp spesifikke bølgelengder, fotodiode eller en fotomultiplikator tube for sensitiv detektering og en datamaskin (Rieseberg et al., 2001).

Det er vanligst å benytte seg av tilførsel av fluorescensmarkører ved bruk av strømningscytometer til bioteknologiske analyser (Rieseberg et al., 2001). Ved bactocount (se ovenfor), ddPCR og Illuminasekvensering (se nedenfor) blir det også brukt fluoriserende markører.

2.4 DNA ekstraksjon

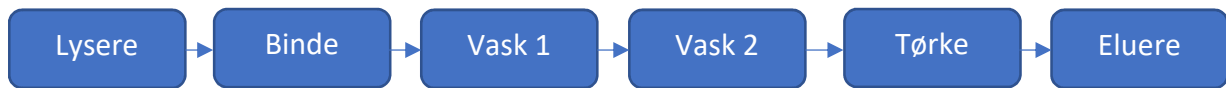
DNA ekstraksjon blir gjort for å få ut DNA fra bakteriecellene i en prøve og deretter kunne videre analysere DNA for å finne bakterietype og mengde. Ved bruk av DNA ekstraksjon får man ut DNA fra bakterieceller og kan utføre, som i denne oppgaven, PCR og sekvensering for å finne total bakterieflora og bakteriemengde.

2.4.1 Cellepellet fra melk ved hjelp av sentrifugering

Før man kan starte DNA ekstraksjonen fra en melkeprøve, må bakterieceller fra melken bli hentet ut. Dette blir gjort ved sentrifugering og vasking med citratvann. Ved sentrifugering vil bakteriecellene sedimentere og danne en pellet, mens resten av melken vil forbli som supernatant. Under sentrifugeringen oppstår det skjærkrefter mellom bakteriecellene som kan føre til celleødeleggelse og død. Det er derfor viktig at sentrifugeringen ikke er for hard slik at cellene lyserer (Peterson et al., 2012). Supernatanten blir fjernet og pelletet av bakterieceller blir løst i citrat for å få vasket ut urenheter. Til slutt vil man sitte igjen med en pellet bestående av bakterieceller som kan brukes til DNA ekstraksjon.

2.4.2 Ekstrahering av DNA fra bakterieceller

For å kunne ekstrahere DNA fra bakterieceller må membranen først bli brutt opp. Dette blir gjort ved tilføring av lyserende buffer som sammen med enzymet proteinase, vil kunne bryte opp cellemembranen og friggi DNA. Det finnes flere metoder for å ekstrahere DNA. I denne oppgaven ble DNA ekstrahert ved bruk av magnetiske partikler. Superparamagnetiske partikler blir brukt for å binde opp DNA og danne et DNA partikkelkompleks som så kan bli vasket for å få bort urenheter. Deretter blir DNA partikkelkomplekset tørket og eluert, slik at DNA løsner fra de magnetiske partiklene og kan bli hentet ut. **Figur 2.1** viser trinnene for DNA ekstraheringen (LGC, 2014).



Figur 2.1: Trinn for DNAekstrahering

Lysering blir først gjort for å få DNA ut fra bakteriecellene slik at DNA kan bli bundet til de superparamagnetiske partiklene. Deretter er det to vasketrinn hvor urenheter blir fjernet før tørking og eluering av DNA fra DNA partikkelkomplekset (LGC, 2014).

2.5 Propidium monoazide (PMA) behandling av bakterieceller

Ved pasteurisering av melk får man en reduksjon av bakterieceller, som nevnt tidligere. Ved kultur-uavhengige metoder vil man ikke kunne skille mellom levende og døde celler (Porcellato et al., 2015). For å kunne skille mellom levende og døde celler etter pasteurisering av melken, kan man bruke propidium monoazide (PMA) (Porcellato et al., 2015, Nocker et al., 2007, Bae and Wuertz, 2009). Ved å utføre PMA-behandling på cellepelleten fra melken vil DNA fra lyserte celler bli bundet opp. PMA er et fotoreaktivt fargestoff som binder seg til dsDNA (dobbeltrådet DNA) med høy affinitet. Ved tilførsel av kraftig lys vil man få en kovalent binding mellom dsDNA og PMA som fører til inhibering av PCR amplifisering av det PMA-bundede DNAet. PMA kan ikke trenge gjennom cellemembranen på bakteriecellene. Det er dermed bare lyserte, døde celler eller celler med brudd i membranen som vil få bundet PMA til seg og få inhibert PCR amplifiseringen. Ved PCR vil man da kun få amplifisert DNA fra de cellene som var intakte etter pasteurisering av melken (Nocker et al., 2007, Porcellato et al., 2015).

I denne oppgaven blir det antatt at rå melk inneholder tilnærmet kun levende bakterieceller. Prøver av rå melk ble dermed ikke behandlet med PMA.

2.6 Polymerasekjedereaksjon (PCR) og droplet digital PCR

Etter at man har fått ekstrahert ut DNA fra bakteriecellene er det mulig å amplifisere spesifikke regioner av DNAet ved bruk av polymerasekjedereaksjon (PCR). PCR er en molekylær teknikk som blir brukt for å amplifisere DNA. Dette blir gjort ved tre steg; denaturering, primerbinding (annealing) og elongering. Ved denatureringssteget blir temperaturen økt til rundt 95-98 °C for å denaturere dobbeltrådet DNA (dsDNA). Deretter blir temperaturen senket for å tillate primere og binde til templatet (singeltrådet DNA). Primere er små fragment av nuklotider (oligonuklotider) som er komplementære til en spesifikk plass på DNA templatet. Ved binding av primere blir det mulig for enzymet polymerase å feste seg og tilføre flere komplementære nuklotider til templatet i 5' → 3'retning. Disse tre trinnene blir så repetert flere ganger med eksponentiell amplifisering av DNA. Denaturering av DNA skjer ved temperatur rundt 72 °C. Det blir derfor brukt en polymerase som er termostabil og stabil ved 95 °C (Madigan, 2012e).

For kvantifisering av mengden DNA i en prøve ble det først tatt i bruk gelelektroforese for å finne DNA mengden etter PCR amplifiseringen, før real-time PCR ble utviklet og ga mengden DNA ved måling av fluorescens. Denne metoden krever kalibrering og gir dermed resultatet en viss usikkerhet. Droplet digital PCR er en nyere metode for kvantifisering av DNA. Denne metoden skal gi absolutt mål på DNA som finnes i en prøve ved hjelp av Poisson statistikk (Hindson et al., 2011).

Droplet digital PCR er en digital PCR-metode som detekterer og kvantifiserer mengden spesifikke DNA-sekvenser i en prøve. Prøven blandes med olje og det dannes dråper. En blanding på 20 µl, bestående av DNA og komponenter til PCR reaksjon, blir omdannet til 20 000 dråper. Disse 20 000 dråpene gir amplifisering av et templat. Prøvene er tilsatt en probe som vil, ved binding til et DNA templat, bli delt i to av polymerasen ved replikering og dermed avgi fluorescens. Etter amplifiseringen er det et strømningscytometer som leser av mengden DNA i dråpene og gir et absolutt mål for mengden DNA i prøven ved måling av fluorescens fra probene som er bundet til DNA templatet (Hindson et al., 2011, Miotke et al., 2014). Det er denne metoden, som på grunn av sin evne til å finne absolutt mengde DNA, blir brukt i denne oppgaven.

2.7 Sekvensering

Sekvensering er en molekylær metode for bestemmelse av bakterietype basert på DNA. I denne oppgaven blir det brukt en Illumina sekvensering, en sekvenserings metode som tar for seg sekvensering av 16S ribosomalt RNA (rRNA) gen. Dette er en gensekvens på genomet til bakteriene som koder for rRNA som brukes sammen med protein for å danne ribosomale subenheter (Lane et al., 1985, Madigan, 2012f).

Ribosom er en cytoplasmisk partikkel som er oppholdsstedet for proteinsyntese i cellene (Madigan, 2012f, Madigan, 2012b). Ribosomet består av to subenheter som hos prokaryote bakterie består av 30S og 50S ribosomale subenheter. Hver av disse subenhetene består av ribosomale proteiner og ribosomalt RNA. Den minste subenheten, 30S, inneholder 16s rRNA og 20 proteiner. Den store subenheten, 50S, har både 5S og 23S rRNA og 31 ribosomale protein (Madigan, 2012f). Etersom alle celler har ribosomer er rRNA et optimalt molekyl å bruke til å bestemme forskjell mellom celler (Madigan, 2012a). Genet for 16s rRNA blir brukt til identifisering av bakterier ettersom denne regionen er svært konservert, med variable regioner som er spesifikke for bakterietypen (Lane et al., 1985). I 16S rRNA genet er de høyt konserverte områdene universelle for ulike bakterier. Det er derfor mulig å lage primere ut i fra disse områdene og få amplifisert opp området mellom (variable områder) for sammenligning og bestemmelse av bakterietype (Lane et al., 1985). Det er ni variable områder i 16S rRNA genet (V1-V9). Det er ikke mulig å differensiere mellom alle bakterier ved bruk av bare en variabel region. Forskjellige regioner gir bestemmelse og differensiering av forskjellige bakterier (Chakravorty et al., 2007). Eksempelvis blir V1 brukt til å differensiere mellom de nært beslektede gruppene *Lactococcus casei*, *Lactococcus paracasei*, *Lactococcus rhamnosus* (Ward and Timmins, 1999). V2 og V3 blir brukt for å differensiere mellom alle bakterier på genus nivå for utenom enterobacteriaceae. V6 kan skille mellom de alle fleste bakteriene på artsnivå for utenom enterobacteriaceae. V4, V5, V7 og V8 er mindre egnet til bruk for å differensiere bakterier på genus og artsnivå (Chakravorty et al., 2007). Ved å kombinere ulike variable regioner vil man kunne få bedre differensiering og identifisering. De mest effektive hypervariable regionene å bruke er V2, V3, V4, V6 eller en kombinasjon av V3 og V4 (Mizrahi-Man et al., 2013).

For å identifisere bakterier på genus nivå, har vi i denne oppgaven brukt universelle primere for å amplifisere opp V3 og V4 regioner på 16S rRNA ved kjøring av PCR og deretter brukt Illumina sekvensering for å identifisering (se seksjon 3.10 og 3.11). Ved amplifisering av disse regionene kan man få differensiert bakterier ned på genusnivå. Det er for eksempel ikke mulig å differensiere mellom enkelte arter av *Bacillus* (Edwards et al., 2012).

Illumina sekvensering består av tre hovedsteg: 1. Tillaging av bibliotek, 2. Cluster amplifisering og 3. Databehandling etter sekvensering (Aird et al., 2011). Tillaging av biblioteket blir gjort ved følgende fem trinn før selve sekvenseringen: 1. 16s rRNA amplifisering med PCR, 2. AMPure XPbeads vasking, 3. PCR med spesifikke primere for sekvensering, 4. Vask og normalisering, 5. Kvantifisering av DNA (Porcellato and Skeie, 2016).

Første PCR blir gjort for å amplifisere den V3 og V4 variable regionen på 16S rRNA. Dette blir gjort ved bruk av to primere. Den ene primeren er en Illumina sekvenseringsprimer (indeksprimer), som skal kunne bli brukt videre i PCR 2, og en genspesifikk primer som binder til 16S rRNA sekvensen. Ved PCR 2 blir det tilsatt to primere til, hvor den ene er for å ta vare på adapteren til Illuminasekvenseringen, og den andre er en sekvensprimer som er spesifikk for hver prøve for å kunne skille mellom prøvene etter sekvenseringen (Kozich et al., 2013). Mellom PCR1 og PCR2 ble PCR produktet vasket med AMPure magnetiske partikler for å fjerne primerdimerer og andre urenheter (Quail et al., 2008). Vask og normalisering blir gjort etter PCR 2 for å fjerne ytterligere urenheter og få lik mengde DNA i alle prøvene. Kvantifisering med qPCR er siste steget før DNA biblioteket er ferdig til sekvensering. Kvantifiseringen blir gjort for å vite at man har rett mengde DNA i prøvene i forhold til mengden reaktanter som blir tilsatt under sekvenseringen.

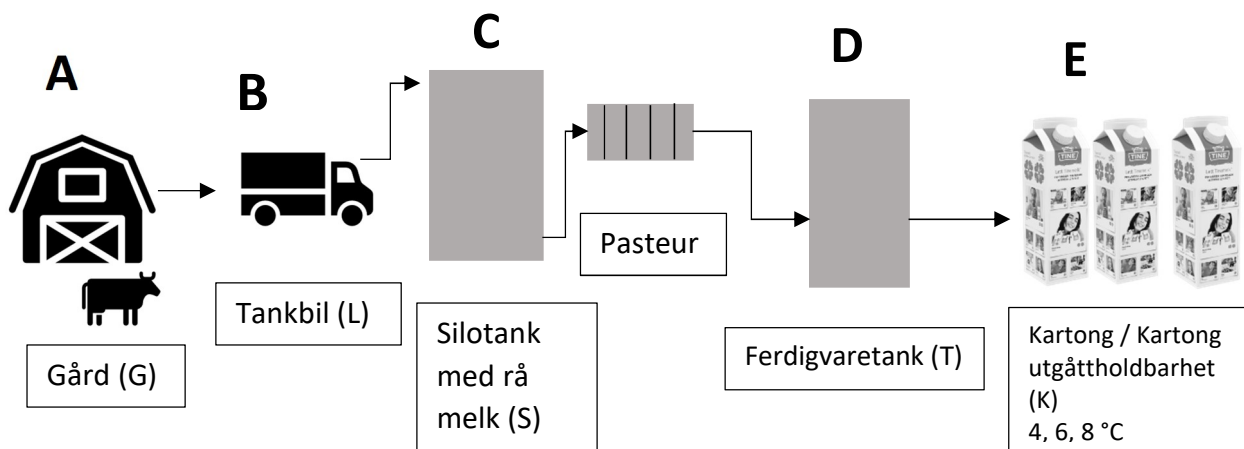
Når biblioteket er ferdig tillaget, er det neste steget klusteramplifisering. Illuminasekvensering foregår på en slik måte at primerendene på PCR produktet er komplementære til små segment på en plate. De vil binde seg til disse primerene og danne klustere ved bro-amplifisering under sekvenseringen. Ved amplifiseringen blir det tilført en og en base av A, T, C og G til systemet. Ved binding av basen til en kluster, vil det bli frigitt fluorescens som blir målt av et strømningscytometer. Lyset fra den bunnede basen blir målt samtidig som at posisjonen til basen blir registrert etter hvor lysglimtet kommer fra. Man får da tilslutt ut sekvensen til hver kluster (Illumina, 2010).

Sekvensen fra samme prøve blir samlet til en fil ut i fra koden på den spesifikke primeren på templatet. Sekvensene blir så sammenlignet med en database hvor man så får identifisert operational taxonomic units (OTU) og bakterietype ut i fra OTU (Ercolini, 2013). OTU er en klynge av like 16S/18S rRNA-sekvenser. Disse sekvensene blir sammenlignet for å finne sekvenser som ligner på hverandre (med opptil 97 % likhet) og for å deretter kunne identifiser type bakterie (Schmidt et al., 2014). Antall OTU blir kalkulert og man kan gi en antydning på hvor mange av en OTU/bakterietype som er tilstede i prøven (Ercolini, 2013).

3. Materialer og metoder

3.1 Prøveuttak og analyser

Det ble tatt ut ulike prøver av melk fra gård til ferdigvare. Flytskjema for prøveuttak er vist i **Figur 3.1** nedenfor. En av Tine sine gårdsruter ble fulgt tre ganger (uke 4, 7 og 11) for henting av «tredagersmelk» (Tredagersmelk vil si melk som kan være opp til tre dager gammel, ettersom sist henting av melk på denne ruten ble gjort tre dager tidligere. Ved besøk på gård ble det notert ulike parameterer i melkerommet ifølge beskrivelse under «gårdsbesøk». Det ble tatt ut prøver av melken fra hver av gårdene på denne ruten i uke 4, 7 og 11. Det ble også tatt ut prøver fra silotanken melken ble pumpet inn på, ferdigvaretanken etter pasteurisering og 12 kartonger med ferdig produkt (lettmelk). Tre av kartongene ble analysert som paralleller av ferskvare og de resterende ble plassert på 4, 6 og 8 °C i puljer på tre og oppbevart i 14 dager til utgått holdbarhet.



Figur 3.1: Prøveuttak ble gjort ved punkt A, B, C, D og E. A: Melk fra 20 forskjellige gårder (G) som ble tatt ut, B: Lassprøve (L) fra tankbil etter hver tømming, C: Silotankprøve/ balansekasse (S) med melk fra gårdene fra A, D: Prøve fra ferdigvaretank (T) fra hver silo og E: Kartongprøver (K) fra hver tappetank med ekstra kartonger til utgått holdbarhet på 4, 6 og 8 °C (Tine, u.å.).

Melk fra forskjellige gårder ble levert på meieriet i tre omganger (lass) og gikk dermed inn på forskjellige silotanker, ferdigvaretank og kartong. **Tabell 3.1** nedenfor viser hvilke gårdsprøver som hører til de forskjellige lass-, silo-, tappetank- og kartongprøvene. Ved uttak 1 ble gårdsprøve 1-10 (G1.U1- G10.U1) overført til en silo (S1.U1) og tappet på ferdigvaretank T1.U1

og deretter kartong. De resterende 10 gårdene (G11.U1-G20.U1), fordelt på to lass (L2.U1 og L3.U1) ble pumpet inn på samme silo, men sammen med melk fra andre ruter og tappet på ferdigvaretank T2.U1 og deretter videre på kartong. For uttak 2 ble gård 1-9 (G1.U2-G9.U2) overført til S1.U2, tappet på T1.U2 og deretter kartong. De resterende gårdene, G10.U2-G20.U2, ble pumpet inn på S2.U2 sammen med melk fra andre ruter og deretter tappet på T2.U2 og kartong. Ved uttak 3 ble melken fra alle tre lassene pumpet inn på samme silo (S1.U3) uten blanding fra noen andre ruter og ble dermed tappet på en ferdigvaretank (T1.U3). Ved uttak 3 ble kun utført analyser av kartong på produksjonsdagen, kartong ved utgått holdbarhet ble ikke analysert.

Tabell 3.1: Skjema for hvilke gårdsprøver og lassprøver som hører til de forskjellige silotankene, tappetankene og kartongene.

Uttak	Gård	Lassprøve	Silo	Ferdigvaretank	Kartong	Kartong utgått holdbarhet
1	G1.U1-G10.U1	L1.U1	S1.U1	T1.U1	KS1.U1 x3	KS1.U1x3/4°C KS1.U1x3/6°C KS1.U1x3/8°C
1	G11.U1-G20.U1	L2.U1, L3.U1 + lass fra andre ruter	S2.U1	T2.U1	KS2.U1 x3	KS2.U1x3/4°C KS2.U1x3/6°C KS2.U1x3/8°C
2	G1.U2-G9.2	L1.U2	S1.U2	T1.U2	KS1.U2 x3	KS1.U2x3/4°C KS1.U2x3/6°C KS1.U2x3/8°C
2	G10.U2-G20.U2	L2.U2, L3.U2 + lass fra andre ruter	S2.U2	T2.U2	KS2.U2 x3	KS2.U2x3/4°C KS2.U2x3/6°C KS2.U2x3/8°C
3	G3.U1-G3.U20	L1.U3, L2.U3, L3.3	S1.U3	T1.U3	KS1.U3 x3	-

Ulike analyser ble gjort på de forskjellige prøvene. **Tabell 3.2** viser hvilke analyser som ble gjort på de ulike prøvene. Melkeprøvene fra gård og lassprøve fra tankbilen ble analysert på bactocount, spunnet ned til pellet, ekstrahert DNA fra pellet, ddPCR analysert og Illumina-sekvensert. Det samme ble gjort for prøve fra silotank, ferdigvaretank, kartong og kartong ved utgått holdbarhet, men her ble det ikke tatt bactocount analyse. Analysene som ble utført ble

gjort ifølge beskrivelsene nedenfor. Prøver fra ferdigvaretank og kartong ble også behandlet med PMA for å skille mellom levende og døde celler i tillegg til vanlig behandling.

Tabell 3.2: Analyser utført på ulike prøvepunkt.

	Kontroll- skjema	Bactocount og plating	DNA- ekstraksjon	DNA- ekstaksjon m/ PMA- behandling	ddPCR	Illumina- sekvensering
Gård (G)	X	X	X		X	X
Lass-prøve bil (L)		X	X		X	X
Silo-tank (S)/ Balansekasse			X		X	X
Tappetank (T)/			X	X	X	X
Kartong (K)			X	X	X	X
Kartong holdbarhet			X	X	X	X

3.2 Gårdsbesøk

En liste med kontrollpunkter for melkerom på gård ble laget i samarbeid med Tine sin rådgiver på ruten som ble besøkt (**Vedlegg 1**). På hver gård ble det sjekket lagringstemperatur på gårdstank, temperatur på melken ved pumping over på bilen, melkevolumet pumpet over, om fjøsdøren inn til melkerommet var lukket, om korken på tappestussen var av eller på, volumet til gårdstanken, type vask på gårdstank (automatisk eller manuell) og merket på gårdstanken (Wedholms eller Landteknikk).

Melkeprøvene på gård ble tatt ut i olabeger på bil under pumping av melk fra gårdstank til tankbil ved automatisk prøveuttak på bil. Lassprøvene ble tatt ut ved leveranse av melk til meieriet. Tankbilsjåføren tok en samleprøve fra hvert skott på bilen ved hjelp av en steril bulkotest av plast og overførte til et sterilt olabeger.

3.3 Uttak av prøver på meieri

Det ble tatt ut prøver fra silo (U1)/balansekasse (U2 og U3) og tappetank, i tillegg til kartong på meieriet. Fra silo/balansekasse og tappetank ble det brukt en steril engangssprøyte av plast. Uttaksstedet ble desinfisert med Desinfect o (Novada, Kolding, Danmark) før melken ble tatt ut fra tanken. Melken ble pasteurisert ved 72 °C i 15 sekunder før uttak av prøver ved ferdigvaretank og kartong.

3.4 Transport av prøver

Prøvene ble transportert fra meieriet med bil i 45 minutter i isoporesker med kjøleelement før den ble satt på kjølerom med 4 °C til morgenen etter uttaket. Holdbarhetsprøver ble plassert i kjøleskap ved 4, 6 og 8 °C, hvor de ble oppbevart til utgått holdbarhet (14 dager).

3.5 Bactocount

Melken fra gårds- og lassprøvene ble vendt et par ganger. Deretter ble 1 ml melk pipettert over i en forvarmet prøve kopp (50 °C), tilsatt 2 ml IBC-inkuberingsløsning (bestående av en klarifiserende buffer (komponent 1), et proteolytisk enzym (komponent 2) og en fluoriserende markør (komponent 3) i forholdet 18:1:1 levert av Bentley Instruments) og plassert på en varmeplate (50 °C) i totalt 10 minutter, hvor prøven etter 9 minutter ble sonikert (15 sekunder). Etter inkuberingstiden ble prøvene flyttet til et strømningscytometer hvor prøven ble analysert (Bentley Instruments, Chaska Minnesota, USA).

3.6 Utplating

Utplating av prøver ble utført av forskningsassistent Christine de Billot. Melkeprøvene ble fortynnet ved bruk av 9 ml Ringers-fortynningsrør og tilførsel av 1 ml prøve til første rør. Fortynningene (10^{-2} - 10^{-4}) ble innstøpt i PCA-agarplate med tilførsel av 1 ml fra hvert fortynningsrør. Prøvene ble inkubert ved 30 °C i 3 døgn.

3.7 Pellet

Fra Olabeger eller kartonger med melk ble det pipettert ut 40 ml melk til et 50 ml Falconrør. Prøvene ble deretter sentrifugert i en Thermo Scientific Heraeus Multifuge X3R Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Porten Down, UK) ved 8000 g i 10 minutter ved 4°C. Supernatanten ble så fjernet og pelleten suspendert i 1 ml med citratvann (99 %) i et eppendorfrør (1,5 ml). Prøvene ble deretter sentrifugert ved 16110 g i 3 min i en Eppendorf 5415 D Centrifuge (Marshall Scientific, Hampton, New Hampshire, USA) og supernatanten ble fjernet. Pelleten ble vasket med 1 ml citratvann (99 %) og deretter sentrifugert ved 16110 g i 3 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten vasket på nytt som tidligere nevnt med 1 ml citratvann, sentrifugert ved 16110 g i 3 min før supernatanten ble fjernet. Deretter ble pelleten lagt på frys frem til DNA ekstraksjon.

3.8 Pellet med PMA-behandling

PMA behandling ble utført i henhold til (Porcellato et al., 2015). Ved PMA-behandling ble pellet laget som nevnt ovenfor, før den ble resuspendert i 500 µl citratvann (99 %). Deretter ble det tilsatt 1,25 µl PMA (Biotium, Hayward, USA) og prøvene ble inkubert ved romtemperatur i mørket i 5 minutter med jevnlig risting. Prøvene ble deretter plassert på et isbrett 20 cm fra en halogenlyskilde og belyst i 5 minutter. Deretter ble prøvene sentrifugert ved 16104 g (13000 rpm) i 4 minutter i en Eppendorf 5415 D Centrifuge (Marshall Scientific) før supernatanten ble fjernet og pelleten fryst frem til DNA ekstraksjon.

3.9 DNA ekstraksjon (Bead-beating og Mag Midi Kit)

Fastpreptuber ble fylt med 0,5 g med glassbiter (glass beads), en til hver prøve. Pelleten ble resuspendert i 200 µl med lysisbuffer (20 mM Tris-Cl (pH 8), 2 mM natrium EDTA, 1,2 % Triston[®] X-100) og deretter overført til de tillagede fastpreptubene med glassbiter. Tubene ble deretter plassert i en FastPrep96[™] (MP Biomedicals, Santa Ana California, USA) 50 sekunder ved max hastighet (1800 rpm) og plassert på is i 5 minutter (dette ble repetert 2 ganger). Deretter ble tubene sentrifugert i 1 min på full hastighet (16110 g) i en Eppendorf 5415 D Centrifuge. Supernatanten (Marshall Scientific) og 50 µl ble så overført til en 96-brønnplate.

Deretter ble MAG MIDI KIT protokollen (LGC group, Berlin, Tyskland) fulgt for DNA ekstraksjon (LGC, 2014). Endringer fra protokollen:

- 50 µl elueringsbuffer ble tilsatt istedenfor 63 µl.
- Ved uttak 2, 3 og holdbarhetsprøver fra uttak 1 ble det brukt 20 min inkubering ved elueringsteget.
- Mindre enn 50 µl supernatant innholdene DNA ble tatt ut og overført til ny 96-brønnplate i siste trinn.

3.10 Droplet Digital PCR

Droplet digital polymerasekjedereaksjon (ddPCR) ble utført ved NMBU av Masterstudenten Francesco Tormachio i henhold til (Porcellato et al., 2016). Det var noen avvik fra Porcellato et al., 2016 (Porcellato et al., 2016). Totalt volum på reaksjonskomponentene var her 20 µl. Reaksjonskomponentene besto av forward primer Uni340F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') og reverse primer Bac306R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3') (Porcellato and Skeie, 2016) med konsentrasjon på 0,2 µl, probe (0,1 µl), DNA fra prøver (1 µl) og ddPCR Supermix for probes (Bio-Rad, Pleasanton, CA, USA). De ble blandet og amplifisert. Under amplifiseringen ble først polymerasen aktivert ved 95 °C i 10 minutter. Følgende ble så gjort i en 35 syklus; dobbeltrådet DNA (dsDNA) denaturert til singeltrådet DNA (ssDNA) ved 94 °C (30 sek). Primerne festet seg så til ssDNA ved 54 °C (30sek) før elongering ved 72 °C (45 sek). Til slutt ble dråpene stabilisert

ved 98 °C (10 min) og deretter ble prøvene kjølt ned til 4 °C. Mengden DNA ble så avlest ved bruk av Quantasoft software ver 1.7 (Bio-Rad, Berkeley, California, USA).

3.11 Illumina sekvensering

Illumina sekvenseringen ble utført av Postdoc Davide Porcellato ved NMBU i henhold til (Porcellato and Skeie, 2016). Først ble det utført PCR for 16S rRNA amplifisering ved bruk av universell forward primer Uni340F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') og universell reverse primer Bac306R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3') for å amplifisere V3 og V4 (Porcellato and Skeie, 2016). En endring fra Porcellato and Skeie (2016) var at det ble tilsatt 2 µl ekstrahert DNA, 0,5 mg/ml BSA og 2,5 mM MgCl i mastermix. Følgende program ble brukt til kjøring av PCR: første denaturering ved 98 °C i 30 sek, etterfulgt av 35 sykluser med denaturering ved 98 °C i 30 sek, annealing ved 53 °C i 30 sek og elongering ved 72 °C i 20 sek, og tilslutt endelig elongering ved 72 °C i 10 minutter. Deretter ble PCR produktet fra 16S rRNA amplifiseringen vasket ved hjelp av AMPure XP beads (Beckmen, Coulter, Inc, Brea, CA, USA). På det vaskede produktet ble det så utført en ny PCR ved bruk av Illumina indexed PCR primere hvor en ny amplifisering ble gjort. Dette ble gjort på samme måte som ved første PCR med unntak av små endringer i PCR program og med 5 µl purifisert DNA. Følgende PCR program ble kjørt: første denaturering ved 98 °C i 30 sek, etterfulgt av 10 sykluser med denaturering ved 98 °C i 30 sek, annealing ved 55 °C i 30 sek og elongering ved 72 °C i 20sek, og tilslutt endelig elongering ved 72 °C i 10 minutter. Deretter ble PCR produktet vasket ved bruk av Sequalprep normalization kit (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA). For å sjekke innholdet av DNA i de amplifiserte prøvene ble det så tatt en Qubit test (ThermoFisher, 2015). Ved for lite DNA ble det utført en ny PCR med bruk av Illumina primere og en Iproof polymerase, og deretter en ny vask før en ny kvantifisering ved bruk av PerfeCta. Prøver med rett innhold av DNA ble kvantifisert ved bruk av Kapa Library Quantification kit (Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA) for Illumina sequencing platforms fra Quanta BioSciences (KapaBioscinces, u.å.). Tilslutt ble Illumina Library Denaturing and MiSeq Sample loading step (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Procol) (Illumina, San Diego, CA, USA) brukt for endelig sekvensering.

3.12 Behandling av data

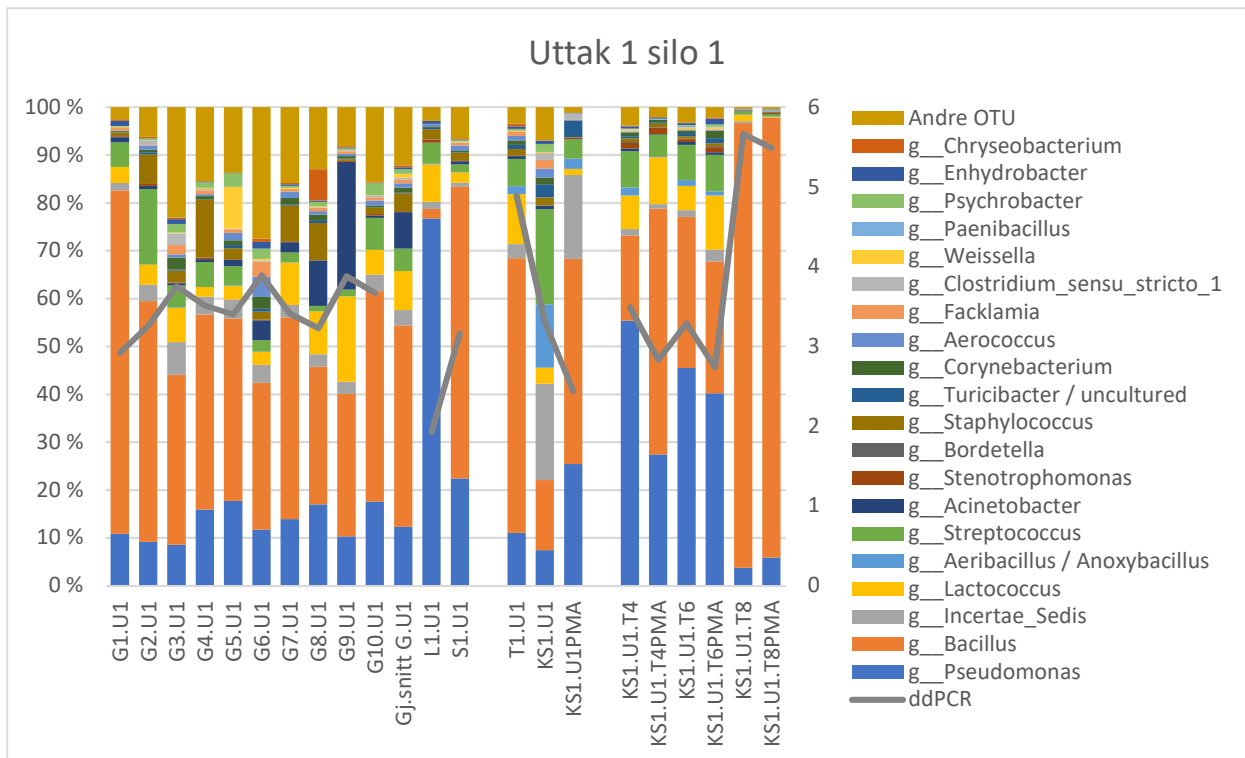
Datsett med tre gjentak ble analysert ved bruk av ANOVA og Tukey multiple comparison test for å se om det var signifikante forskjeller mellom gårdsfaktorerer (melkesystem, type vask av gårdstank, fjøstype, type gårdtank, fjøsdør åpen eller lukket inn til melkerom, propp på tappestuss av eller på og supplement til fôr) i forhold til mengde bakterier (Chao) og spredning i type bakterie (Shannon). En linær interaksjonsmodell ble brukt for å observere den eventuelle sammenhengen mellom vaskesystem og tanktype kunne ha på hverandre i forhold til bakterieinnhold. Det ble også sett på korrelasjonen mellom tre ulike metoder brukt for identifisering av totalt antall bakterier. Alt av beskrevet ovenfor ble gjort ved bruk av R-commander.

4. Resultater

4.1 Total mikrobiota fra gård til kartong

Total mikrobiota i melkeprøvene er vist i stablet bardiagram for å vise prosentmengde av de ulike bakteriene i hver enkelt prøve på genusnivå. Gjennomsnittsverdiene for gård med hensyn på melkevolum fra hver enkelt gård er vist i **Vedlegg 2** og **Vedlegg 3**. Bakterien med navn *Incertae sedis* på genus nivå tilhører familien *Peptostreptococcaceae*, men det er usikkert hvilken genus den hører til.

Total mikrobiota på genusnivå for prøveuttakene ved uttak 1 silo 1 med total bakterie mengde vist med ddPCR er vist i **Figur 4.1**.

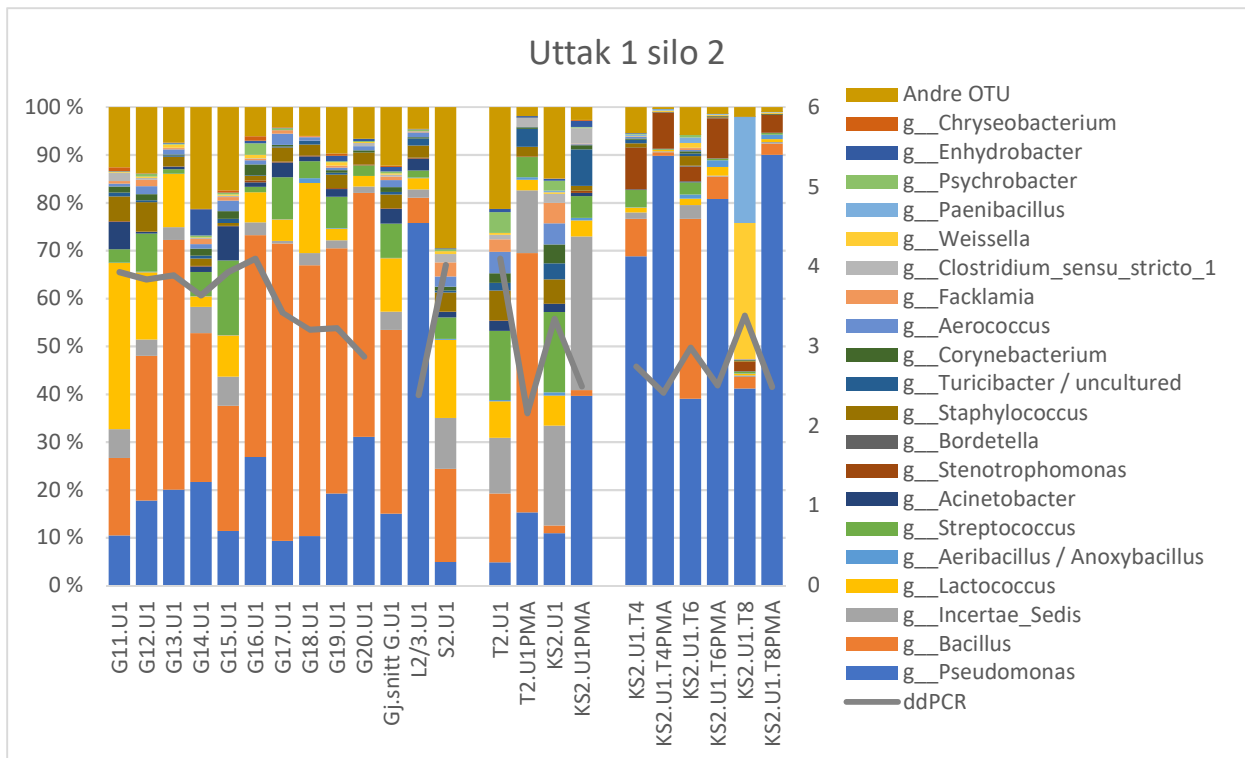


Figur 4.1: Total mikrobiota på genusnivå fra uttak 1 (U1) av melk fra utvalgte gårder (G1-G10) som gikk inn på silo 1 (S1) og videre til ferdigvaretank (T1) og kartong fra silo 1 (KS1). Prøvene er vist fra venstre til høyre, med hhv. rå melk fra gård 1 til 10 (G1-G10), gjennomsnitt av gårdsprøver med hensyn til melkevolum (Gj.snitt G), lassprøve fra tankbil (L1), silotank på meieri (S1), pasteurisert melk på ferdigvaretank (T1), kartong ved produksjonsdag (KS1) uten PMA (levende og døde celler), kartong produksjonsdag (KS1.PMA) med PMA (kun levende celler), kartong ved utgått holdbarhet, annen hver med og uten PMA, ved hhv 4, 6 og 8 °C. Kartongprøvene er gjennomsnitt av tre paralleller. Første akse viser prosentvismengde av bakterier. Total mengden bakterier er vist ved grått linjediagram som kopier av DNA per ml melk, vist på andre akse. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Felles for gårdsprøvene ved uttak 1 på silo 1 er innholdet av *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactococcus* og *Streptococcus*. Lassprøven viser en større andel *Pseudomonas* enn det er i gjennomsnittet av gårdsprøvene, og et lavere antall av total bakteriemengde. Silotanken gir et godt gjennomsnittsbilde for gårdsprøvene. Etter pasteurisering ser bakterieprofilen relativt lik ut, men her kan det være både levende og døde bakterier. Etter 14 dager er det mest *Pseudomonas* (27,4 % av log 2,83 kopier/ml og 40,2 % av log 2,7 kopier/ml), *Bacillus* (51,4 % av log 2,83 kopier/ml og 27,5 % av log 2,7 kopier/ml), *Lactococcus* (9,8 % av log 2,83 kopier/ml og 11,4 % av log 2,7 kopier/ml) og *Streptococcus* (5 % av log 2,83 kopier/ml og 7,6 % av log 2,7 kopier/ml) ved hhv. 4 og 6 °C, mens ved 8 °C er det størst andel *Bacillus* (91,8 % av log 5,49 kopier/ml) med en liten andel *Pseudomonas* (5,9 % av log 5,49 kopier/ml). Bakterieprofilen for kartongprøvene på produksjonsdag, med (levende) og uten PMA (levende og døde)

(KS1.U1PMA og KS1.U1) er forskjellige. I kartongprøven med PMA (KS1.U1PMA) er det lite *Aeribacillus/Anoxybacillus* (2,1 % av log 2,4 kopier/ml) og *Streptococcus* (0,1 % av log 2,44 kopier/ml) tilstede, mens uten PMA (KS1.U1) var det større mengder av disse med 13,2 % *Aeribacillus/Anoxybacillus* per log 3,3 kopier/ml og 2,1 % *Streptococcus*. Det er heller større andel *Pseudomonas* (25,4 % av log 2,4 kopier/ml) og *Bacillus* (42,9 % av log 2,4 kopier/ml) i kartong med PMA-behandling i forhold til uten (7,4 % *Pseudomonas* og 14,7 % *Bacillus* i log 3,3 kopier/ml). Ved utgått holdbarhet er det større likhet mellom kartongprøvene med og uten PMA. Mengden bakterier er også lavere i prøvene med PMA-behandling i forhold til uten PMA. Total bakteriemengde er relativ lik mellom utgått holdbarhet ved 4 og 6 °C, mens ved 8 °C ser vi en økning sammenlignet med prøvene lagret ved 4 og 6 °C, fra log 2,8 til log 5,5.

Total mikrobiota på genusnivå for prøveuttakene ved uttak 1 silo 2 med total bakterie mengde vist med ddPCR er vist i **Figur 4.2**. Her er silotanken blandet med melk i fra ulike andre ruter i tillegg til ruten som ble fulgt. Melken fra den utvalgte ruten utgjør 51,3 % av totalt melkevolum inn på silotank.

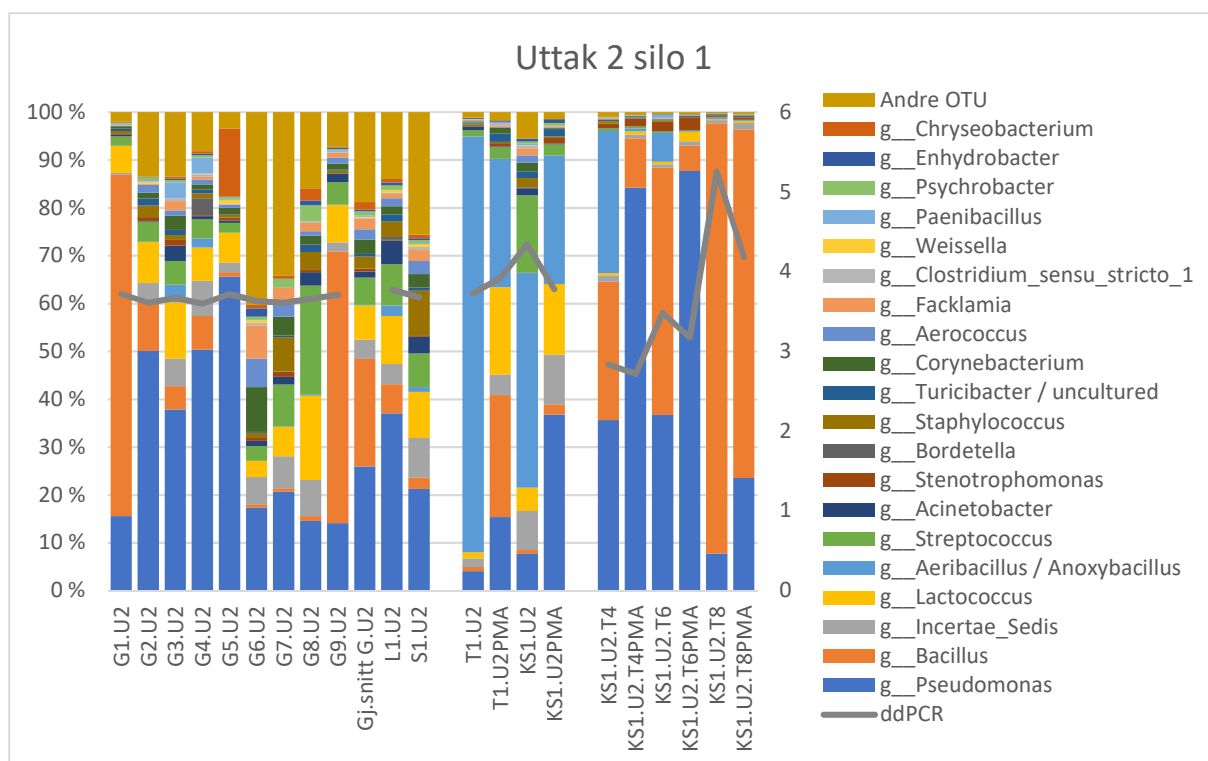


Figur 4.2: Total mikrobiota fra uttak 1 (U1) av melk som gikk inn på silo 2 (S2) og videre til tappetank og kartong fra silo 2. På silotank ble melken fra de utvalgte gårdene (G11-G20) blandet med melk fra andre ruter. Fra silotank og innover i anlegget er da melken fra de utvalgte gårdene blandet med annen melk. Melken fra de utvalgte gårdene utgjør 51,3 % av totalt volum på silotank. Prøvene er vist fra venstre til høyre, med hhv. rå melk fra gård 11 til 20 (G11-G20), gjennomsnitt av gårdsprøver med hensyn til melkevolum (Gj.snitt G), lassprøver fra tankbil (L2/L3), silotank på meieri (S2), pasteurisert melk på ferdigvaretank (T2) uten PMA (levende og døde celler), ferdigvaretank med PMA (levende celler), kartong ved produksjonsdag (KS2) uten PMA (levende og døde celler), kartong produksjonsdag (KS2.PMA) med PMA (kun levende celler), kartong ved utgått holdbarhet, annen hver med og uten PMA, ved hhv 4, 6 og 8 °C. Kartongprøvene er gjennomsnitt av tre paralleller. Første akse viser prosentvismengde av bakterier. Total mengden bakterier er vist ved grått linjediagram som kopier av DNA per ml melk, vist på andre akse. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Gårdsprøvene ved uttak 1 på silo 2 består hovedsakelig av *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactococcus* og noe *Streptococcus*. Lassprøven har større mengder *Pseudomonas* enn gårdsprøvene og lavere innhold av totalt antall bakterier i forhold til gårdsprøvene. På silotank utgjør gårdsprøvene 51,3 % av innholdet. Silotanken inneholder en mindre andel *Bacillus* og *Pseudomonas* enn gårdsprøvene på den fulgte ruten. På ferdigvaretank med PMA-behandling er det mer *Bacillus* (54,2 % av log 2,16 kopier/ml) i forhold til både silotank (19,5 % av log 4,02 kopier/ml) og ferdigvaretank uten PMA (14,4 % av log 4,1 kopier/ml). På kartong behandlet med PMA (produksjonsdag) er det *Pseudomonas* (39,6 % av log 2,5 kopier/ml) og *Incertae*

sedis (*Peptostreptococcaceae*) (32,1 % av log 2,5 kopier/ml) som dominerer. I melkeprøvene ved utgått holdbarhet er det *Pseudomonas* som dominerer innholdet i prøvene ved både 4, 6 og 8 °C med hhv. 89,8 % (av log 2,4 kopier/ml), 80,8 % (av log 2,5 koper/ml) og 90 % (log 2,5 kopier/ml). Bakterieinnholdet i prøvene med og uten PMA behandling er forskjellige. Ved ferdigvaretank (T2.U1 og T2.U1PMA) er det mindre *Streptococcus* (4,2 % av log 2,6 kopier/ml kontra 14,4 % i log 4,1 kopier/ml) tilstede i prøven med PMA og mer *Bacillus* (54,2 % i log 2,2 kopier/ml kontra 14,4 % av log 4,1 kopier/ml) og *Pseudomonas* (15,3 % av log 2,2 kopier/ml kontra 4,8 % av log 4,1 kopier/ml). Ved utgått holdbarhet er det *Bacillus* tilstede i prøvene uten PMA lagret ved 4 og 6 °C (KS2.U1.T4 og KS2.U1.T6), mens ved PMA-behandling (KS2.U1.T4PMA og KS2.U1.T6PMA) er det tilnærmet ingen *Bacillus* detektert, men store deler *Pseudomonas*. I prøvene lagret ved 8 °C utgjør *Weissella* (28,4 % av log 3,4 kopier/ml) og *Aeribacillus/Anoxybacillus* (22,2 % av log 3,4 kopier/ml) en stor andel i kartong uten PMA-behandling (KS2.U1.T8), mens ved PMA-behandling er det kun dedektert store deler *Pseudomonas* (90 % av log 2,5 koper/ml). Det er også en nedgang i totalt bakterietall i prøvene med PMA i forhold til uten PMA.

Total mikrobiota på genusnivå for prøveuttakene ved uttak 2 i silo 1 med total bakterie mengde vist med ddPCR er vist i **Figur 4.3**. Her er innholdet på silotank kun fra gårder fra den fulgte ruten.

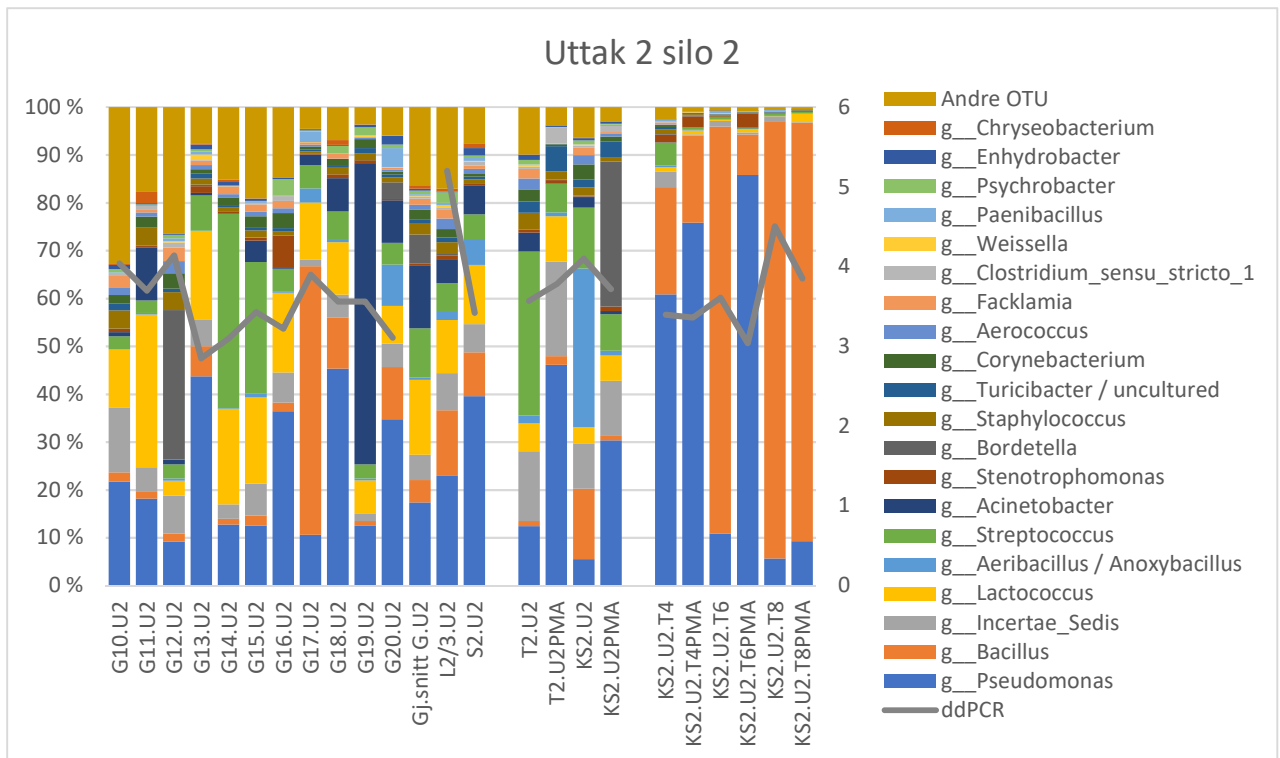


Figur 4.3: Total mikrobiota fra uttak 2 (U2) av melk som gikk inn på silo 1 (S1) og videre til ferdigvaretank (T1) og kartong fra silo 1 (KS1). Prøvene er vist fra venstre til høyre, med hhv. rå melk fra gård 1 til 9 (G1-G9), gjennomsnitt av gårdsprøver med hensyn til melkevolum (Gj.snitt G), lassprøve fra tankbil (L1), silotank på meieri (S1), pasteurisert melk på ferdigvaretank (T1), kartong ved produksjonsdag (KS1) uten PMA (levende og døde celler), kartong produksjonsdag (KS1.PMA) med PMA (kun levende celler), kartong ved utgått holdbarhet, annen hver med og uten PMA, ved hhv 4, 6 og 8 °C. Første akse viser prosentvismengde av bakterier. Kartongprøvene er gjennomsnitt av tre paralleller. Total mengden bakterier er vist ved grått linjediagram som kopier av DNA per ml melk, vist på andre akse. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Totalt antall bakterier ved uttak 2 på silo 1 var relativt likt mellom gårdsprøvene og inn på lass og silotank. To gårder (G1.U2 og G9.U2) hadde en stor andel *Bacillus* (hhv. 71,3 % og 56,8 % i log 3,7 kopier/ml). Gårdene G2.U2-G5.U2 hadde større mengde *Pseudomonas* (fra 37,7 – 65,6 % i log 3,6- 3,7 kopier/ml), men også noe *Bacillus* (varierende mellom 1-10 %), samt *Lactococcus* (varierende mellom 6,3-11,8 %). Gårdene G6.U2- G8.U2 hadde en del *Pseudomonas* (varierende mellom 14,5-20,7 %), samt en større variasjon av andre bakterier enn de andre gårdsprøvene. G8.U2 hadde større mengder *Lactococcus* (17,6 % v log 3,7 kopier/ml) og *Streptococcus* (22,8 % av log 3,7 kopier/ml) enn de andre gårdsprøvene. Lassprøven og silotanken har relativt lik fordeling av bakterier, som gjenspeiler den samlede bakteriefloraen fra gårdene. På ferdigvaretank uten PMA-behandling er mesteparten av

mikrobiotaen *Aeribacillus/Anoxybacillus* (86,7 % av log 3,7 kopier/ml), men i melk fra ferdigvaretank med PMA-behandling er fordelingen annerledes. Det er en del *Bacillus* (24,5 % av log 3,9 kopier/ml), en del *Lactococcus* (18,3 %) og en del *Aeribacillus/Anoxybacillus* (26,8 %), samt noe *Pseudomonas* (15,3 %) på kartongen med PMA-behandling. På kartong ved produksjonsdag er det også en del *Aeribacillus/Anoxybacillus* tilstede, både ved kartong med (44,8 % av log 4,3 kopier/ml) og uten PMA (26,8 % av log 3,8 kopier/ml). Det er ingen reduksjon av totalt bakterieantall mellom ferdigvaretank med og uten PMA. Ved utgått holdbarhet er det *Pseudomonas* som dominerer ved 4 og 6 °C i melken med PMA-behandling (hhv. 84,2 % av log 2,7 og 87,6 % av log 3,1 kopier/ml). I melken lagret ved 8 °C er det vekst i total antall bakterier fra 4 og 6 °C på rundt 1 log. Bakterieinnholdet her er bestående av *Bacillus* (72,8 % av log 4,1 kopier/ml) og noe *Pseudomonas* (23,5 %).

Total mikrobiota på genusnivå for prøveuttakene ved uttak 2 på silo 2 med total bakteriemengde vist med ddPCR er vist i **Figur 4.4**. Her er innholdet på silotank blandet med melk av gårder på andre ruter. Melk fra den utvalgte ruten utgjør 32,8 % av totalt melkevolum inn på silotank.

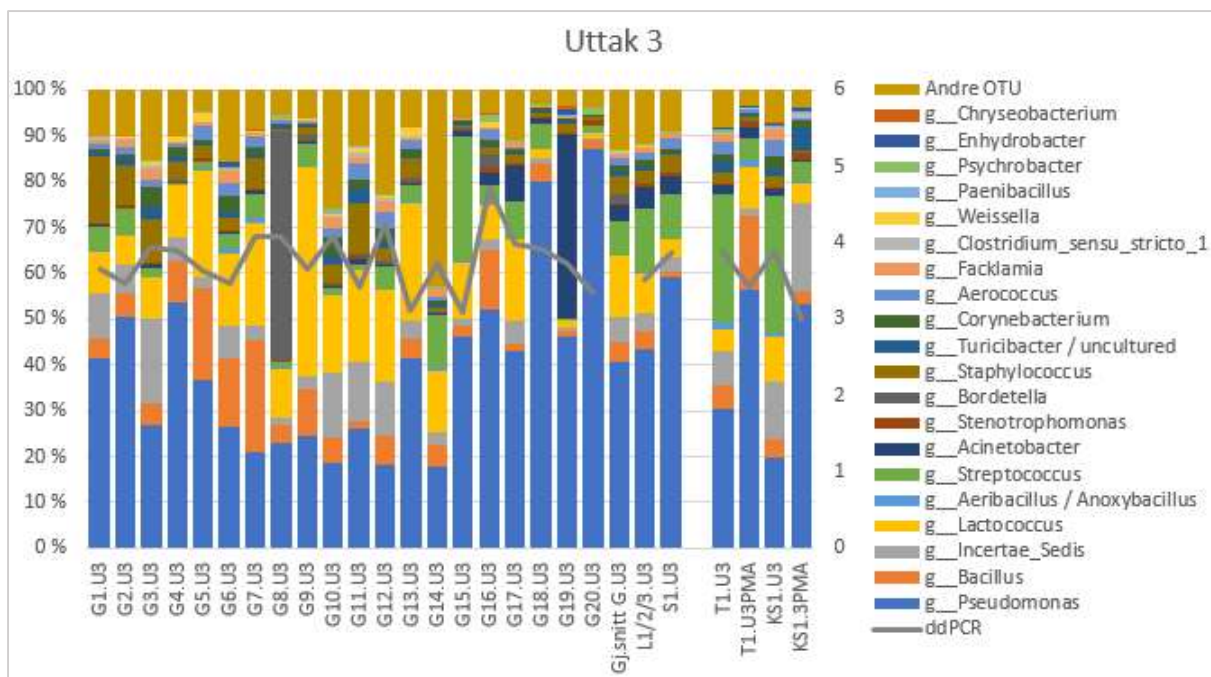


Figur 4.4: Total mikrobiota fra uttak 2 (U2) av melk som gikk inn på silo 2 (S2) og videre til ferdigvaretank (T2) og kartong fra silo 2 (KS2). På silotank ble melken fra de utvalgte gårdene blandet med melk fra andre ruter. Fra silotank og innover i anlegget er melken fra de utvalgte gårdene blandet med annen melk. Melken fra de utvalgte gårdene består av 32,8 % av totalt volum på silotank. Prøvene er vist fra venstre til høyre, med hhv. rå melk fra gård 10 til 20 (G10-G20), gjennomsnitt av gårdsprøver med hensyn til melkevolum (Gj.snitt G), lassprøve fra tankbil (L2/L3), silotank på meieri (S2), pasteurisert melk på ferdigvaretank (T2), kartong ved produksjonsdag (KS2) uten PMA (levende og døde celler), kartong produksjonsdag (KS2.PMA) med PMA (kun levende celler), kartong ved utgått holdbarhet, annen hver med og uten PMA, ved hhv 4, 6 og 8 °C. Kartongprøvene er gjennomsnitt av tre paralleller. Første akse viser prosentvismengde av bakterier. Total mengden bakterier er vist ved grått linjediagram som kopier av DNA per ml melk, vist på andre akse. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Ved uttak 2 på silo 2 er det kun benevningsverdige mengder av *Bacillus* i melken fra gårdene G17.U2 (56,2 % av log 3,9 kopier/ml), G18.U2 (10,6 % av log 3,6 kopier/ml) og G20.U2 (10,1 % av log 3,1 kopier/ml). Ellers er det *Pseudomonas* og *Lactococcus* i alle gårdsprøvene. G12.U2 har større mengder *Bordetella* (31,2 % av log 4,1 kopier/ml). Melk fra G14.U2 og G15.U2 hadde større mengder *Streptococcus* (hhv. 40,7 % av log 3,1 og 27,4 % av log 3,4 kopier/ml). Melk fra gård G19.U2 hadde større mengder *Acinetobacter* (62,9 % av log 3,6 kopier/ml). Lassprøvene viser tilnærmet samme flora som melken inn på silotank, selv om silotank er blandet med melk i fra andre gårder. I melk fra ferdigvaretank kan man se forskjell mellom melk med og uten PMA-behandling. Ved melkeprøvene med PMA-behandling er *Lactococcus*-innholdet redusert

og det er større mengder *Pseudomonas* i melken. På kartong ved produksjonsdag er det *Aeribacillus/Anoxybacillus* (33,1 % av log 4,1 kopier/ml) og *Bacillus* (14,7 %) tilstede i melkeprøvene uten PMA-behandling. Ved PMA-behandling er det derimot mer *Pseudomonas* (30,3 % av log 3,7 kopier/ml) tilstede, samt *Bordetella* (30,3 %). Det er også vist liten reduksjon i antall bakterier mellom prøvene med og uten PMA-behandling på produksjonsdag. Ved utgått holdbarhet er det *Pseudomonas* som dominerer i melken lagret ved 4 og 6 °C ved PMA-behandling (hhv. 75,8 % av log 3,4 og 85,8 % av log 3 kopier/ml). Noe *Bacillus* er også tilstede ved disse lagringstemperaturene (18,2 % og 8,4 % for hhv. 4 og 6 °C). Ved 8 °C er det *Bacillus* som dominerer i melken med PMA-behandling (87,4 % av log 3,9 kopier/ml). Man kan også se en økt mengde bakterier i melken ved 8 °C i forhold til ved lagring ved 4 og 6 °C. Forskjell mellom mengde bakterier ved utgått holdbarhet mellom prøvene med og uten PMA er kun observert ved 6 og 8 °C. Prøvene lagret ved 4 °C viser tilnærmet lik mengde bakterier for prøvene med og uten PMA.

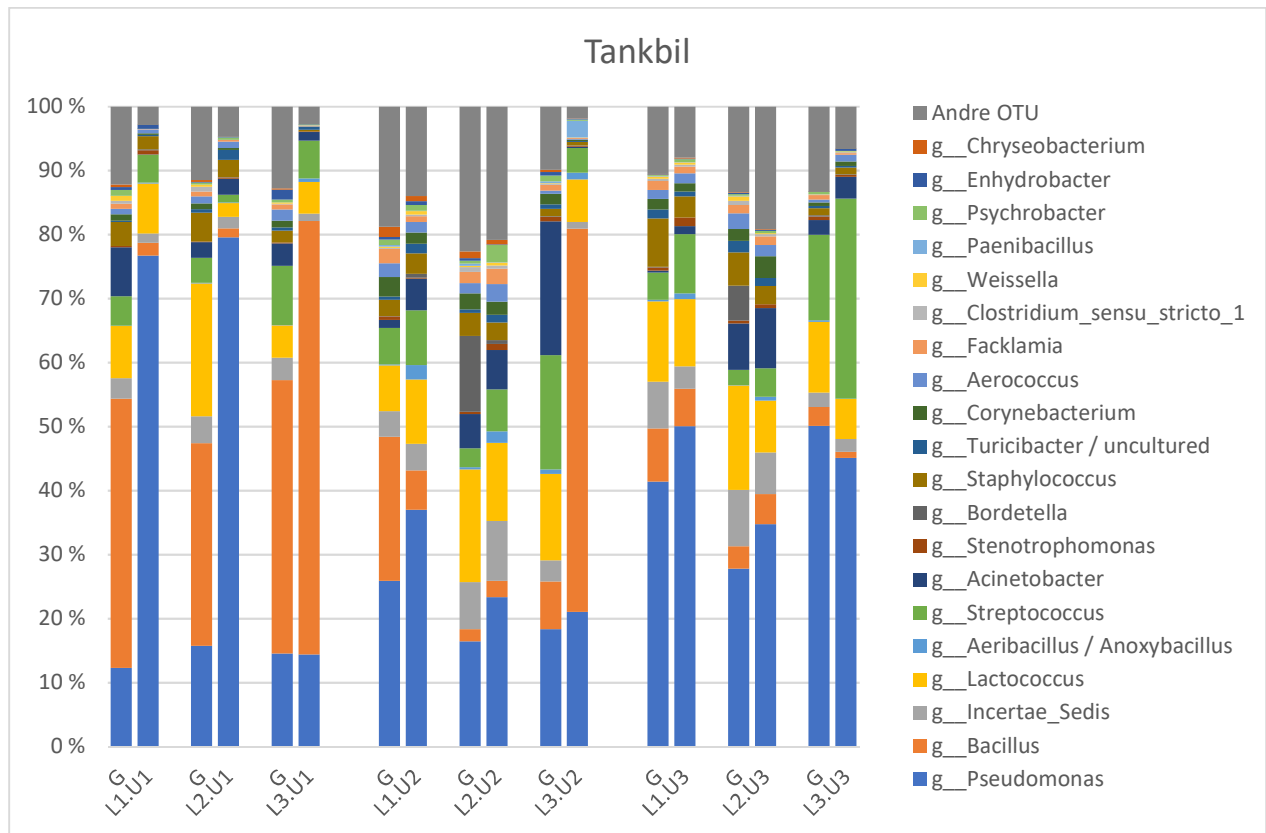
Total mikrobiota på genusnivå for prøveuttakene ved uttak 3 med total bakterie mengde vist med ddPCR er vist i **Figur 4.5**. Her er alle gårdsprøvene fra den fulgte ruten samlet på en silo uten blanding med andre ruter.



Figur 4.5: Total mikrobiota fra uttak 3 (U3). All melken fra gårdene (G1-G20) på den utvalgte ruten ble satt på samme silo (S1) og ikke blandet med annen melk fra andre ruter. Prøvene er vist fra venstre til høyre, med hhv. rå melk fra gård 1 til 20 (G1-G20), gjennomsnitt av gårdsprøver med hensyn til melkevolum (Gj.snitt G), lassprøver fra tankbil (L1/L2/L3), silotank på meieri (S1), pasteurisert melk på ferdigvaretank (T1), kartong ved produksjonsdag (KS1) uten PMA (levende og døde celler), kartong produksjonsdag (KS1.PMA) med PMA (kun levende celler). Kartongprøvene er gjennomsnitt av tre paralleller. Første akse viser prosentvismengde av bakterier. Total mengden bakterier er vist ved grått linjediagram som kopier av DNA per ml melk, vist på andre akse. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Ved uttak 3 inneholder alle gårdsprøvene *Pseudomonas*. Flere gårder har også *Bacillus*, men ikke i så store mengder som ved tidligere uttak. Melk fra gårdene G1.U3-G17.U3 inneholder nevneverdige andel *Lactococcus*. Melk fra gårdene G14.U3 og G15.U3 har større mengder *Streptococcus* i forhold til flere av de andre gårdene ved uttak 3 (hhv. 11,7 % av log 3,7 og 27,1 % av log 3,1 kopier/ml). Melk fra gård G8.U3 har større mengde *Bordetella* (50,1 % av log 4,1 kopier/ml). Melk fra gård G19.U3 har større mengde *Acinetobacter* (40,1 % av log 3,7 kopier/ml). Lass og siloprøve er tilnærmet like med hensyn til bakteriesammensetning. Melk fra ferdigvaretank og kartongprøve med og uten PMA er tilnærmet like, utenom reduksjon av *Streptococcus* i PMA-behandlet prøve. Det er også vist reduksjon i totalt bakterietall fra melkeprøven uten PMA til melkeprøven med PMA. Holdbarhetsprøver fra uttak 3 er ikke tatt med (på grunn av tidsfaktor).

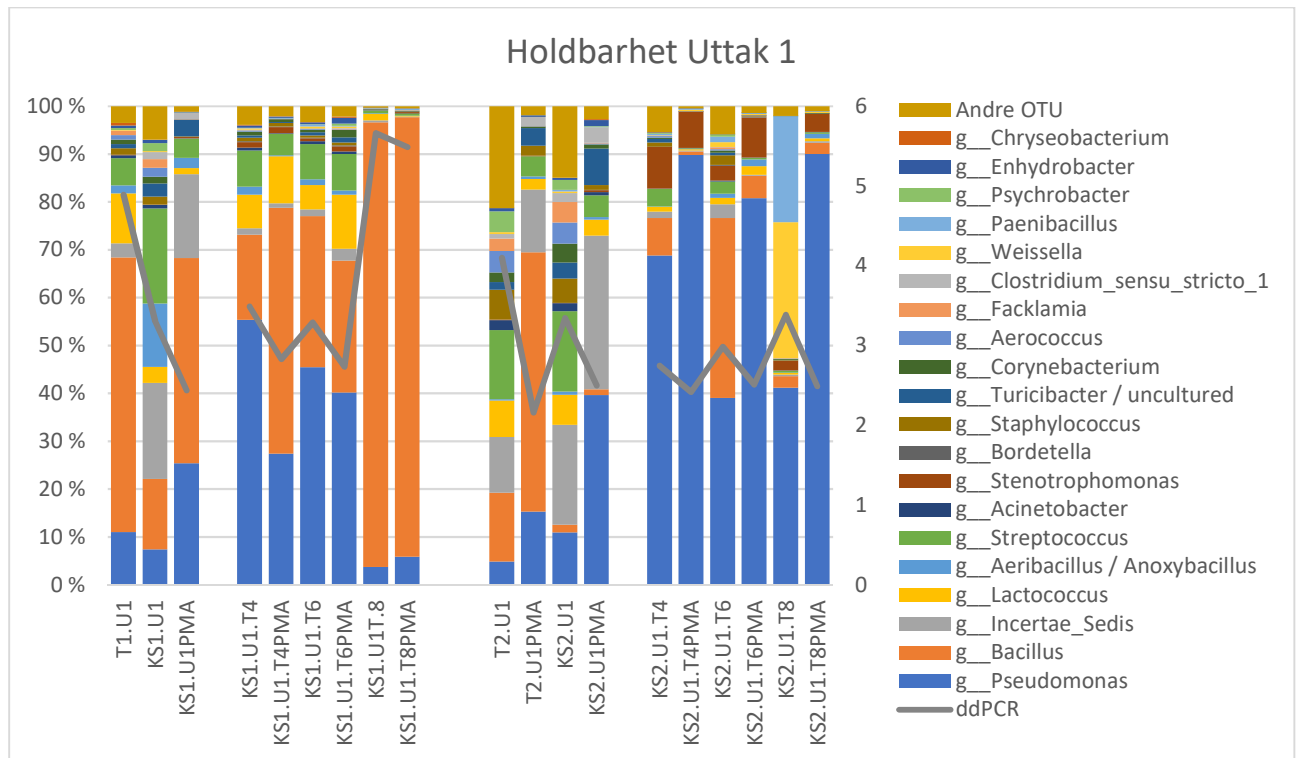
Total mikrobiota på genusnivå for gjennomsnittsverdier av gårdsprøver som er samlet på ulike lassprøver med hensyn til melkevolum er vist i **Figur 4.6**.



Figur 4.6: Total mikrobiota på genusnivå for gjennomsnittsverdier av gårdsprøvene samlet inn på forskjellige lassprøver med hensyn til melkevolum, sammenlignet med totalmikrobiota fra lassprøven. Melken fra gårdene samlet inn på tre ulike lass ved vert uttak. Lass 1 til 3 er vist fra hhv venstre til høyre med uttak 1 til 3 fra hhv venstre til høyre. Ved uttak 1 og 2 ble det brukt samme tankbil. Ved uttak 3 ble det brukt en annen tankbil enn ved uttak 1 og 2. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Ved uttak 1 skiller lass 1 og 2 seg fra gårdsprøvene ved tilstedeværelse av en større andel *Pseudomonas*, mens ved lass 3 fra uttak 1 hadde noe større andel *Bacillus*. Lass 1 har 76,7 % *Pseudomonas* og lass 2 har 79,5 % i forhold til 12,3 % og 15,8 % som der er fra gårdsprøvene. Lass 3 har 25 % større andel *Bacillus* enn det er i gårdsprøvene. Ved uttak 2 var lassprøve 1 og 2 tilnærmet lik gårdsprøvene, mens lassprøve 3 hadde 41,5 % større andel *Bacillus* enn gårdsprøvene. Ved uttak 3 var det tilnærmet lik andel av de ulike bakteriene ved alle tre lassprøvene opp mot gårdsprøvene.

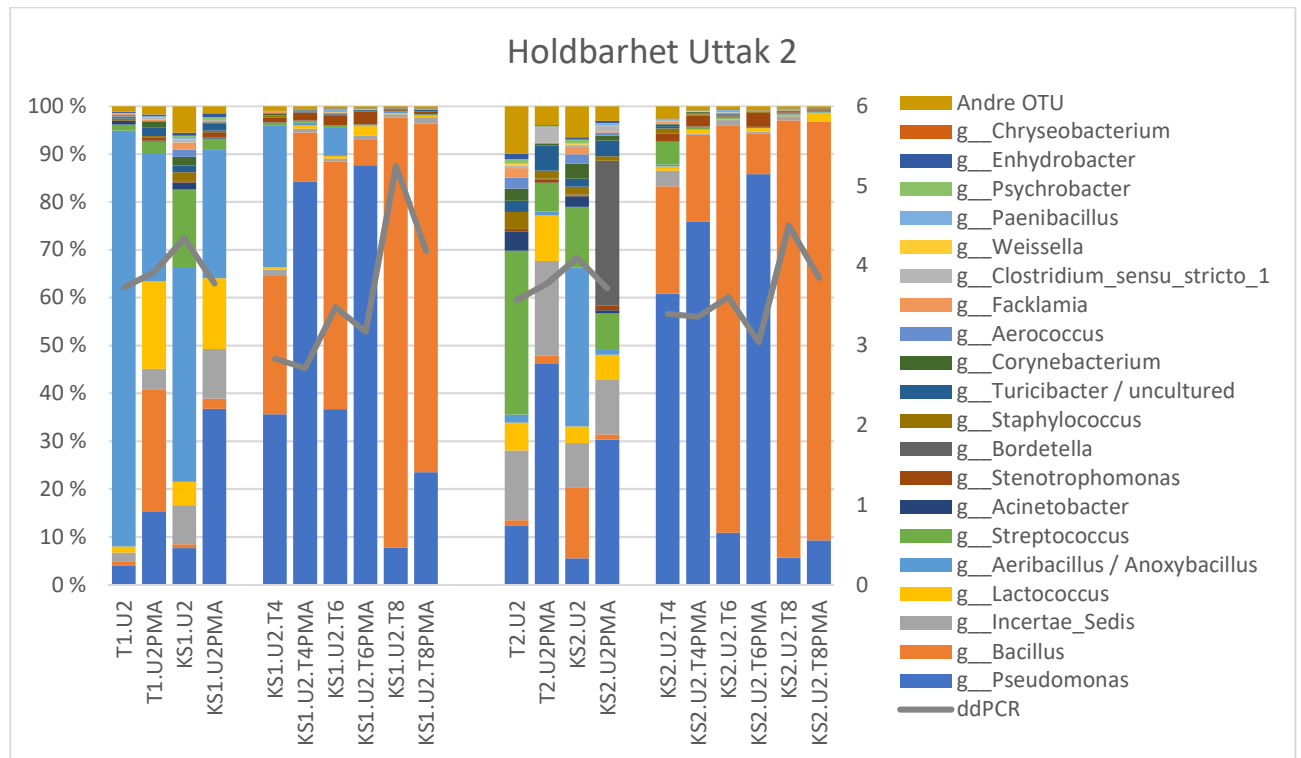
Total mikrobiota på genusnivå for melk med utgått holdbarhet samlet fra uttak 1, med ublandet melk fra silo 1 og blandet melk fra silo 2 og total mengde bakterier i prøvene ved bruk av ddPCR er vist i **Figur 4.7** nedenfor.



Figur 4.7: Total mikrobiota på genusnivå for holdbarhetsprøvene ved uttak 1 (U1) med ferdigvare fra produksjonsdag (ferdigvaretank og kartong). Prøvene fra silo 1 er vist til venstre med ferdigvaretank (T1), kartong uten PMA (KS1), Kartong med PMA (KS1PMA), kartong ved utgått holdbarhet, annen hver med og uten PMA, ved hhv 4, 6 og 8 °C og prøvene fra silo 2 er vist til høyre med samme rekkefølge som for silo 1. Total mengde bakterier i prøvene er viste med ddPCR (log kopier av DNA per ml) ved akse 2. Kartongprøvene er gjennomsnitt av tre paralleller. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Ved utgått holdbarhet fra uttak 1 er det *Bacillus* og *Pseudomonas* som dominerer. Melk med utgått holdbarhet i fra silo 1 har store mengder av både *Bacillus* og *Pseudomonas*, mens utgått holdbarhetsmelk fra silo 2 er det bare store mengder med *Pseudomonas* ved PMA-behandlet melkeprøve. Det ble observert en forskjell mellom lagring av melken ved 4 og 6 °C i forhold til 8 °C ved silo 1, mens ved silo 2 var det bare store mengder *Pseudomonas* ved PMA-behandlet melk ved alle tre lagringstemperaturene. Bakteriantallet var relativt likt mellom lagringstemperaturene på 4 og 6 °C, mens ved 8 °C ble det observert en økning sammenlignet med melkeprøvene lagret ved på 4 og 6 °C ved silo 1. Denne økningen ble ikke observert ved silo 2. Ved silo 2 var det relativt likt bakterieantall mellom lagringstemperaturene.

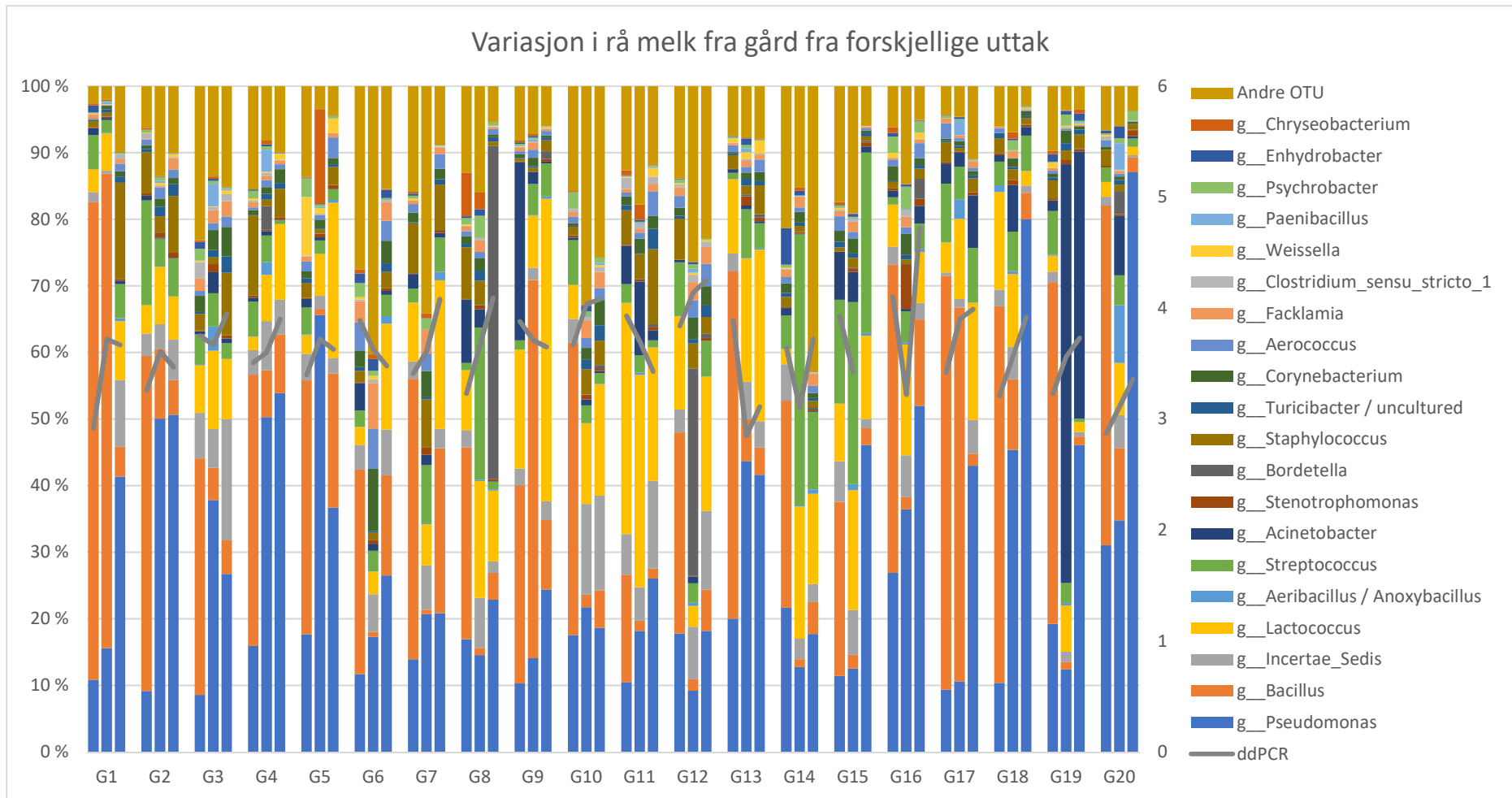
Total mikrobiota på genusnivå for melk med utgått holdbarhet samlet fra uttak 2, med ublandet melk fra silo 1 og blandet melk fra silo 2 og total mengde bakterier i prøvene ved bruk av ddPCR er vist i **Figur 4.8** nedenfor.



Figur 4.8: Total mikrobiota på genusnivå for holdbarhetsprøvene ved uttak 2 med ferdigvare fra produksjonsdag. Prøvene fra silo 1 er vist til venstre med ferdigvaretank (T1), kartong uten PMA (KS1), Kartong med PMA (KS1PMA), kartong ved utgått holdbarhet, annen hver med og uten PMA, ved hhv 4, 6 og 8 °C og prøvene fra silo 2 er vist til høyre med samme rekkefølge som for silo 1. Total mengde bakterier i prøvene er viste med ddPCR (log kopier av DNA per ml) ved akse 2. Kartongprøvene er gjennomsnitt av tre paralleller. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Ved uttak 2 er bakterieprofilen relativt lik mellom utgått holdbarhetsmelk fra silo 1 og silo 2. Selv om det er forskjellig mengde *Bacillus* og *Pseudomonas* på ferdigvaretank og kartong på produksjonsdag ved silo 1 og silo 2, er det fremdeles disse to bakteriene som dominerer melken ved utgått holdbarhet. Ved lagring av melken på 4 og 6 °C er det både *Bacillus* og *Pseudomonas* tilstede, mens ved lagring på 8 °C er det total dominans av *Bacillus*. Bakterietallet er likt ved lagring ved 4 og 6 °C, mens ved lagring på 8 °C har man fått en økning i bakterietallet.

Variasjon av total mikrobiota på genusnivå mellom uttakene (1-3) av gårdprøver og total mengde bakterier i prøvene ved bruk av ddPCR er vist i **Figur 4.9** nedenfor.



Figur 4.9: Variasjon av total mikrobiota på genusnivå mellom uttak 1-3 for gård 1-20 hhv. fra venstre til høyre med total bakterie mengde vist med ddPCR (kopier DNA per ml) på akse 2. Bakteriene er vist med fargekode på høyre side, i samme rekkefølge som vist i grafen (fra nederst til øverst).

Generelt var det mer *Bacillus* ved uttak 1 enn ved de to siste uttakene. Ser vi bort ifra forskjellen med *Bacillus* fra uttak 1 er det relativt lik mikrobiota i melken på gårdene mellom uttakene. Melk fra gårdene G2-G7, G10-G11 og G13-G18 har relativt lik mikrobiota mellom uttakene, hvor det er spesielt stor likhet mellom to av uttakene. Melk fra gårdene G1, G8, G9, G12, G19 og G20 har alle et eller flere uttak som er forskjellig fra hverandre. Melk fra gård G8 er forskjellige ved alle tre uttakene, med større mengder *Brodetella* i uttak 3. For melk fra gård G12 har også et uttak som har større mengder *Bordetella*. Melk fra gård G9 har et uttak som har større mengder *Acinetobacter*, og dette skiller seg fra de andre to uttakene. Melk fra gård G19 har også større mengder *Acinetobacter* i to av uttakene. Melk fra gård G20 er forskjellige fra hverandre ved hvert uttak.

Artstyper som kan være tilstede ved genus *Bacillus* er vist i **Tabell 4.1**.

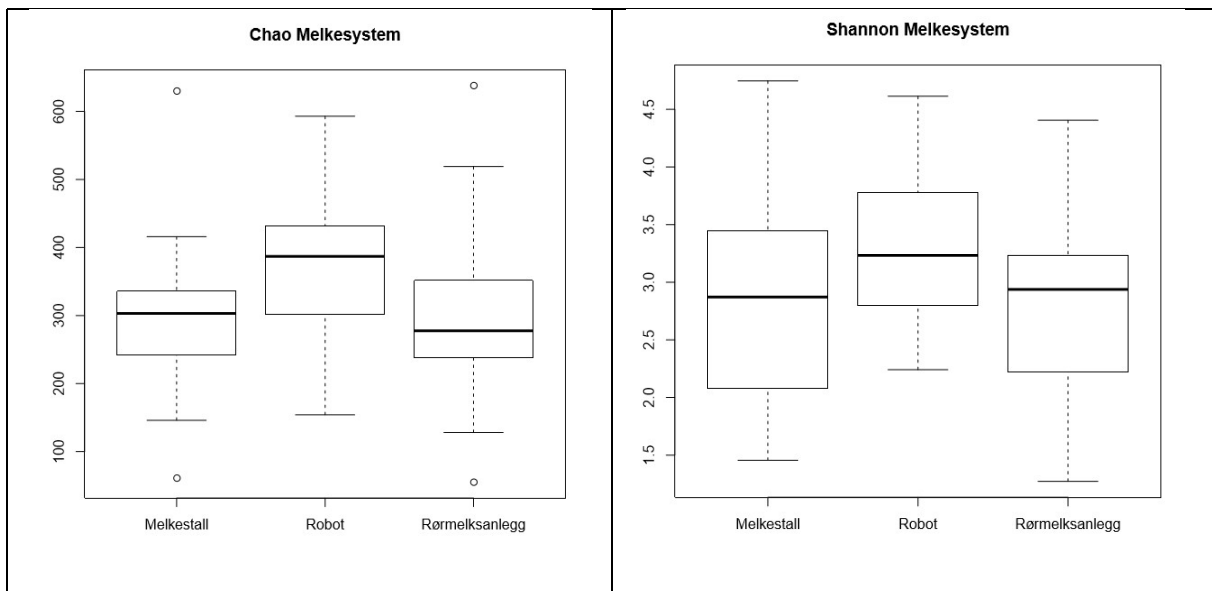
Tabell 4.1: Arter som kan være tilstede ved påvisning av genus *Bacillus*.

Genus	Arter
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. mycoides</i> <i>B. toyonensis</i> <i>B. weihenstephanensis</i>

4.2 Gårdsfaktorer sin påvirkning på mikrobiotaen i melk

Det ble sett på ulike faktorer på gården som potensielt kunne påvirke mikrobiotaen i melken. Type melkesystem (Robot, melkestall eller rørmelksanlegg), type fjøs (bås eller løsdrift), propp på tappestuss, døren inn til fjøset (lukket eller åpen), type vask av gårdstank (automatisk eller manuell), type gårdstank (Landteknikk eller Wedholms) og type fôr (surfôr og kraftfôr, supplering med potet eller supplering med fôrsukkerbeter) (Rådata i **Vedlegg 4**).

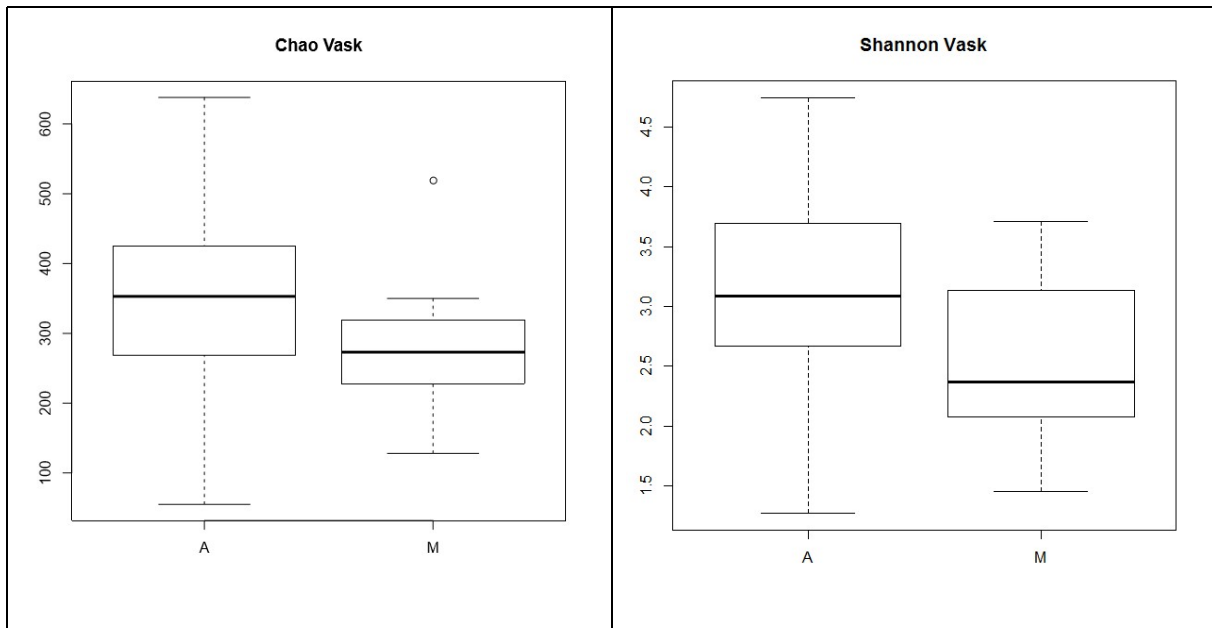
Forskjell i mengde bakterier (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn på ulike typer melkesystem på gård er vist i **Figur 4.10**.



Figur 4.10: Forskjell i mengde bakterier (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn på ulike typer melkesystem, hhv. melkestall, robot og rørmelksanlegg. ANOVA og Tukey multiple comparison test ble brukt som statistisk analyse, $n = 9$ (Melkestall), $n = 27$ (Robot), $n = 24$ (Rørmelksanlegg). P-verdien $> 0,05$, ingen signifikans.

Ved bruk av robotmelking er det større mengde bakterier og større spredning i ulike bakterier i forhold til melkestall og rørmelksanlegg. Det er derimot ikke vist noen signifikant forskjell ved bruk av Tukey multiple comparison test, p -verdi $> 0,05$.

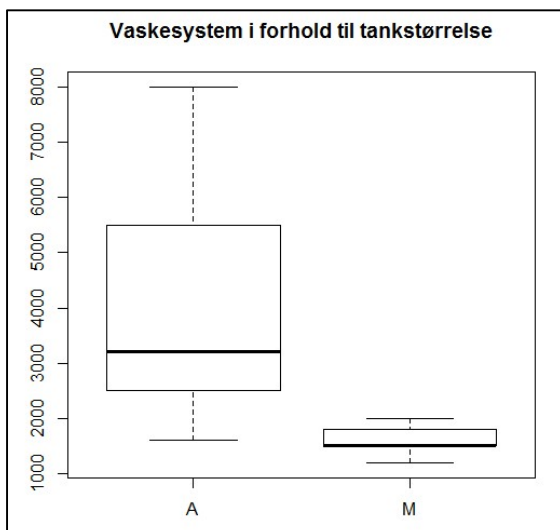
Forskjell mellom bakteriemengde (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn til forskjellige vaskeprosesser på gårdstank er vist i **Figur 4.11**.



Figur 4.11: Forskjell mellom mengde bakterier (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn til forskjellige vaskeprosesser ved gårdstank, hhv. automatisk (A) og manuell (M). ANOVA ble brukt som statistisk analyse, n = 45 (A), n = 15 (M). P-verdi for Chao og Shannon ble hhv., $p < 0,05$ og $p < 0,01$.

Ved forskjellig vaskesystem på gårdstank er det større mengde (Chao) bakterier og større spredning (Shannon) i type bakterier ved bruk av automatisk vask i forhold til manuell vask. Det ble også sett en signifikant forskjell mellom vaskesystemene med $p < 0,05$ for Chao og $0,01$ for Shannon.

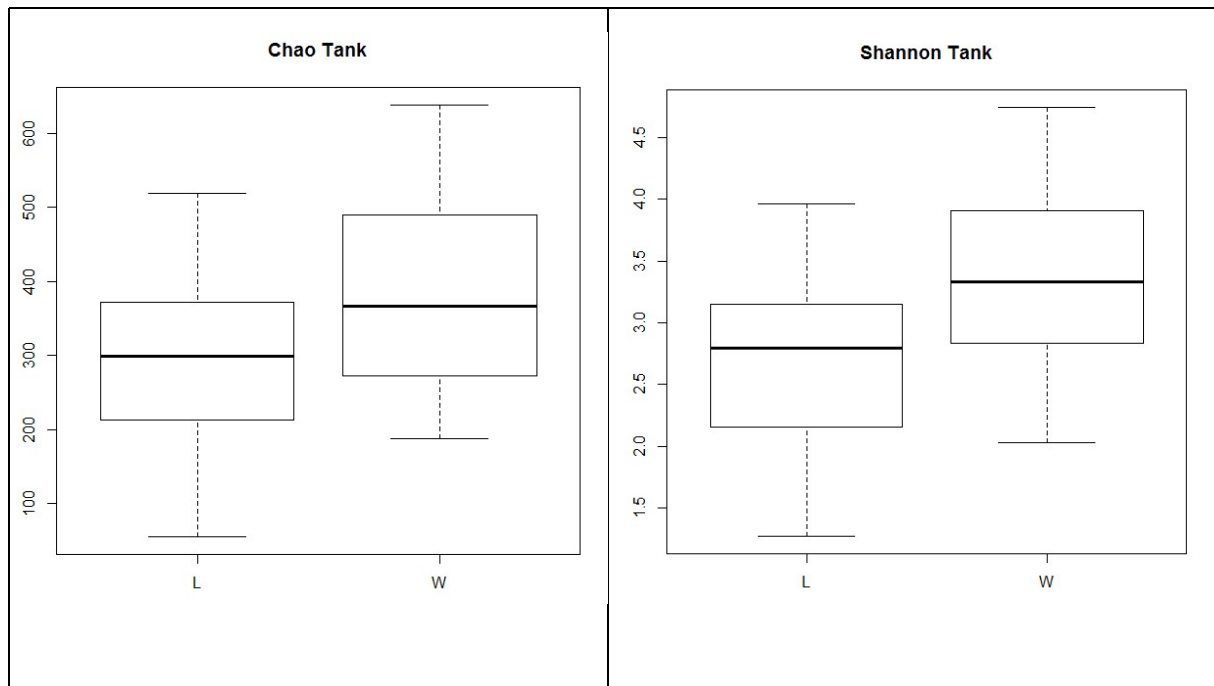
Forskjell på størrelse av gårdstank i forhold til vaskesystem (automatisk eller manuelt) er vist i **Figur 4.12**.



Figur 4.12: Forskjell på størrelse av gårdstank i forhold til vaskesystem (automatisk eller manuelt), med tankvolum (liter) på y-akse. ANOVA ble brukt som statistisk analyse, n = 45 (A), n = 15 (M). P-verdi $< 0,05$.

Ved forskjellig vaskesystem på gårdstank ble det også sett en forskjell i hvor stort volum tankene ved de to ulike vaskesystemene hadde. Ingen tanker med manuell vask hadde større volum på tank enn 2000 L. Det ble sett en signifikant forskjell mellom tankvolumet ved automatisk og manuell vask, hvor minst tankvolum ble sett for manuell vask.

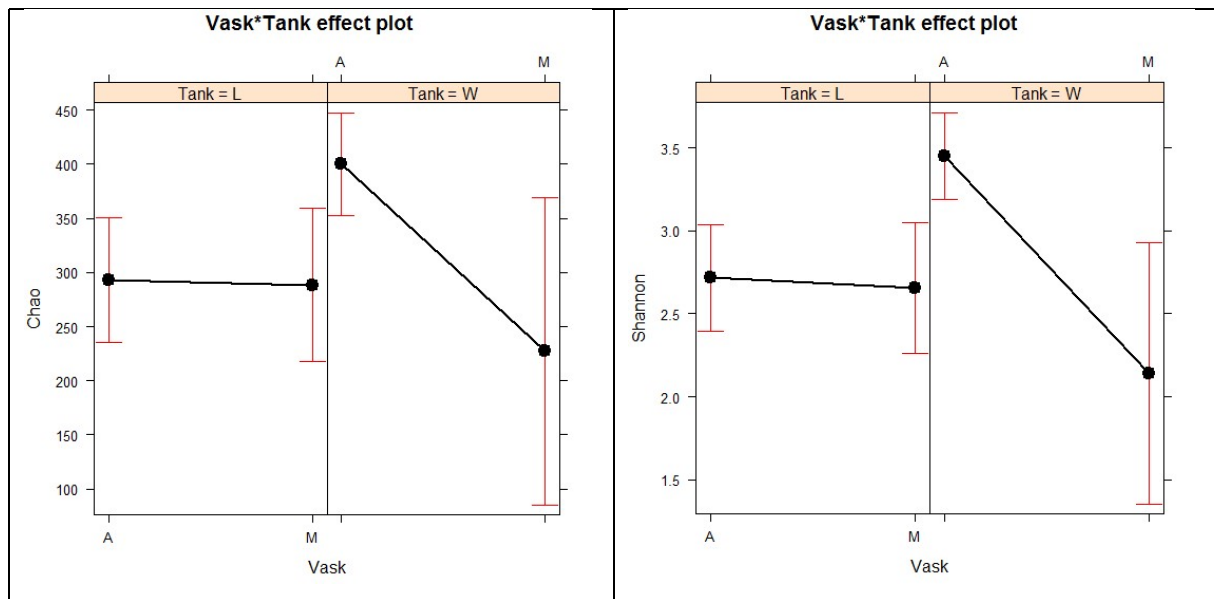
Forskjell mellom bakteriemengde (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn til forskjellige typer gårdstanker (Landteknikk eller Wedholms) er vist i **Figur 4.13**.



Figur 4.13: Forskjell mellom bakterie mengde (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn til forskjellige typer gårdstanker (Landteknikk eller Wedholms). ANOVA ble brukt som statistisk analyse, $n = 30$ (L), $n = 30$ (W). P-verdi $< 0,01$ for Chao og Shannon.

Ved bruk av Landteknikk tank er det lavere bakterieinnhold i melken (Chao) og mindre spredning i type bakterier (Shannon). Det ble også funnet en signifikant forskjell ved bruk av disse to systemene med $p < 0,01$ for både Chao og Shannon. Det ble ikke funnet noen signifikant effekt mellom type tank og hvor mye tankene rommet, p -verdi $> 0,05$.

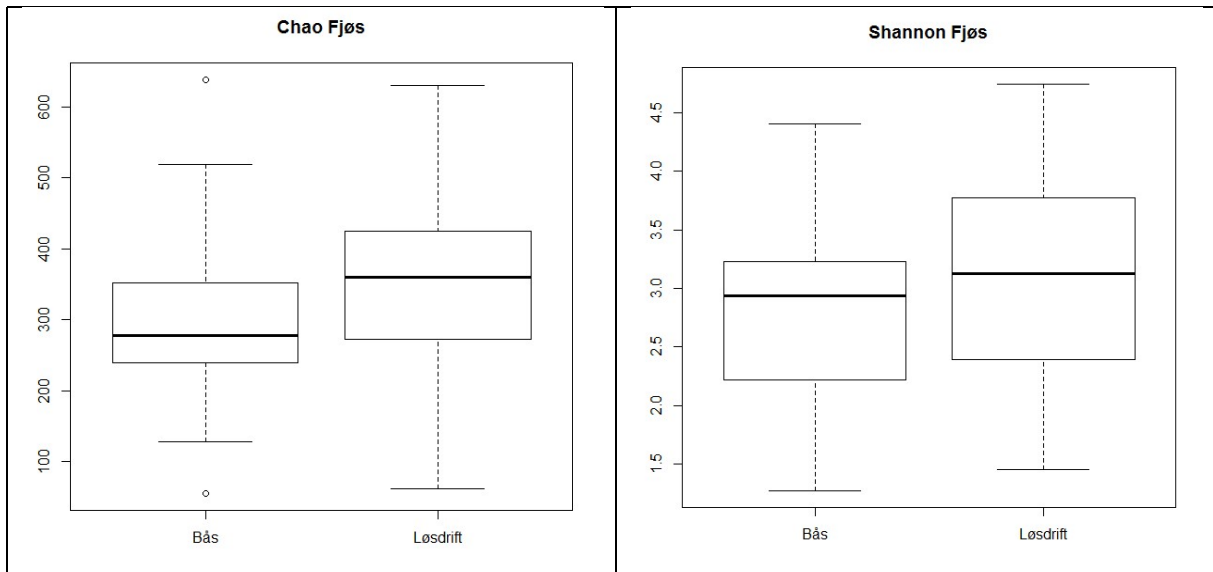
Interaksjonsmodell mellom vask og tanktype i forhold til bakterietall (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) er vist i **Figur 4.14**.



Figur 4.14: Interaksjonsmodell mellom vask (automatisk og manuell) og tanktype (Landteknikk eller Wedholms) i forhold til hhv. bakterie mengde (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) fra venstre til høyre. ANOVA og Tukey multiple comparison test ble brukt som statistisk analyse, $n = 18$ (A:L), $n = 12$ (M:L), $n = 27$ (A:W), $n = 3$ (M:W). P-verdi $> 0,05$ for alle vaskesystem i forhold til type tank foruten om (A:W – A:L), hvor p-verdi $< 0,05$.

Ved tanktype Landteknikk er det relativ lik bakteriemengde (Chao) og spredning i ulike bakterietyper (Shannon) både ved automatisk og manuell vask. For Wedholms er det derimot høyere bakterieantall og høyere spredning i ulike genus av bakterietype ved automatisk vask i forhold til manuell, og i forhold til automatisk og manuell vask ved Landteknikk tank. Det ble ikke sett noen signifikant effekt mellom noen av vaskesystemene i forhold til tanktype foruten om ved automatisk vask på Wedholmstank og automatisk vask Landteknikk tank, hvor $p < 0,05$.

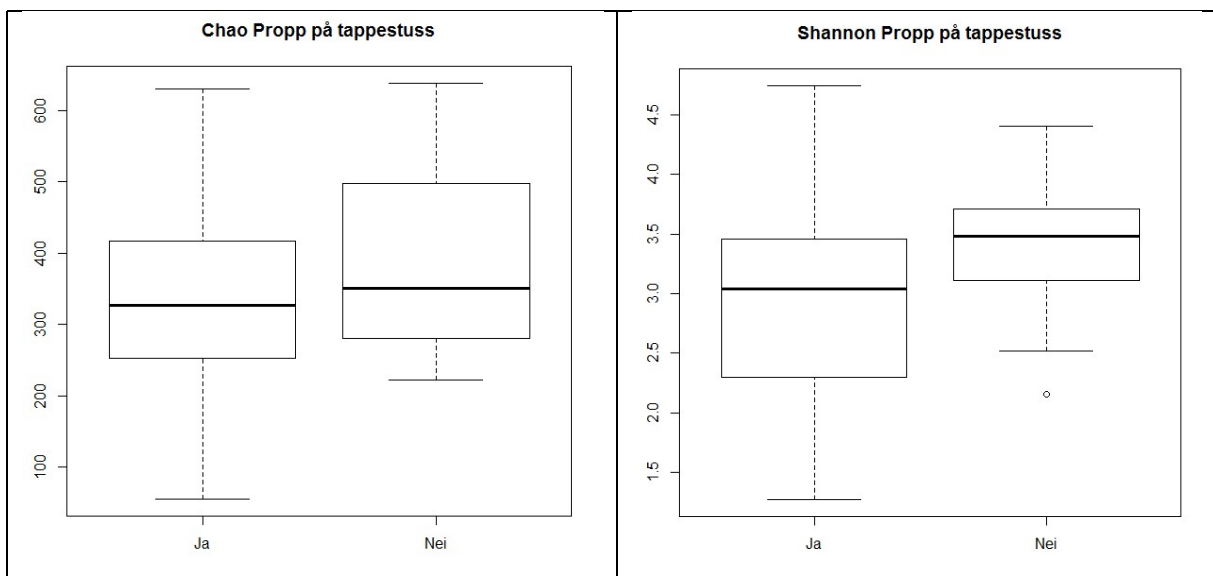
Forskjell mellom mengde bakterier (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn til forskjellige fjøstype (bås eller løsdrift) er vist i **Figur 4.15**.



Figur 4.15: Forskjell mellom mengde bakterier (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn til forskjellige fjøstyper, hhv. bås og løsdrift. ANOVA ble brukt som statistisk analyse, n = 24 (Bås), n = 36 (Løsdrift). P-verdi > 0,05, ingen signifikant forskjell.

Det ble ikke sett noen signifikant forskjell mellom mengde bakterier (Chao) og spredning i type (Shannon) bakterier ved forskjellige fjøstyper, p-verdi > 0,05.

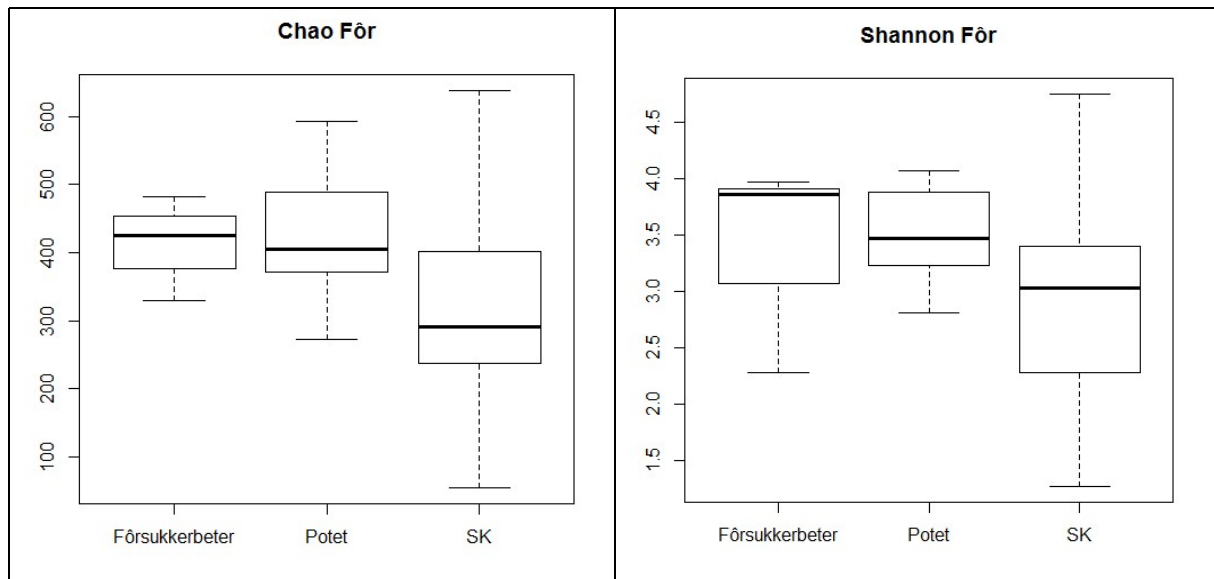
Forskjell mellom mengde bakterier (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn til om proppen på tappestussen på gårdstanken var på før tapping er vist i **Figur 4.16**.



Figur 4.16: Forskjell mellom mengde bakterier (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn til om proppen på tappestussen på gårdstanken var på før tapping. ANOVA ble brukt som statistisk analyse, n = 54 (Ja), n = 6 (Nei). P-verdi > 0,05, ingen signifikant forskjell.

Når tappestussen var av var det en høyere andel bakterier og spredning i type bakterier, men det ble ikke funnet noen signifikant forskjell, p-verdi > 0,05.

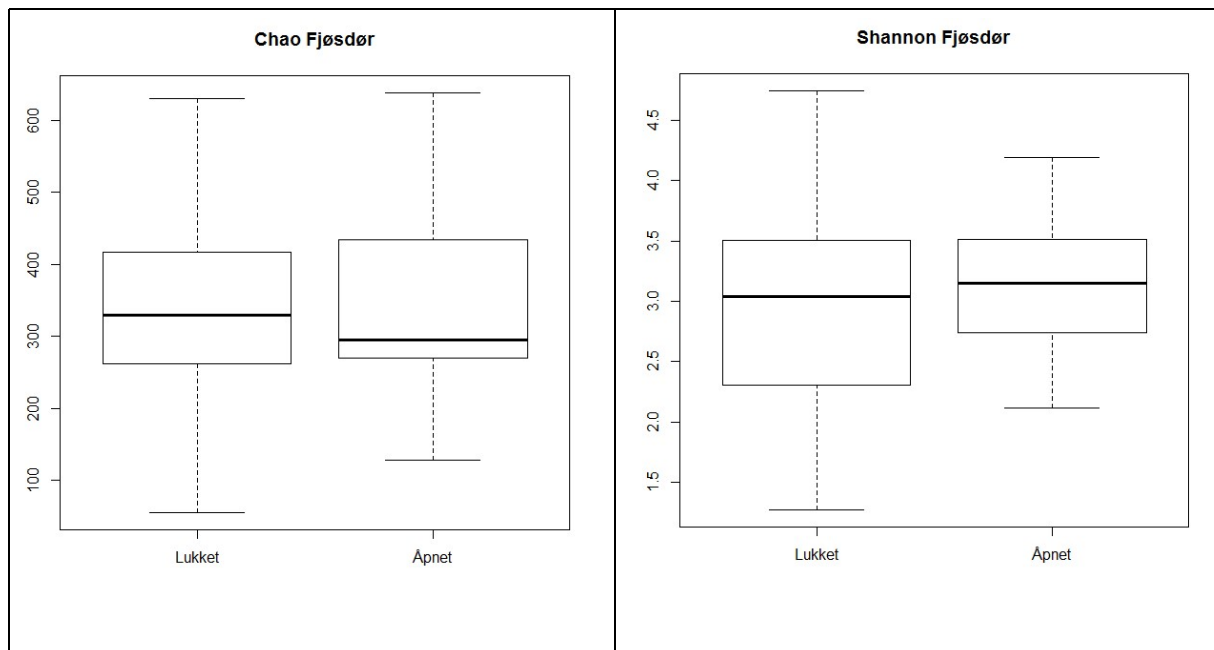
Forskjell mellom mengde bakterier (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn til forskjellig fôring av kyrne på gårdene er vist i **Figur 4.17**.



Figur 4.17: Forskjell mellom mengde bakterier (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn til forskjellig fôring av kyrne på gårdene. Alle gårdene bruker surfôr og kraftfôr (SK), men noen bruker også fôrsukkerbeter eller potet i tillegg til surfôr og kraftfôret. ANOVA og Tukey multiple comparison test ble brukt som statistisk analyse, $n = 3$ (Fôrsukkerbeter), $n = 9$ (Potet), $n = 48$ (SK). P-verdi $< 0,03$ for SK vs. Potet for Chao. Alle andre P-verdier $> 0,05$, ingen signifikant effekt.

Ved ulike supplement til surfôr og kraftfor kan man se større mengde bakterier (Chao) og større spredning (Shannon) i type bakterier ved tilførsel av fôrsukkerbeter eller potet. Det ble kun vist en signifikant forskjell ved supplementring med potet, p-verdi $< 0,05$.

Forskjell mellom mengde bakterier (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn til om døren mellom fjøset og melkerommet var åpen er vist i **Figur 4.18**.



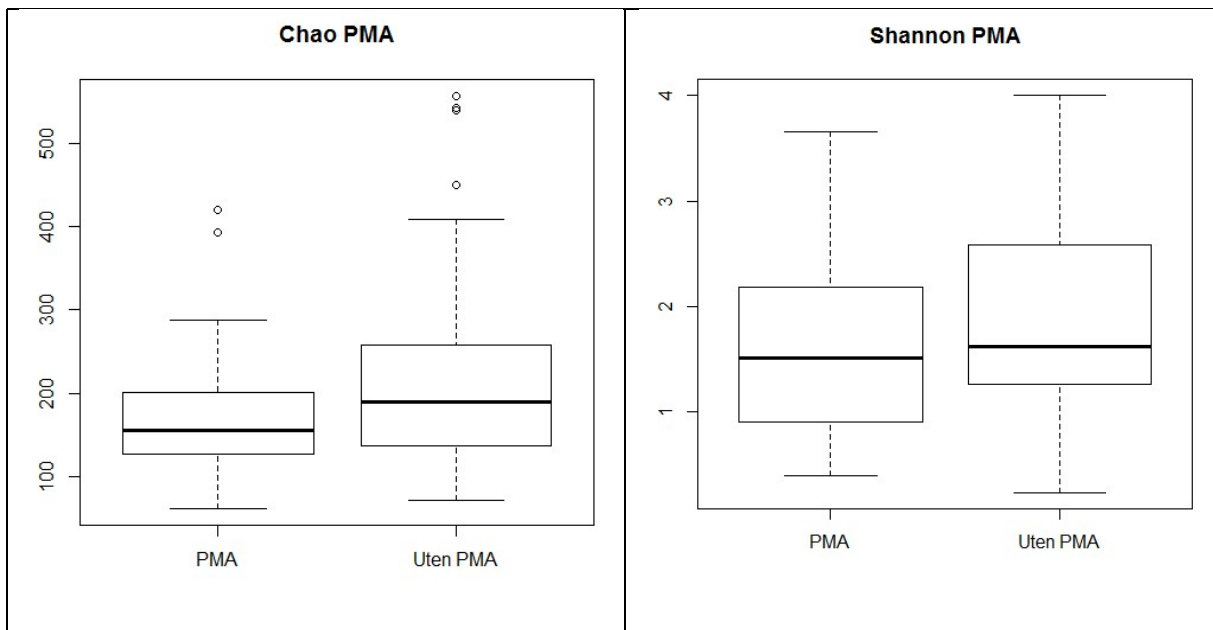
Figur 4.18: Forskjell mellom mengde bakterier (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn til om døren mellom fjøset og melkerommet var åpen. ANOVA ble brukt som statistisk analyse, n = 51 (Lukket), n = 9 (Åpent). P-verdi > 0,05, ingen signifikant forskjell.

Det ble ikke sett noen signifikant forskjell i bakterieinnhold ved åpen eller lukket fjøsdør, p-verdi > 0,05.

Det ble utført ANOVA og Tukey multiple comparison test for de ulike faktorene på gård (melkesystem, fjøstype, vask og tank) opp i mot mengden *Bacillus* og *Pseudomonas* spesifikt (cum sum scaling normalized OTU tabel) på gårdene. Det ble ikke funnet noen signifikant påvirkning av de ulike faktorene på gård opp i mot *Bacillus* eller *Pseudomonas*, alle p-verdiene > 0,05.

4.3 Bruk av PMA for å skille mellom levende og døde celler etter pasteurisering

For å skille mellom døde og levende bakterier etter pasteurisering ble det brukt PMA. Forskjell mellom mengde bakterier (Chao) og spredning i type bakterier (Shannon) med hensyn til bruk av PMA under DNAekstraksjon er vist i **Figur 4.19**.

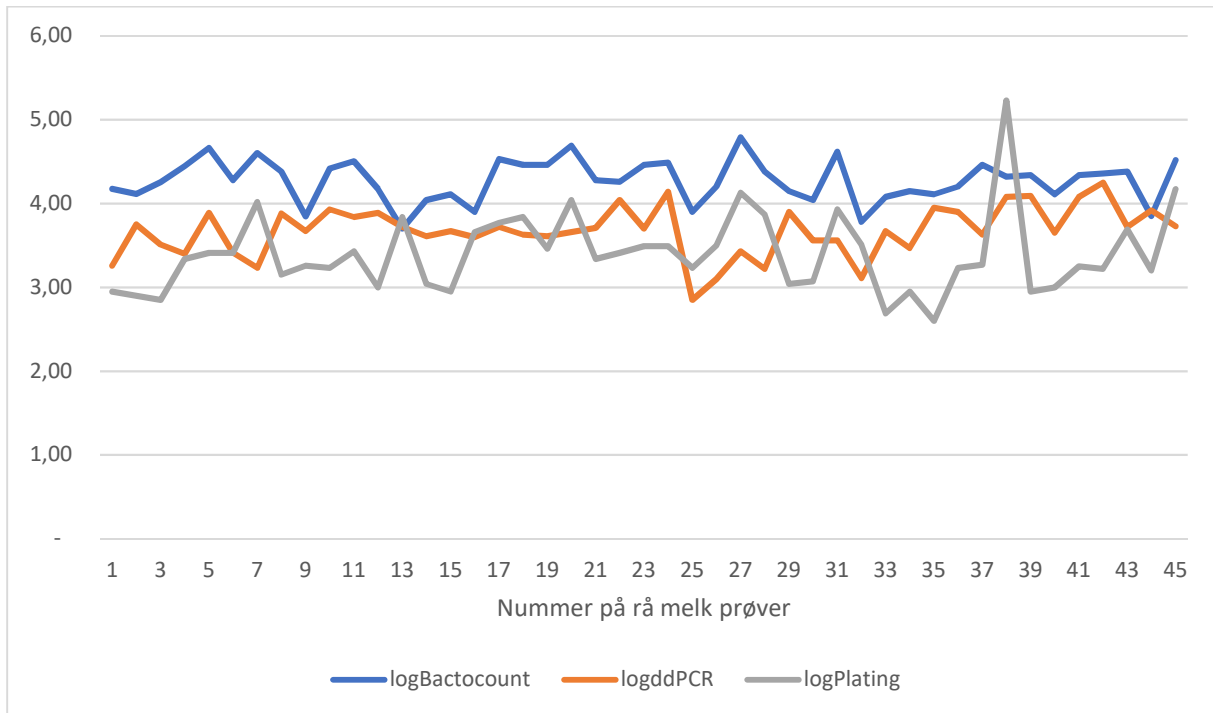


Figur 4.19: Forskjell mellom mengde bakterier (Chao, OTU) og spredning i type bakterier (Shannon, OTU) med hensyn til bruk av PMA under DNAekstraksjon. ANOVA ble brukt som statistisk analyse, $n = 56$ (PMA), $n = 56$ (Uten PMA). P-verdi $< 0,001$ for Chao. Ingen signifikans for Shannon.

Ved bruk av PMA var det forskjell av mengde bakterier (Chao), p-verdi $< 0,001$. Det var ingen signifikant forskjell ved spredning i type bakterier ved bruk av PMA i forhold til uten PMA.

4.4 Metoder for identifisering av totalt bakterietall i gårdsprøver

Det ble sett på korrelasjon mellom de ulike metodene som ble brukt for identifisering av total antall bakterier i gårdsprøvene (Rådata i **Vedlegg 5**). Grafisk sammenligning av total bakteriemengde målt ved ulike metoder er vist i **Figur 4.20**.



Figur 4. 20: Sammenligning av metoder for identifisering av totalt bakterietall i rå melk prøver, hvor Bactocount er vist i log IBC/ml, ddPCR i log kopier/ml og plating i log kde/ml. På x-aksen viser prøvenummeret til rå melk prøvene brukt til identifisering av totalt bakterietall ved de tre ulike metodene. På y-aksen viser den log-antall for de tre ulike metodene.

Størst sammenheng ble funnet mellom plating og Bactocount ettersom reduksjon i bakterietall ved plating tidvis også gir reduksjon i bakterietall ved bactocount, og likt ved økning. Det er fremdeles flere plasser hvor verdiene ikke viser samme trend. Minst sammenheng ser man mellom ddPCR og plating. Disse metodene viser liten til ingen sammenheng ved økning og reduksjon av bakterietall. Ved sammenligning av bactocount og ddPCR ser man at det er lite sammenheng ved økning og reduksjon av bakterietall, men tidvis er det en og annen prøve som samsvarer.

En korrelasjonsmodell ble brukt for å se om det ble observert en korrelasjon mellom de tre ulike metodene som ble brukt (ddPCR, Bactocount og plating). **Tabell 4.2** viser korrelasjonen mellom de ulike metodene (**Vedlegg 3**).

Tabell 4.2: Korrelasjon mellom ddPCR, Bactocount og plating.

	ddPCR	Bactocount	Plating
ddPCR	1	0,1548	-0,0588
Bactocount		1	0,4022
Plating			1

Det er liten korrelasjon mellom alle de tre metodene. Minst korrelasjon er det mellom plating og ddPCR, deretter ddPCR og Bactocount og størst korrelasjon er det mellom plating og Bactocount.

5. Diskusjon

5.1 Praktiske hensyn

Ved uttak av prøver i forbindelse med pågående produksjon på meieri er det utfordringer med logistikk av melken. Prøveuttaket bærer dermed preg av at det var vanskelig å få all melken fra den fulgte ruten inn på samme silotank uten blanding med annen melk. Uttakene ble dermed ikke like, hvor uttak 1 og 2 har en silo med ublandet melk og en silo med blandet melk, mens uttak 3 har all melken på en silo uten blanding med annen melk. Melkebilen kjørte heller ikke i samme rekkefølge ved de tre uttakene, det ble derfor melk fra forskjellige gårder inn på forskjellige lass ved de tre uttakene. Det er dermed ikke mulig å bruke uttakene som tre paralleller, men heller sammenligne prøvene og se om det er likheter og forskjeller på kryss av uttakene.

Bakteriologiske undersøkelser av flere bidragsyttere til kontaminasjon av *Bacillus* til melken, som fôr og vannprøver, lot seg ikke utføre på grunn av logistikkproblem. Besøk av fjøs for kontroll av hygiene var heller ikke mulig på grunn av begrenset tid ved hver gård, ettersom man fulgte tankbilen rundt på gårdene, og også på grunn av smittefare. Slike besøk må derfor foretas separat.

Melkeprøvene ble satt på kjølerom (4 °C) til morgenen etter uttak for å sikre bedre utførelse ved tillaging av pellet. For holdbarhetsprøver fra uttak 3 ble det tillaget pellet, men ettersom siste uttak ble tatt ut sent, var det ikke tid til å få ekstrahert DNA og sekvensert disse prøvene for å få resultatet med i denne oppgaven. Dette arbeidet ble gjort i etterkant.

Det ble kun tatt ut en prøve ved hvert prøveuttak for utenom kartong hvor det ble tatt tre paralleller) på grunn av plassproblem på bil ved transport dersom det ble tatt ut flere prøver av hver leverandør. Dersom det da blir gjort noe feil under tillaging av pellet og DNA ekstraksjon er det ikke mulig å starte på nytt. Ved prøve L1.U1 og L1.U2 ble det gjort en feil under plassering på 96-brønnplate for DNA ekstraksjon. Resterende volum fra pellet ble tilført på platen, men da noe mindre enn 50 µl, som det var av de andre prøvene. Det ble derfor et lavere bakterieantall med ddPCR i disse lassprøvene enn hva man skulle forvente.

5.2 Mikrobiota i rå og pasteurisert melk

Ved bruk av totalsekvensering med universelle primere ble det funnet flere forskjellige bakterier i melken. Som nevnt i seksjon 4.1 var det til tider mest *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus* og *Streptococcus* i rå melk fra gårdene. Når det kommer til *Lactococcus*, *Streptococcus* og *Pseudomonas* er funn i denne studien i tråd med funn gjort i studiene nevnt innledningsvis som viser total mikrobiota av rå melk ved bruk av kultur-uavhengige metoder (Quigley et al., 2013b, Raats et al., 2011). Store mengder *Bacillus* på gård har tidligere blitt assosiert med beitesesong ved bruk av plating og typing med PCR som metoder (Christiansson et al., 1999). Fôr har også vist seg å være en kontaminasjonsfaktor for sporer av *Bacillus* (te Giffel et al., 2002). Ut i fra at alle gårdene hadde større mengder *Bacillus* ved første uttak kan det tyde på at det er en felles faktor for regionen melken ble hentet fra. Det var høyest temperatur et par dager før første uttak (9,4 °C), mens for uttak 2 og 3 var høyeste temperaturen dagene før på henholdsvis - 2,7 og 5,2 °C (Yr.no, 2017). Det er mulig at den høye temperaturen dagene før uttak 1 ga en oppblomstring av *Bacillus* i silofôret. I følge rådgiver fra Tine blir det ikke gjort noen rutinemessig spesialvask av gårdstank i starten av året (i forkant av første uttaket) (Pers. med Julie Wiik, 2017). Spesialvask av gårdstankene blir gjort ved behov. Det er da lite sannsynlig at det ble gjort spesial vask ved alle gårdene samtidig og dermed at løsnings av biofilm kan være en kontaminasjonskilde for *Bacillus* ved alle gårdene (Latorre et al., 2010). Vannforsyningen kan være felles for gårdene ettersom de er i samme område. En rapport fra Folkehelseinstituttet sin avdeling for vannhygiene viste at *Bacillus*-sporer kan kunne passere desinfiseringen gjort ved vannverket (Lund, 2005). Selv om desinfiseringsrutinene kan ha endret seg etter denne rapporten gjort i 2005, kan det være *Bacillus* i biofilm i rørsystemet, ettersom *Bacillus* har evnen til å danne biofilm i slike system. *Bacillus* har større biofilmdannelsesevne til kobberør i forhold til PVC-rør (Morrow et al., 2008). Dersom vannkilden er den samme for gårdene, desinfiseringen ikke er endret på vannverket eller at biofilm har løsnet fra rørsystemet, så kan vannkilden være en mulig årsak til den høye andelen *Bacillus* i rå melk. Det er mulig, ved en senere anledning, å se nærmere på vannforsyningen til gårdene. Da bør det bli kartlagt type vannkilde (overflatevann eller grunnvann) (FHI, 2016).

Flere patogene bakterier har blitt funnet i rå melk (Hayes and Boor, 2001). Det var også forekomst av andre patogene bakterier i rå melk fra gårdene enn *Bacillus*, både *Stahylococcus* (Lowy 1998, Jørgensen et al., 2005), *Acinetobacter* (Peleg et al., 2008, Zhang et al., 2015, Munoz-Price and Weinstein 2008), *Bordetella* (Mattoo and Cherry, 2005), *Stenotropomonas* (Zhang et al., 2015, Denton and Kerr, 1998), *Streptococcus* (Zhang et al., 2015, Stevens, 1992), *Corynebacterium* (Bostock et al., 1984), og *Clostridium* (Andersson et al., 1995) ble funnet.

Ingen av de overnevnte patogene bakteriene var dominerende i rå melk, for utenom *Bacillus* og et par tilfeller av *Acinetobacter* og *Bordetella*. De var heller ikke tilstede i pasteurisert melk, for utenom *Bacillus* og et tilfelle av *Bordetella* på kartong. *Bordetella* ble derimot ikke funnet ved utgått holdbarhet i noen av melkeprøvene. Det er altså viktig å pasteurisere rå melk for å få eliminert patogene bakterier. *Bacillus* er da den eneste potensielt patogene bakterien, funnet i denne oppgaven, som har mulighet for å dominere i pasteurisert melk ved utgått holdbarhet.

Som nevnt innledningsvis (seksjon 1.1.2 og 1.2) så er *Bacillus* et stort problem for holdbarheten på melk på grunn av flere kvalitetsforringende faktorer som søt koagulering, fettakkumulering, bismak og mulig matforgiftningsfare (Andersson et al., 1995, Lücking et al., 2013, Billing and Cuthbert, 1958, Stone and Rowlands, 2009, Shipe et al., 1978, Arnesen et al., 2008, Granum, 2007). I tillegg til en stor andel *Bacillus*, var det også en stor andel *Pseudomonas* i flere av prøvene, også ved utgått holdbarhet. Denne bakteriegruppen har også evnen til å forringe melken ved dens produksjon av kvalitetsforringende enzymer (Raats et al., 2011, Dogan and Boor, 2003). En årsak til at melken ved gård hadde store nivåer med *Pseudomonas* kan være fordi melken var opp til tre dager gammel. Som nevnt innledningsvis, så er *Pseudomonas* en psykrotrof bakterie som vokser godt ved lave temperaturer, slik som på gårdstank (Raats et al., 2011).

Mikrobiota ved utgått holdbarhet blir sterkt påvirket av rå melk kvalitet og lagringstemperatur (Schmidt et al., 2012). Lagringstemperaturen påvirket det mikrobielle innholdet i melken ved utgått holdbarhet. Melken lagret ved 4 og 6 °C hadde relativt lik mikrobiota ved alle holdbarhetsprøvene, hvor *Pseudomonas* og *Bacillus* dominerte mikrobiotaen. *Pseudomonas* var den mest dominerende bakterien i alle melkeprøvene ved 4 og 6 °C. Det ble også funnet en direkte sammenheng mellom rå melk kvalitet og mikrobiota ved utgått holdbarhet ved silo 1 ved uttak 1 og 2, hvor melken fra de fulgte gårdene ikke var blandet med melk fra andre

gårder. Mest vekst av *Bacillus* i lagret melk ved 4 og 6 °C ble funnet ved de uttakene der det var mest *Bacillus* i rå melk fra gårdene (Uttak 1 silo 1 Ublandet). Mindre *Bacillus* i rå melk fra gårdene ga mindre *Bacillus* ved utgått holdbarhet ved lagring ved 4 og 6 °C (uttak 2 silo 1 ublandet). Ettersom melken her ikke var blandet med annen melk var det lettere å se en klar sammenheng mellom rå melk kvaliteten og innholdet i melk ved utgått holdbarhet. For melk fra silo 2 ved uttak 1 og 2 var det derimot vanskeligere å se sammenhengen mellom rå melk kvalitet og mikrobiota i melk ved utgått holdbarhet ettersom disse siloene var blandet med melk fra andre ruter. Som nevnt i seksjon 5.1, så burde det bli tatt med lassprøver fra tankbilene til blandingsmelken slik at det blir mulig å si noe om bakteriefloraen fra disse andre rutene.

Det ble funnet en dominerende *Bacillus*-flora i melken lagret ved 8 °C. Veksten av bakterier ved lagring av melk på 8 °C var også høyere enn lagring ved 4 og 6 °C, med opptil 2 log. Ved uttak 1 på silo 2 var det derimot en dominerende flora av *Pseudomonas* ved alle tre lagringstemperaturene av den pasteuriserte melken på kartong, men her var også totalt antall bakterier lavt. På denne silotanken ble det også blandet inn melk i fra andre gårder fra andre ruter. Mengden *Bacillus* på silo tank var lav, noe som kan tyde på at det var lite *Bacillus* på de andre rutene som ble tappet inn på samme silo. Totalt volum av melk fra den fulgte ruten inn på silotanken var 51,3 %. Det er dermed mulig at det var lite *Bacillus* i melken fra de andre gårdene og at man fikk en fortykningseffekt inn på silo. Med en fortykning av sporeinnholdet blir det mindre sannsynlighet for å få sporer over i melken på alle kartongene.

Det var generelt lavere bakterieinnhold ved melk lagret ved 4 og 6 °C i forhold til 8 °C og veksten av *Bacillus* var også betydelig lavere. Som nevnt innledningsvis i seksjon 1.2 så er det den enterotoksinproduserende *Bacillus* som er et problem for meieriindustrien (Granum, 2007). Denne typen forårsaker sykdom ved toksinproduksjon under vekst i tarmen. For at nok bakterier skal kunne overleve magesyren til å kunne oppformere seg i tarmen er det funnet at man må opp i verdier på 10^5 - 10^7 bakterier totalt konsumert (Arnesen et al., 2008, Granum, 2007).

Ettersom universelle primere for amplifisering av V3 og V4 ble brukt var det ikke mulig å differensiere alle bakteriene ned på artsnivå (Edwards et al., 2012). For *Bacillus* er det flere arter som kan ha vært tilstede. Artene som kunne ha vært tilstede ved sekvenseringen i denne oppgaven var *B. cereus*, *B. mycoides* og *B. weihenstephanensis*. Disse artene er alle kjente

bakterier innenfor *B. cereus*-gruppen (Arnesen et al., 2008, Lechner et al., 1998, Bartoszewicz et al., 2008). *B. mycooides* og *B. weihenstephanensis* er begge psykrotrofe bakterier, mens *B. cereus* er av den mesofile typen. Alle tre har blitt isolert fra melk, men ettersom det har blitt observert en betydelig større inhibering av proteinsyntese hos mesofile *B. cereus* i forhold til psykrotrofe *B. weihenstephanensis* ved kuldesjokk av bakteriene, kan man si at det er større sannsynlighet for fremvekst av psykrotrofe *Bacillus* ved lave temperaturer (Prüß et al., 1999). Man kan derfor anta at ved lagring ved 4, 6 og 8 °C vil *B. mycooides* og/eller *B. weihenstephanensis* være dominerende ved de to laveste temperaturene.

Det er altså sannsynlig at *B. weihenstephanensis* er en av de dominerende *Bacillus*-artene i melken ettersom den vokser ved lave temperaturer og kan vokse ned til 4 °C. Denne *Bacillus*-typen har vist seg å kunne produsere en eller flere toksin (Nhe, Hbl og Cyt K). De har da muligheten til å forårsake matforgiftning ved at et høyt antall bakterier, eller sporer, er tilstede i maten. Er det nok celler/sporer til at noen overlever magesyren og kommer videre til tarmen, kan de kolonisere og starter produksjon av toksiner som fører til matforgiftning (Stenfors et al., 2002). Ved 4 og 6 °C var det ikke stor nok andel av *Bacillus* i melken til at det ville utgjøre et stort matforgiftningspotensiale. Det totale bakterietallet var relativt lavt, og andelen *Bacillus* var heller ikke stor. Ved 8 °C derimot, utgjorde *Bacillus* store deler av mikrobiota i melken, og antall bakterier var også høyere. Det er da større sannsynlighet for matforgiftning. Det må derimot sies at verdiene for total bakteriemengde ved utgått holdbarhet i denne oppgaven blir oppgitt i kopier/ml (ddPCR), og er nødvendigvis ikke et tall for eksakt mengde bakterieceller i en prøve. ddPCR oppformerer 16s rRNA gen fra genomet til bakteriene i prøvene. Det kan være flere 16S rRNA operon i samme bakterie (Acinas et al., 2004). For å kjøre ddPCR må man først få ekstrahert DNA fra melkerprøven. I løpet av ekstraheringen og kjøring av ddPCR er det flere plasser hvor DNA kan gå tap. Selv om det i utgangspunktet skal gi et tall for total antall bakterier i en prøve vil det ikke kunne gi mer enn en indikasjon på den totale bakteriemengden. Denne metoden ble valgt til fremvisning av total bakterietall i denne oppgaven ettersom den ga data for alle prøvene. Bactocount på melkemottaket er kun kalibrert for rå melk og utplating kan til tider gi overvekst eller utelleglige kolonier ved for liten eller for stor fortyning av prøvene. Det ble også brukt samme primere for amplifisering av 16s rRNA og Illumina sekvenseringen. Man får dermed det samme DNAet som man får ut ved sekvenseringen.

Ettersom det var mye større mengde *Bacillus* i melk ved 8 °C kontra ved 4 og 6 °C kan man si at det er viktig å opprettholde kjølekjeden vi har i Norge ved 4 °C. Det reduserer kvalitetsforringing og matforgiftningsfare ettersom man får mindre vekst av *Bacillus* ved lavere temperaturer.

5.3 Mikrobiell påvirkning fra gård, tankbil og meieriutstyr

Som nevnt innledningsvis (seksjon 1.3) er det flere faktorer på gård og meieri som kan påvirke den mikrobielle kvaliteten på melken. Faktorer ved gård som har vist en effekt for mikrobiotaen i melk er som nevnt ovenfor; jurkanal, overflaten på juret, miljø og luft på gården, fôret, vannforsyning, generell hygiene på gård og løsdrift eller bås fjøs (Braem et al., 2012, Vacheyrou et al., 2011, te Giffel et al., 2002, Quigley et al., 2013a). På meieriutstyr kan det forekomme adhesjon av bakterier og danning av biofilm til overflaten. Dette kan kontaminere melken som kommer i kontakt med det forurensede meieriutstyret (Andersson et al., 1995, Flint et al., 1997).

5.3.1 Mikrobiell påvirkning fra gård

I denne oppgaven ble det sett på følgende faktorer på gård som kunne være bidragsyttere til den mikrobielle floraen i melken: Melkesystem på gård, fjøstype, vask av gårdstank, type gårdstank, fôrsupplement (potet og fôrsukkerbeter i tillegg til surfôr og kraftfôr), propp på tappestuss før pumping av melk og om fjøsdøren var åpen inn til melkerommet. Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell ved bruk av forskjellige melkesystem på gården. Boxplot kunne derimot indikere at det var en høyere andel bakterier og spredning i type bakterier ved robot som melkesystem i forhold til rørmelkssystem og melkestall.

Som nevnt ovenfor har det tidligere blitt vist større innhold av mikrobiota fra gårdsomgivelser ved bruk av bås fjøs i forhold til løsdrift (Vacheyrou et al., 2011). I denne oppgaven ble det ikke funnet noen signifikant forskjell mellom de to fjøstypene. Fraværet av signifikant forskjell mellom fjøstypene kan henge sammen med at det kun ble sett på innhold og spredning i type bakterier. Dette kan til tider være relativt likt på tvers av gårdene, som vist i **Figur 4.9**. Det ble ikke tatt miljøprøver på gård og det var dermed ikke mulig å se sammenheng med gårdflora mellom fjøstypene.

Hvilket fôr som blir brukt kan (som nevnt ovenfor) spille inn på mikrobiota i melken. Det ble sett på tilførsel av supplementer (potet og fôrsukkerbeter) til surfôr og kraftfôr, og om disse supplementene hadde en innvirkning på bakterieinnholdet i melken. Det ble funnet en signifikant forskjell ved tilførsel av potet til fôret, hvor antall bakterier var høynet i melken. Ved tilførsel av poteter tilføres gjerne flere bakterier og sporer dersom potetene ikke er vasket og inneholder endel jord. Ved tidligere studier er det funnet forskjell i bakterieinnhold ved fôring med potet (Wright et al., 2007). Det ble ikke funnet noen signifikant effekt på bakteriemengde eller spredning i bakterie type ved tilførsel av fôrsukkerbeter til surfôr og kraftfôr kontra ingen supplement. Boxplottet viste derimot større bakterietall og større spredning i type bakterier ved tilførsel av fôrsukkerbeter. Det er derimot få gårder som brukte fôrsukkerbeter, som gjør at datasettet ble ubalansert. Et ubalansert datasett kan påvirke p-verdi til å vise $p > 0,05$, ettersom det er for få viste parametere til å konkludere med at det er en forskjell som ikke er tilfeldig. Ved prosjektet FeedMileage ved NMBU og det nye forskningssett «Foods of Norway» (Bordin, 2016, NMBU, u.å.) blir det sett på fôr til husdyr, der i blant også til melkekyr. Ved implementering av nytt fôr bør det også bli tatt hensyn til dens bidragsytende effekt på den mikrobielle sammensetningen i rå melk på gård som kan forårsake forringende egenskaper på melkeprodukt.

Det var signifikant forskjell i mikrobiota avhengig av hvilket vaskesystem som var på gårdstankene (automatisk eller manuell), hvor det var større mengde og diversitet av bakterier ved automatisk vask enn ved manuell vask. Ved automatisk vask blir vasken satt på automatisk etter tankbilsjåføren har vært for å hente melk. Hvordan manuell vask blir gjort kan variere fra gård til gård. Enkelte plasser blir det koblet til en vaskeautomat som fungerer som en CIP-vask på tanken, men på andre gårdstanker blir vaskevannet og såpen helt oppi for hånd (Pers.med Roger Skau, 2017). Ved manuell vask ble det funnet at tankene var av mindre volum (opp til 2000 L) enn med automatisk vask (fra 2000 til 8000L). Det er dermed mulig at det blir vanskeligere å få vasket så store tanker like godt som de mindre tankene, og at det dermed er størrelsen på tanken som er det avgjørende, ikke om vasken er satt på automatisk eller manuelt. Det ble også funnet en signifikant forskjell på bakterieinnhold og diversitet mellom de to ulike tanktypene, Wedholms og Landteknikk. En interaksjonsmodell ble laget for å se om disse to faktorene, vaskesystem og tanktype, hadde en påvirkning på hverandre. Interaksjonsmodellen viste at det var signifikant større mengde bakterier ved automatisk vask

i Wedholmstank enn ved automatisk vask i Landteknikkstank. Dette tyder på at det er forskjellen mellom den automatiske vasken ved de to tanktypene som påvirket den signifikante forskjellen mellom typer vask. Dette fordi både automatisk og manuell vask ved Landteknikkstanker var like. Manuell vask av Wedholmstanker var vanskelig å si noe om ettersom datasettet er ubalansert og at det her er kun tre verdier å sammenligne med. I følge gårdstankteknikker, Roger Skau, er Wedholms og Landteknikkstanker bygget opp likt. For spredning av vann i tanken blir det bygget opp trykk som via en spredde fordeler vannet rundt i tanken. Det er derimot forskjellige spredere i disse to tankene (Pers. med Roger Skau, 2017). Forskjellige spredere for vannet kan være en faktor som spiller inn ved at vannet ikke blir skikkelig fordelt i tanken og at det dermed vil kunne påvirke vaskeresultatet. Dette kan resultere i at en større mengde bakterier blir igjen etter vask og kan dermed bli overført fra tank til melk. Det kan selvfølgelig også være andre faktorer som spiller inn, som hvilken temperatur som blir brukt under vask, vaskemidler og konsentrasjon av vaskemidler (Elmoslemany et al., 2009). Her er det mulig å se nærmere på forskjeller og likheter på melkerommet på gårdene.

Ut i fra boxplot for propp på tappestuss ser man at det er større bakteriemengde når proppen var av i forhold til om proppen var på før tapping av melk. Det ble derimot ikke vist noen signifikant forskjell om proppen var av eller på. Likevell er det viktig å holde tappestussen tildekket mellom henting av melk. Under gårdsbesøk for å hente melk ble det observert en katt på melkerommet ved den ene gården, ved alle tre uttakene. Katter (og andre dyr som gårdsdyr) kan være bærer av den sykdomsfremkallende bakterien *Bordetella* (Register et al., 2012). Gården hvor katten ble observert hadde ikke *Bordetella* i gårdsmelken, det ble derimot observert *Bordetella* i to andre gårdsprøver (G8.U3 og G12.U2), hvor en av gårdene hadde proppen av før melken ble hentet. Katt kan være en kilde for *Bordetella*-kontaminasjon av rå melk, men andre dyr og gårdsdyr kan også være bærer av denne bakterien (Register et al., 2012). Det er også større risiko for at andre skadedyr kan komme inn i tanken dersom tappestussen ikke er dekket til. Om fjøsdøren var åpen eller lukket inn til melkerommet hadde heller ingen signifikant forskjell for bakterieinnholdet i prøvene. Det er derimot viktig å holde den lukket for å slippe å få fluer og andre skadedyr inn på melkerommet.

Felles for alle faktorene på gård (utenom type gårdstank) er at datasettet er ubalansert. Det blir det ettersom det ikke er mulig å styre hvor mange av de forskjellige faktorene som skal

forekomme på ruten som blir fulgt. Det ubalanserte datasettet kan dermed påvirke de statistiske testene utført i denne oppgaven.

Ingen av faktorene på gårdene (melkesystem, fjøs, førsupplement, tank og type vask) ga signifikant påvirkning på mengden *Bacillus*. Disse faktorene er dermed ikke en kilde for direkte kontaminasjon av *Bacillus*.

5.3.2 Mikrobiell påvirkning under transport og meieriutstyr

Som nevnt innledningsvis (seksjon 1.3) har meieriutstyret en mulig innvirkning på mikrobiotaen i melken. Ved adhesjon av bakterier eller biofilmdannelse til overflaten av meieriutstyret, som kommer i kontakt med melken under prosessering, kan det forekomme kontaminasjon av melken (Andersson et al., 1995, Flint et al., 1997).

Det ble observert en oppblomstring av *Aeribacillus* og *Anoxybacillus* i melk fra ferdigvaretanken etter pasteurisering av melken ved uttak 2 på silo 1. *Aeribacillus* og *Anoxybacillus* var i liten grad tilstede i rå melk fra gårdene og i silotank. Disse termofile basilliene har også evne til å danne biofilm (Burgess et al., 2009, Kilic et al., 2017, Caspers et al., 2013). Det ble heller ikke sett noen reduksjon i antall bakterier etter pasteurisering. Det er dermed sannsynlig at det har skjedd en kontaminasjon av melken ved løsning av biofilm eller adherte bakterier fra meieriutstyret. *Anoxybacillus* har evnen til å danne biofilm ved 55 og 60 °C, men ikke ved 48 °C (Burgess et al., 2009). Det kan dermed tyde på at pasteuren var kilden til den løsnede biofilmen.

Biofilm kan også være en mulig kilde til kontaminasjon av melken ved transport av melk på tankbil. Det ble observert forskjell mellom melk inn på tankbil (gårdsprøver) og melk ut fra tankbil ved leveranser på meieriet (lassprøve). Det ble observert en større andel *Pseudomonas* ved to av lassene på uttak 1 og større andel av *Bacillus* ved lass 3 på uttak 1 og 2. Både *Bacillus* og *Pseudomonas* kan danne biofilm (Kilic et al., 2017, Lindsay et al., 2002) og som nevnt i seksjon 1.3.1, så er *Bacillus* en dominerende biofilmdanner i meierianlegg. Det er dermed mulig at det har blitt dannet biofilm til overflaten i tankbilen som har løsnet under transport og kontaminert melken.

5.4 Metoder for identifisering av totalt bakterietall og differensiering av døde og levende celler (PMA-behandling)

Det ble funnet liten korrelasjon mellom de ulike metodene som ble brukt for å bestemme totalt bakterietall i rå melk prøver fra gård. Størst korrelasjon ble funnet mellom Bactocount og plating. Disse metodene skal i utgangspunktet ha en god korrelasjon på opp mot $r = 0,91$ som er vist for andre studier som har gjort korrelasjonstest mellom strømningsytometer og plating (Bentley, 2012, Gunasekera et al., 2000, Bunthof and Abee, 2002). Minst korrelasjon var det mellom ddPCR og plating og deretter mellom ddPCR og Bactocount. Ved tillaging av prøver til ddPCR er det flere plasser hvor DNA kan gå tapt og dermed vil man få mindre mengde kopier/ml i den endelige prøven. Som nevnt tidligere (seksjon 5.2) kan bakterier ha flere 16S rRNA i genomet (Acinas et al., 2004), som kan føre til flere kopier fra samme bakterie. Ved plating er det ikke alle bakteriene som klarer å vokse frem (Raats et al., 2011). Det kan derfor påvirke resultatet av platingen, hvor man får en verdi som er lavere enn faktisk bakteriemengde i prøven.

Det var større korrelasjon mellom ddPCR og Bactocount enn mellom ddPCR og plating. Dette kan være fordi både ddPCR og Bactocount er metoder der analyse av DNA benyttes, mens plating tar for seg vekst av kolonidannende enheter som tar utgangspunktet i at alle bakteriene klarer å vokse og danne kolonier på medium. Prøvene som ble platet og som også ble analysert ved hjelp av ddPCR ble ikke behandlet før dagen etter uttaket, mens Bactocount ble tatt på prøvene rett etter innsamling. Dette kan ha påvirket mengden bakterier som ble detektert.

Generelt er det mange usikkerheter og unøyaktigheter som kan ha påvirket resultatene og dermed gitt varierende resultat som gjør at man ikke finner en klar korrelasjon mellom metodene. Det er mulig at det blir funnet større korrelasjon mellom metodene om noen med mer erfaring utfører disse analysene.

PMA ble brukt for å skille mellom døde og levende celler ved prøver av pasteurisert melk. Det ble funnet en signifikant forskjell i bakteriemengde (Chao) mellom melkeprøver behandlet med og melkeprøver uten PMA. Det var mindre bakteriemengde i melkeprøver behandlet med PMA. Dette indikerer at PMA-behandlingen fungerte og at det er intakte (levende) celler som ble identifisert i prøvene som var behandlet med PMA. Dette er i tråd med annen

litteratur som har brukt PMA for differensiering av døde og levende celler (Porcellato et al., 2015, Nocker et al., 2007).

Tidligere har det blitt antatt at melken får lavere diversitet av bakterier etter pasteurisering. Det har i den senere tid blitt funnet at det er større diversitet i pasteurisert melk enn først antatt (Quigley et al., 2013a). I denne oppgaven ble det ikke funnet noen signifikant forskjell for diversiteten ved prøver med og uten PMA-behandling etter pasteurisering. Dette indikerer at det er en jevn reduksjon av de fleste bakterier under pasteurisering og at mengde av bakterier avtar, men diversiteten forblir den samme bare i mindre mengde.

5.5 Veien videre

Datasettet fra denne oppgaven bør bli undersøkt nærmere. Det er mulig å se på hvilke bakterier som er forskjellige, ved å ta utgangspunkte i faktorene hvor det ble funnet signifikant forskjell. Faktorene automatisk vask på Wedholms og Landteknikk tank, og tilførsel av potet til fôr kan blant annet bli undersøkt videre. Dette kan bli gjort ved å sammenligne OTU mellom de ulike faktorene.

Videre burde gårdene bli nærmere undersøkt for å finne ut om det er flere faktorer som kan være årsak til at det er forskjell i bakterietall ved bruk av automatisk vask ved Wedhomstank i forhold til Landteknikk tank. Det burde også bli undersøkt nærmere hvilken påvirkning forskjellige supplementter til fôr har å si, som f.eks. potet og fôrsukkerbeter.

Det å følge melken fra leverandørene, inn på meieri til utgått holdbarhet ved mikrobiell analyse ved hjelp av kultur-uavhengige metoder gir mye informasjon. Denne informasjonen kan avdekke mikrobielle problemområder, fra gård, transport av melk og meieri, og er noe som bør bli undersøkt nærmere. Dersom man ønsker å få informasjon om andre lass som eventuelt vil bli overført på samme silo som den ruten som blir fulgt kan man passe på å få lassprøvene fra disse andre rutene. Dermed kan man få et innblikk i bakteriefloraen fra de andre gårdene, sammenligne dem, og eventuelt kunne lettere se hvor de forskjellige bakterie kommer fra. Ved blanding av melk inn på silo, og ingen kunnskap om melken fra gårdene, er det ikke mulig å avdekke om tankbilen kan inneholde biofilm, men kontaminasjon fra meieriet kan bli observert.

Dersom det er ønskelig å følge all melk som blir transportert inn på en silo bør rutene bli valgt etter leveranse tidspunkt for leveranse inn på meieriet. Det er også mulig og bare følge et lass fra flere ruter, som skal på samme silo. Tankbilsjåførene er kvalifiserte til å notere informasjon om melkerommet. Melkeprøvene som tankbilsjåføren tar ut ved hver enkelt gård kan dermed bare bli hentet på meieri.

6. Konklusjon

Ved å se på total mikrobiota ved bruk av kultur-uavhengige metoder er det mulig å se effekten av rå melk kvalitet og lagringstemperatur på den mikrobielle kvaliteten på lettmelk ved utgått holdbarhet, samt avdekke faktorer i verdikjeden som gir en påvirkning på den mikrobielle floraen i melken. Hele verdikjeden er viktig for kvaliteten på sluttproduktet. Rå melk kvaliteten blir påvirket av gårdshygiene, utstyr og tankbil ved transport av melk inn til meieriet. Vaskesystemet ved forskjellige gårdstanker gir ulik påvirkning på det mikrobielle innholdet i melken, og fôrsupplement med potet kan gi et forhøyet bakterietall. Tankbil kan inneholde biofilm som kan påvirke kvaliteten til melken under transport inn til meieriet. Meieriutstyret og lagringstemperatur frem til utgått holdbarhet vil også påvirke kvaliteten på melken. Biofilm er en mulig kontaminasjonsfaktor inne på meieriet. *Bacillus* er den bakterien som setter begrensninger for holdbarhet på melkeprodukt. Den skaper problem for kvaliteten på melkeprodukt, samt at den utgjør en matforgiftningsfare. Den utgjør en stor risiko for kvalitetsforringing og matforgiftning ved lagring ved 8 °C. Ved 4 og 6 °C var det ikke store nok nivåer til å utgjøre en risiko. Størst mengde *Bacillus* ved utgått holdbarhet, for lagring ved 4 og 6 °C, ble sett for uttakene med størst mengde *Bacillus* i rå melken på gård. Rå melk kvaliteten og lagringstemperaturen er dermed viktig for melkekvaliteten og det er dermed viktig å opprettholde kjølekjeden på 4 °C.

Ved bruk av forskjellige metoder for å finne total antall bakterier ble det funnet at det er vanskelig å finne noen korrelasjon mellom metodene. Det er flere usikkerhetsfaktorer for hver metode som kan ha påvirket resultatene.

7. Referanser

- ACINAS, S. G., MARCELINO, L. A., KLEPAC-CERAJ, V. & POLZ, M. F. 2004. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *Journal of Bacteriology*, 186, 2629-2635.
- AIRD, D., ROSS, M. G., CHEN, W.-S., DANIELSSON, M., FENNELL, T., RUSS, C., JAFFE, D. B., NUSBAUM, C. & GNIRKE, A. 2011. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology*, 12, R18.
- ANDERSSON, A., RÖNNER, U. & GRANUM, P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, 28, 145-155.
- ARNESEN, L. P. S., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. E. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Reviews*, 32, 579-606.
- BAE, S. & WUERTZ, S. 2009. Discrimination of Viable and Dead Fecal Bacteroidales Bacteria by Quantitative PCR with Propidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2940-2944.
- 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.
- BENTLEY, I. 2012. *Bentley Bactocount IBC-m Technology* [Online]. Bentley Instruments. Available: http://o897vte5h4ebl8n47qiqpnaw.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2010/12/IBC_M_Brochure.pdf [Accessed 19.03.2017].
- BILLING, E. V. E. & CUTHBERT, W. A. 1958. 'BITTY' CREAM: THE OCCURRENCE AND SIGNIFICANCE OF *BACILLUS CEREBUS* SPORES IN RAW MILK SUPPLIES. *Journal of Applied Bacteriology*, 21, 65-78.
- BORDIN, J. K. 2016. *The FeedMileage project* [Online]. nmbu.no. Available: <https://www.nmbu.no/fakultet/biovit/om/institutt/iha/forskning/feed-mileage> [Accessed 11.05.2017].
- BOSTOCK, A. D., GILBERT, F. R., LEWIS, D. & SMITH, D. C. M. 1984. *Corynebacterium ulcerans* infection associated with untreated milk. *Journal of Infection*, 9, 286-288.
- BRAEM, G., DE VliegHER, S., VERBIST, B., HEYNDRIKX, M., LEROY, F. & DE VUYST, L. 2012. Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Veterinary Microbiology*, 157, 383-390.
- BUNTHOF, C. J. & ABEE, T. 2002. Development of a Flow Cytometric Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters. *Appl Environ Microbiol*, 68, 2934-42.
- BURGESS, S. A., BROOKS, J. D., RAKONJAC, J., WALKER, K. M. & FLINT, S. H. 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1012-1018.
- CASPERS, M. P. M., BOEKHORST, J., ABEE, T., SIEZEN, R. J. & KORT, R. 2013. Complete Genome Sequence of *Anoxybacillus flavithermus* TNO-09.006, a Thermophilic Sporeformer Associated with a Dairy-Processing Environment. *Genome Announcements*, 1.
- CASSOLI, L. D., MACHADO, P. F., DE OLIVEIRA RODRIGUES, A. C. & COLDEBELLA, A. 2007. Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 44-48.
- CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N. & ALLAND, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 69, 330-9.
- 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.

- DELBÈS, C., ALI-MANDJEE, L. & MONTEL, M.-C. 2007. Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1882-1891.
- DENTON, M. & KERR, K. G. 1998. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 57-80.
- DESMASURES, N., BAZIN, F. & GUÉGUEN, M. 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 53-58.
- DOGAN, B. & BOOR, K. J. 2003. Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 130-138.
- EDWARDS, K. J., LOGAN, J. M. J., LANGHAM, S., SWIFT, C. & GHARBIA, S. E. 2012. Utility of real-time amplification of selected 16S rRNA gene sequences as a tool for detection and identification of microbial signatures directly from clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 645-652.
- ELMOSLEMANY, A. M., KEEFE, G. P., DOHOO, I. R. & JAYARAO, B. M. 2009. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *Journal of Dairy Science*, 92, 2634-2643.
- ERCOLINI, D. 2013. High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3148-3155.
- FELLOWS, P. J. 2011. Food Processing Technology. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- FHI. 2016. *Vannkilder* [Online]. fhi.no. Available: <https://www.fhi.no/ml/drikkevann/hovedartikler/vannkilder/> [Accessed 11.05.2017].
- FLINT, S. H., BREMER, P. J. & BROOKS, J. D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11, 81-97.
- FROMM, H. I. & BOOR, K. J. 2004. Characterization of Pasteurized Fluid Milk Shelf-life Attributes. *Journal of Food Science*, 69, M207-M214.
- GIANNINO, M. L., MARZOTTO, M., DELLAGLIO, F. & FELIGINI, M. 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 188-195.
- GRANUM, P. E. 2007. *Matforgiftning: næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, Høyskoleforl.
- GRANUM, P. E. & LUND, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 223-228.
- GUNASEKERA, T. S., ATTFIELD, P. V. & VEAL, D. A. 2000. A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1228-1232.
- HANTSIS-ZACHAROV, E. & HALPERN, M. 2007. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7162-7168.
- HAYES, M. C. & BOOR, K. 2001. Raw milk and fluid milk products. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 59-76.
- HELGASON, E., TOURASSE, N. J., MEISAL, R., CAUGANT, D. A. & KOLSTØ, A.-B. 2004. Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 191-201.
- HINDSON, B. J., NESS, K. D., MASQUELIER, D. A., BELGRADER, P., HEREDIA, N. J., MAKAREWICZ, A. J., BRIGHT, I. J., LUCERO, M. Y., HIDDESEN, A. L., LEGLER, T. C., KITANO, T. K., HODEL, M. R., PETERSEN, J. F., WYATT, P. W., STEENBLOCK, E. R., SHAH, P. H., BOUSSE, L. J., TROUP, C. B., MELLEN, J. C., WITTMANN, D. K., ERNDT, N. G., CAULEY, T. H., KOEHLER, R. T., SO, A. P., DUBE, S., ROSE, K. A., MONTESCLAROS, L., WANG, S., STUMBO, D. P., HODGES, S. P., ROMINE, S., MILANOVICH, F. P., WHITE, H. E., REGAN, J. F., KARLIN-NEUMANN, G. A.,

- HINDSON, C. M., SAXONOV, S. & COLSTON, B. W. 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*, 83, 8604-8610.
- HUCK, J. R., HAMMOND, B. H., MURPHY, S. C., WOODCOCK, N. H. & BOOR, K. J. 2007. Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *Journal of Dairy Science*, 90, 4872-4883.
- ILLUMINA. 2010. *Illumina Sequencing Technology* [Online]. Illumina Sequencing. Available: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf [Accessed 28.03.2017].
- JØRGENSEN, H. J., MØRK, T., HØGÅSEN, H. R. & RØRVIK, L. M. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 158-166.
- KAPABIOSCINCES. u.å. *Kapa Library Quantification Kits for Illumina sequencing platforms* [Online]. Available: http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/KAPA_Library_Quantification_Illumina_TDS.pdf [Accessed 03.05.2017].
- KILIC, T., KARACA, B., OZEL, B. P., OZCAN, B., COKMUS, C. & COLERI CIHAN, A. 2017. Biofilm characteristics and evaluation of the sanitation procedures of thermophilic *Aeribacillus pallidus* E334 biofilms. *Biofouling*, 33, 352-367.
- KLIJN, N., NIEUWENHOF, F. F., HOOLWERF, J. D., VAN DER WAALS, C. B. & WEERKAMP, A. H. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2919-24.
- KOZICH, J. J., WESTCOTT, S. L., BAXTER, N. T., HIGHLANDER, S. K. & SCHLOSS, P. D. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*, 79.
- KUANG, Y., TANI, K., SYNNOTT, A. J., OHSHIMA, K., HIGUCHI, H., NAGAHATA, H. & TANJI, Y. 2009. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. *Biochemical Engineering Journal*, 45, 76-81.
- LAFARGE, V., OGIER, J.-C., GIRARD, V., MALADEN, V., LEVEAU, J.-Y., GRUSS, A. & DELACROIX-BUCHET, A. 2004. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5644-5650.
- LANE, D. J., PACE, B., OLSEN, G. J., STAHL, D. A., SOGIN, M. L. & PACE, N. R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 6955-6959.
- LATORRE, A. A., VAN KESSEL, J. S., KARNS, J. S., ZURAKOWSKI, M. J., PRADHAN, A. K., BOOR, K. J., JAYARAO, B. M., HOUSER, B. A., DAUGHERTY, C. S. & SCHUKKEN, Y. H. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93, 2792-2802.
- LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K. P., PRÜß, B. M., KAPLAN, T., WIEßNER-GUNKEL, E., STEWART, G. S. A. B. & SCHERER, S. 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 1373-1382.
- LGC. 2014. *Mag Midi Kit* [Online]. lgcgroup.com: LGC Group. Available: <https://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Extraction/Kits%20inserts/mag-midi.pdf> [Accessed 18.03.2017].
- LINDSAY, D., BRÖZEL, V. S., MOSTERT, J. F. & VON HOLY, A. 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 352-361.
- LOWY, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine*, 339, 520-532.

- LUND, V., ORMEROD, K. 2005. *Innaktivering av sporformende bakterier i drikkevann og implikasjoner for fremtidig desinfeksjonspraksis* [Online]. Available: http://vannforeningen.no/wp-content/uploads/2015/06/2005_30450.pdf [Accessed 11.05.2017].
- 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., MARTINKO, J., STAHL, S., CLARK, D., 2012a. 2.7 The evolutionary three of life. *Brock Biology of Microorganisms*. 3 ed.: Pearson Education.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., STAHL, S., CLARK, D., 2012b. 2. A brief journey to the microbial world. *Brock Biology of Microorganisms*. 3 ed.: Pearson Education.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., STAHL, S., CLARK, D., 2012c. 3.12 Endospores. *Brock Biology of Microorganisms*. 3 ed.: Pearson Education.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., STAHL, S., CLARK, D., 2012d. 5.10 Viable Counts. *Brock The Biology of Microorganisms*. 3 ed.: Pearson Education.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., STAHL, S., CLARK, D., 2012e. 6.11 The Polymerase Chain Reaction (PCR). *Brock Biology of Microorganisms*. 3 ed.: Pearson Education.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., STAHL, S., CLARK, D., 2012f. 6.19 Steps in protein synthesis. *Brock Biology of Microorganisms*. 3 ed.: Pearson Education.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J., STAHL, S., CLARK, D., 2012g. 4.2 Culture media. *Brock Biology of Microorganisms*. 3 ed.: Pearson Education
- MAGNUSSON, M., CHRISTIANSSON, A. & SVENSSON, B. 2007. Bacillus cereus Spores During Housing of Dairy Cows: Factors Affecting Contamination of Raw Milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 2745-2754.
- MATTOO, S. & CHERRY, J. D. 2005. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to Bordetella pertussis and Other Bordetella Subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 326-382.
- MELLEGRÅRD, H. 2015. *Bakterifloraen og dens dynamikk i norsk melk og melkeprodukt: potensiale og forringelse og sykdom* [Online]. nmbu.no. Available: <https://www.nmbu.no/forskning/tema/mat/prosjekter/node/21222> [Accessed 02.05.2017].
- MIOTKE, L., LAU, B. T., RUMMA, R. T. & JI, H. P. 2014. High Sensitivity Detection and Quantitation of DNA Copy Number and Single Nucleotide Variants with Single Color Droplet Digital PCR. *Analytical Chemistry*, 86, 2618-2624.
- MIZRAHI-MAN, O., DAVENPORT, E. R. & GILAD, Y. 2013. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS One*, 8.
- MORROW, J. B., ALMEIDA, J. L., FITZGERALD, L. A. & COLE, K. D. 2008. Association and decontamination of Bacillus spores in a simulated drinking water system. *Water Research*, 42, 5011-5021.
- MUNOZ-PRICE, L. S. & WEINSTEIN, R. A. 2008. Acinetobacter Infection. *New England Journal of Medicine*, 358, 1271-1281.
- NADA, S., ILIJA, D., IGOR, T., JELENA, M. & RUZICA, G. 2012. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. *Food Control*, 25, 728-731.
- NMBU u.å. Foods of Norway.
- NOCKER, A., SOSSA-FERNANDEZ, P., BURR, M. D. & CAMPER, A. K. 2007. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5111-5117.
- OGIER, J.-C., LAFARGE, V., GIRARD, V., RAULT, A., MALADEN, V., GRUSS, A., LEVEAU, J.-Y. & DELACROIX-BUCHET, A. 2004. Molecular Fingerprinting of Dairy Microbial Ecosystems by Use of Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5628-5643.
- PELEG, A. Y., SEIFERT, H. & PATERSON, D. L. 2008. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 538-582.

- PETERSON, B. W., SHARMA, P. K., VAN DER MEI, H. C. & BUSSCHER, H. J. 2012. Bacterial Cell Surface Damage Due to Centrifugal Compaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 120-125.
- PORCELLATO, D., MAGRI, M. & NARVHUS, J. 2015. Viable cells differentiation improves microbial dynamics study of fermented milks. *International Dairy Journal*, 47, 136-142.
- PORCELLATO, D., NARVHUS, J. & SKEIE, S. B. 2016. Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 1-6.
- PORCELLATO, D. & SKEIE, S. B. 2016. Bacterial dynamics and functional analysis of microbial metagenomes during ripening of Dutch-type cheese. *International Dairy Journal*, 61, 182-188.
- PRÜß, B. M., FRANCIS, K. P., VON STETTEN, F. & SCHERER, S. 1999. Correlation of 16S Ribosomal DNA Signature Sequences with Temperature-Dependent Growth Rates of Mesophilic and Psychrotolerant Strains of the *Bacillus cereus* Group. *Journal of Bacteriology*, 181, 2624-2630.
- QUAIL, M. A., KOZAREWA, I., SMITH, F., SCALLY, A., STEPHENS, P. J., DURBIN, R., SWERDLOW, H. & TURNER, D. J. 2008. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nat Methods*, 5.
- QUIGLEY, L., MCCARTHY, R., O'SULLIVAN, O., BERESFORD, T. P., FITZGERALD, G. F., ROSS, R. P., STANTON, C. & COTTER, P. D. 2013a. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of Dairy Science*, 96, 4928-4937.
- 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. 2013b. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 664-698.
- QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., BERESFORD, T. P., PAUL ROSS, R., FITZGERALD, G. F. & COTTER, P. D. 2012. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 96-105.
- RAATS, D., OFFEK, M., MINZ, D. & HALPERN, M. 2011. Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology*, 28, 465-471.
- RASOLOFO, E. A., ST-GELAIS, D., LAPOINTE, G. & ROY, D. 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 108-118.
- REGISTER, K. B., SUKUMAR, N., PALAVECINO, E. L., RUBIN, B. K. & DEORA, R. 2012. *Bordetella bronchiseptica* in a Paediatric Cystic Fibrosis Patient: Possible Transmission from a Household Cat. *Zoonoses and Public Health*, 59, 246-250.
- RIESEBERG, M., KASPER, C., REARDON, K. F. & SCHEPER, T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 350-360.
- SCHMIDT, T. S. B., MATIAS RODRIGUES, J. F. & VON MERING, C. 2014. Ecological Consistency of SSU rRNA-Based Operational Taxonomic Units at a Global Scale. *PLOS Computational Biology*, 10, e1003594.
- SCHMIDT, V. S. J., KAUFMANN, V., KULOZIK, U., SCHERER, S. & WENNING, M. 2012. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 1-9.
- SHAPIRO, H. M. 1983. Multistation multiparameter flow cytometry: A critical review and rationale. *Cytometry*, 3, 227-243.
- SHARMA, M. & ANAND, S. K. 2002. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19, 627-636.

- SHIPE, W. F., BASSETTE, R., DEANE, D. D., DUNKLEY, W. L., HAMMOND, E. G., HARPER, W. J., KLEYN, D. H., MORGAN, M. E., NELSON, J. H. & SCANLAN, R. A. 1978. Off Flavors of Milk: Nomenclature, Standards, and Bibliography¹. *Journal of Dairy Science*, 61, 855-869.
- SIGMAALDRICH. u.å.-a. *Microbiology Theory: Media Preparation* [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology/media-preparation.html> [Accessed 06.05.2017].
- SIGMAALDRICH. u.å.-b. *Plate Count Agar- for microbiology* [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/70152?lang=en®ion=NO> [Accessed 11.05.2017].
- STENFORS, L. P., MAYR, R., SCHERER, S. & GRANUM, P. E. 2002. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 47-51.
- STEVENS, D. L. 1992. Invasive Group A Streptococcus Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 14, 2-13.
- STONE, M. J. & ROWLANDS, A. 2009. 461. 'Broken' or 'bitty' cream in raw and pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, 19, 51-62.
- SØRHAUG, T. & STEPANIAK, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 35-41.
- TE GIFFEL, M. C., WAGENDORP, A., HERREWEGH, A. & DRIEHUIS, F. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 625-630.
- THERMOFISHER. 2015. *Qubit dsDNA BR Assay Kits* [Online]. ThermoFisher. Available: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf [Accessed 03.05.2017].
- TINE. u.å. *Melkekartong* [Online]. tine.no. Available: <http://www.tine.no/merkevarer/tinemelk/produkter/tinemelk-lettmelk-1-2-fett> [Accessed].
- 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.
- VILAIN, S., LUO, Y., HILDRETH, M. B. & BRÖZEL, V. S. 2006. Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4970-4977.
- WARD, L. J. H. & TIMMINS, M. J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 90-92.
- WINKELSTRÖTER, L. K., TEIXEIRA, F. B. D. R., SILVA, E. P., ALVES, V. F. & DE MARTINIS, E. C. P. 2014. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. *Microbial Ecology*, 68, 35-46.
- WRIGHT, A.-D. G., AUCKLAND, C. H. & LYNN, D. H. 2007. Molecular Diversity of Methanogens in Feedlot Cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4206-4210.
- YR.NO. 2017. *Været som var Jessheim, Ullensaker, Akershus* [Online]. Available: https://www.yr.no/sted/Norge/Akershus/Ullensaker/Jessheim/detaljert_statistikk.html [Accessed].
- ZHANG, R., HUO, W., ZHU, W. & MAO, S. 2015. Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1072-1079.

Vedlegg 1

Tabell A: Kontrollpunkt i melkerom ved henting av melkeprøver

Kontrollpunkt	Forklarende tekst
Type vask på tank	Automatisk (A) eller manuell (M)
Type tank	Landteknikk (L) eller Wedholms (W)
Melkevolum	Antall liter melk på tanken ved tapping
Temperatur på tankbil	Temperaturmål på melk ved tapping
Temperatur på tank	Kjøletemperaturen på tanken på gården
Propp på	Tapestuss med eller uten kork før tappstart (JA/NEI)
Dør til fjøs lukket	Lukket fjøsdør inn til melkerommet (JA/NEI)

Vedlegg 2

Tabell B: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 1 ved uttak 1.

Gård	Melkevolum	% Melkevol. /100
MG1.1	1779,6	0,10
MG1.2	2838,7	0,16
MG1.3	1369,9	0,08
MG1.4	1492,7	0,09
MG1.5	978,1	0,06
MG1.6	1473,3	0,08
MG1.7	2874,3	0,16
MG1.8	796	0,05
MG1.9	2980,7	0,17
MG1.10	963,4	0,05
Total	17546,7	

Tabell C: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 2 ved uttak 1.

Gård	Melkevolum	% Melkevol. /100
MG1.11	3638,9	0,31
MG1.12	5858	0,50
MG1.13	2229,2	0,19
Total	11726,1	

Tabell D: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 3 ved uttak 1

Gård	Melkevolum	% Melkevol./ 100
MG1.14	4078,2	0,24
MG1.15	4189,2	0,25
MG1.16	795,3	0,05
MG1.17	4076,8	0,24
MG1.18	1250,1	0,07
MG1.19	1053,4	0,06
MG1.20	1464,1	0,09
Total	16907,1	

Tabell E: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 1 ved uttak 2

Gård	Melkevolum	% Melkevol./100
MG2.1	1637,8	0,09
MG2.2	3362,1	0,18
MG2.3	1318,1	0,07
MG2.4	1649,9	0,09
MG2.5	1060,1	0,06
MG2.6	1780,3	0,10
MG2.7	3034,2	0,17
MG2.8	1044,4	0,06
MG2.9	3316	0,18
Total	18202,9	

Tabell F: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 2 ved uttak 2

Gård	Melkevolum	% Melkevol./100
MG2.10	1125,5	0,089048357
MG2.11	3473,5	0,274819609
MG2.12	5861,2	0,463731882
MG2.13	2179	0,172400152
Total	12639,2	

Tabell G: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 3 ved uttak 2

Gård	Melkevolum	% Melkevol./100
MG2.14	3870	0,23
MG2.15	3899	0,23
MG2.16	766,9	0,05
MG2.17	4082,3	0,24
MG2.18	1365,6	0,08
MG2.19	1229,3	0,07
MG2.20	1698,9	0,10
Total	16912	

Tabell H: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 1 ved uttak 3

Gård	Melkevolum	% Melkevol./100
MG3.1	1747	0,10
MG3.2	2918,6	0,17
MG3.3	1475,3	0,09
MG3.4	1760,2	0,10
MG3.5	1247,7	0,07
MG3.6	1865,8	0,11
MG3.7	2993,4	0,17
MG3.9	3347,2	0,19
Total	17355,2	

Tabell I: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 2 ved uttak 3

Gård	Melkevolum	% Melkevol./100
MG3.8	1378,4	0,09
MG3.10	1194,7	0,08
MG3.11	3649,1	0,23
MG3.12	5721,8	0,37
MG3.13	2183,7	0,14
MG3.19	1444,9	0,09
Total	15572,6	

Tabell J: Melkevolum fra gårdsprøver samlet på lass 3 ved uttak 3

Gård	Melkevolum	% Melkevol./100
MG3.14	4264,9	0,27
MG3.15	4154,5	0,26
MG3.16	603,5	0,04
MG3.17	3901,1	0,25
MG3.18	1303,8	0,08
MG3.20	1622,3	0,10
Total	15850,1	

Vedlegg 3

Likning A: $OTU \times \frac{\% \text{ melkemengde fra gård av totalt lass volum}}{100} = OTU \text{ fra gård mhp andel melkevolum fra gård}$
inn på lass

Likning B: Gjennomsnitt $G = \frac{OTU \text{ fra gård mhp andel melkevolum fra alle gårdene på et lass}}{\text{antall gårder på lasset}}$

Vedlegg 4

Tabell B del 1: Rådata til bruk for å se på faktorene på gård sin påvirkning på bakterieinnhold i prøvene fra uttak 1.

Prøve	Uttak	Vask	Tank	Tankvolum	Melkesystem	Fjøs	Fôr	Propp på tappestuss	Dør lukket til fjøs	Chao	Shannon	log kopier/ml	% <i>Pseudomonas</i>	% <i>Bacillus</i>
G1	1	M	L	1800	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	146	1,61	2,92	10,82	71,73
G2	1	A	L	6000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	154	2,27	3,26	9,15	50,31
G3	1	A	W	2000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	415	3,91	3,75	8,55	35,52
G4	1	A	W	2000	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	287	3,09	3,51	15,91	40,73
G5	1	M	L	1200	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Nei	295	3,15	3,40	17,68	38,12
G6	1	A	W	2500	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	303	3,93	3,89	11,70	30,70
G7	1	A	W	5000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	268	3,14	3,41	13,91	42,12
G8	1	M	L	1500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Nei	260	3,31	3,23	16,94	28,78
G9	1	A	W	3200	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	278	3,05	3,88	10,29	29,75
G10	1	A	W	1600	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Ja	353	3,48	3,67	17,56	43,94
G11	1	A	W	4000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	379	3,47	3,93	10,49	16,14
G12	1	A	W	8000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	272	3,23	3,84	17,77	30,20
G13	1	A	W	3200	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	243	2,29	3,89	20,02	52,16
G14	1	A	L	6000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	371	3,59	3,64	21,66	31,11
G15	1	A	L	6000	Robot	Løsdrift	Førsukkerbeter	Ja	Ja	425	3,86	3,93	11,43	26,11
G16	1	M	L	1500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Ja	222	2,52	4,10	26,89	46,33
G17	1	A	L	5000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	173	2,31	3,42	9,33	62,17
G18	1	A	L	2500	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	61	2,11	3,21	10,35	56,57
G19	1	M	W	2000	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	187	2,36	3,23	19,22	51,23
G20	1	A	L	2500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	55	1,93	2,87	31,04	51,00

Tabell B del 2: Rådata til bruk for å se på faktorene på gård sin påvirkning på bakterieinnhold i prøvene fra uttak 2.

Prøve	Uttak	Vask	Tank	Tankvolum	Melkesystem	Fjøs	Fôr	Propp på tappestuss	Dør lukket til fjøs	Chao	Shannon	log kopier/ml	% <i>Pseudomonas</i>	% <i>Bacillus</i>
G1	2	M	L	1800	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	273	1,45	3,72	15,58	71,26
G2	2	A	L	6000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	425	3,02	3,61	50,07	10,44
G3	2	A	W	2000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	387	3,57	3,67	37,79	4,87
G4	2	A	W	2000	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	261	3,07	3,60	50,26	7,02
G5	2	M	L	1200	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Nei	349	2,12	3,72	65,58	0,97
G6	2	A	W	2500	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	630	4,75	3,63	17,26	0,73
G7	2	A	W	5000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	538	4,61	3,61	20,66	0,69
G8	2	M	L	1500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Nei	519	3,71	3,66	14,53	1,03
G9	2	A	W	3200	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	338	2,42	3,71	14,08	56,80
G10	2	A	W	1600	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Ja	498	4,41	4,04	21,72	1,90
G11	2	A	W	4000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	438	3,88	3,70	18,15	1,56
G12	2	A	W	8000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	590	4,07	4,14	9,18	1,72
G13	2	A	W	3200	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	275	3,08	2,85	43,70	6,29
G14	2	A	L	6000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	405	2,93	3,10	12,76	1,17
G15	2	A	L	6000	Robot	Løsdrift	Førsukkerbeter	Ja	Ja	482	3,97	3,43	12,51	2,08
G16	2	M	L	1500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Ja	350	3,50	3,22	36,40	1,86
G17	2	A	L	5000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	213	2,24	3,90	10,59	56,16
G18	2	A	L	2500	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	242	3,04	3,56	45,35	10,62
G19	2	M	W	2000	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	261	2,03	3,56	12,44	1,04
G20	2	A	L	2500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	184	3,04	3,11	34,76	10,89

Tabell B del 3: Rådata til bruk for å se på faktorene på gård sin påvirkning på bakterieinnhold i prøvene fra uttak 3.

Prøve	Uttak	Vask	Tank	Tankvolum	Melkesystem	Fjøs	Fôr	Propp på tappestuss	Dør lukket til fjøs	Chao	Shannon	log kopier/ml	% <i>Pseudomonas</i>	% <i>Bacillus</i>
G1	3	M	L	1800	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	336	2,87	3,72	15,58	71,26
G2	3	A	L	6000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	420	2,79	3,61	50,07	10,44
G3	3	A	W	2000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	548	3,70	3,67	37,79	4,87
G4	3	A	W	2000	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	471	2,67	3,60	50,26	7,02
G5	3	M	L	1200	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Nei	128	2,37	3,72	65,58	0,97
G6	3	A	W	2500	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	416	3,45	3,63	17,26	0,73
G7	3	A	W	5000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	326	3,12	3,61	20,66	0,69
G8	3	M	L	1500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Ja	303	2,16	3,66	14,53	1,03
G9	3	A	W	3200	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	193	2,37	3,71	14,08	56,80
G10	3	A	W	1600	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Nei	638	4,19	4,04	21,72	1,90
G11	3	A	W	4000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	489	3,43	3,70	18,15	1,56
G12	3	A	W	8000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	593	3,94	4,14	9,18	1,72
G13	3	A	W	3200	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	382	2,83	2,85	43,70	6,29
G14	3	A	L	6000	Robot	Løsdrift	Potet	Ja	Ja	348	2,81	3,10	12,76	1,17
G15	3	A	L	6000	Robot	Løsdrift	Førsukkerbeter	Ja	Ja	329	2,28	3,43	12,51	2,08
G16	3	M	L	1500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Nei	Nei	280	3,11	3,22	36,40	1,86
G17	3	A	L	5000	Robot	Løsdrift	SK	Ja	Ja	416	3,35	3,90	10,59	56,16
G18	3	A	L	2500	Melkestall	Løsdrift	SK	Ja	Ja	308	2,08	3,56	45,35	10,62
G19	3	M	W	2000	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	234	2,03	3,56	12,44	1,04
G20	3	A	L	2500	Rørmelksanlegg	Bås	SK	Ja	Ja	263	1,27	3,11	34,76	10,89

Vedlegg 5

Tabell C del 1: Rådata for metodene brukt til identifisering av totalt bakterietall i rå melk fra gård fra uttak 1 og 2.

Gårdsprøver	logBactocount	logddPCR	logPlating
G2.U1	4,18	3,26	2,95
G3.U1	4,11	3,75	2,90
G4.U1	4,26	3,51	2,85
G5.U1	4,45	3,40	3,34
G6.U1	4,66	3,89	3,41
G7.U1	4,28	3,41	3,41
G8.U1	4,60	3,23	4,02
G9.U1	4,38	3,88	3,15
G10.U1	3,85	3,67	3,26
G11.U1	4,41	3,93	3,23
G12.U1	4,51	3,84	3,43
G13.U1	4,18	3,89	3,00
G1.U2	3,70	3,72	3,84
G2.U2	4,04	3,61	3,04
G3.U2	4,11	3,67	2,95
G4.U2	3,90	3,60	3,66
G5.U2	4,53	3,72	3,77
G6.U2	4,46	3,63	3,84
G7.U2	4,46	3,61	3,46
G8.U2	4,69	3,66	4,04
G9.U2	4,28	3,71	3,34
G10.U2	4,26	4,04	3,41
G11.U2	4,46	3,70	3,49
G12.U2	4,49	4,14	3,49
G13.U2	3,90	2,85	3,23
G14.U2	4,20	3,10	3,50
G15.U2	4,79	3,43	4,13
G16.U2	4,38	3,22	3,87
G17.U2	4,15	3,90	3,04
G18.U2	4,04	3,56	3,07
G19.U2	4,62	3,56	3,93
G20.U2	3,78	3,11	3,51

Tabell C del 2: Rådata for metodene brukt til identifisering av totalt bakterietall i rå melk fra gård fra uttak 3.

Gårdsprøver	logBactocount	logddPCR	logPlating
G1.U3	4,08	3,67	2,69
G2.U3	4,15	3,47	2,95
G3.U3	4,11	3,95	2,60
G4.U3	4,20	3,90	3,23
G5.U3	4,46	3,63	3,27
G7.U3	4,32	4,08	5,23
G8.U3	4,34	4,09	2,95
G9.U3	4,11	3,65	3,00
G10.U3	4,34	4,08	3,25
G12.U3	4,36	4,25	3,22
G14.U3	4,38	3,72	3,69
G18.U3	3,85	3,92	3,20
G19.U3	4,52	3,73	4,17



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway