



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Kartlegging av mikrobiota i melk fra gårdstank til utgått holdbarhet i standardisert helmelk

Identification of microbiota in milk from farm to end
of shelf life of standardized whole milk

Inga Marie Horntvedt Thorsen
Matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU). Dette var avslutningen på en toårig master innen matvitenskap med fordypningen kvalitet og hygiene. Denne oppgaven ble skrevet inn mot et pågående prosjekt mellom TINE og NMBU. Jeg vil derfor benytte sjansen til å takke for at jeg fikk muligheten til være med på dette.

Jeg ønsker spesielt å takke veilederne mine, som har vært til stor hjelp i forbindelse med oppgaven. Takk til hovedveilederen Siv Skeie for gode tilbakemeldinger, diskusjoner og oppfølging underveis i masteroppgaven. Denne veiledningen har vært til stor hjelp. Takk til veilederen Davide Porcellato for god hjelp underveis, spesielt i forhold til det molekylære og statistiske arbeidet.

Jeg ønsker også å takke alle på lab som har hjulpet til i forbindelse med denne oppgaven og for det trivelige miljøet som er der. En stor takk til TINE-anlegget jeg samarbeidet med, både i forbindelse med planlegging av prøveuttak og gjennomføringen. Uten deres velvilje ville ikke denne oppgaven vært mulig. Samtidig ønsker jeg å takke TINE for økonomisk støtte.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Ås, 11.05.2017

.....

Inga Marie Horntvedt Thorsen

Sammendrag

Melk er et godt vekstmedium for mange bakterier, noe som er en utfordring i produksjon av konsummelk. Bakterier i melk kan være en utfordring både i forbindelse med kvalitetsforringelse og tilstedeværelsen av patogene bakterier, noe som er til hinder hvis man skal utvide holdbarhetsperioden til konsummelk. Sporedannende bakterier, slik som *Bacillus*-arter, utgjør en ekstra utfordring ettersom disse overlever pasteurisering, samtidig som en del av artene er patogene og kvalitetsforringende.

I denne oppgaven ble rå melk fra 25 gårder (leverandører) fulgt gjennom produksjonen av Helmelk ved et meieri og til utgått holdbarhet, hvor kartongene ble lagret ved tre ulike temperaturer (4, 6 og 8 °C). Dette ble gjort tre ganger med to ukers mellomrom. Illumina MiSeq sekvensering ble brukt til å kartlegge mikrobiotaen fra de ulike prøvepunktene (leverandører, tankbil, silotank, ferdigvaretank, kartonger fra produksjonsdag og kartonger fra utgått holdbarhet 4, 6 og 8 °C).

Resultatene i denne oppgaven viste store forskjeller i mikrobiotaen som ble observert ved utgått holdbarhet mellom de ulike lagringstemperaturene. Mikrobiotaen i kartonger lagret ved 8 °C skilte seg betydelig fra kartongene lagret ved 4 og 6 °C. Dette illustrer viktigheten av en uavbrutt kjølekjede for å opprettholde den gode kvaliteten på konsummelk. Resultatene avslørte en varierende mikrobiota ved utgått holdbarhet mellom uttakene. Det var mest *Bacillus* tilstede ved utgått holdbarhet ved uttaket som også viste mest *Bacillus* i leverandørmelken. Disse resultatene indikerer at leverandørmelken har en stor innvirkning på mikrobiotaen ved utgått holdbarhet.

Abstract

Milk is a good medium for bacterial growth, which is a challenge in the production of fluid milk. Bacteria present in milk can be a challenge both in relation to spoilage and pathogenic abilities of the bacteria. This is one of the major hurdles in relation to extend the shelf life of milk. Spore forming bacteria, such as *Bacillus* species, is an extra challenge because they survive pasteurization. In addition, some of the spore forming bacteria are pathogenic and cause food spoilage.

In this thesis, raw milk from 25 farms were followed through the production of full fat milk at one dairy to the end of the shelf life of cartons kept at three different temperatures (4, 6 and 8 °C). This was done three times with the same farms and dairy. Illumina MiSeq sequencing was used to estimate the microbiota from the different samples (farms, trucks, silotank, holding tank (post pasteurization) cartons from the production day and cartons at the end of the shelf life kept at 4, 6 and 8 °C).

The results in this thesis showed variation in microbiota at the end of the shelf life between the different storage temperatures. Cartons stored at 8 °C showed a different microbiota than what was found in cartons stored at 4 and 6 °C. This illustrates the importance of a continuous cooling chain to maintain the quality of milk in cartons. Results also revealed a variation in microbiota at the end of the shelf life between different sampling days. *Bacillus* spp. was detected in the highest amounts in cartons from the sampling day where it was found the highest abundance in the raw milk from farms. This indicates that the farm milk has a great impact on the microbiota in the cartons.

Innhold

1. Innledning.....	1
1.1. Melk	1
1.1.1. Pasteurisering	1
1.1.2. Smittekilder for bakterier i rå melk	2
1.1.3. Mikrobiota i rå melk.....	3
1.1.4. Mikrobiota i pasteurisert melk.....	4
1.1.5. Aerobe psykrotrofe sporedannende bakterier.....	5
1.2. Meieri	7
1.2.1. Biofilm og prosessutstyr.....	7
1.2.2. CIP-vask	8
1.3. Deteksjon.....	8
1.3.1. Dyrkingsavhengig og dyrkingsuavhengige metoder	8
1.3.2. Tradisjonell utsåing	10
1.3.3. Flow cytometri – BactoCount	10
1.3.4. Døde versus levende celler – PMA	11
1.3.5. DNA-ekstraksjon.....	11
1.3.6. Polymerase chain reaction (PCR).....	12
1.3.7. Droplet Digital-PCR.....	13
1.3.8. Illumina MiSeq sekvensering.....	14
1.4. Hensikt.....	15
2. Materialer og metoder	16
2.1. Prøveinnsamling.....	16
2.2. Faktorer på gård.....	17
2.3. BactoCount IBCm	17
2.4. Prøvepreparering	17
2.5. Platetelling.....	18
2.6. DNA-ekstraksjon.....	18
2.7. Droplet Digital-PCR.....	18
2.8. Illumina MiSeq sekvensering	19
2.9. Databehandling.....	20
3. Resultater.....	21
3.1. Uttakene.....	21
3.2. Leverandørmelk.....	27
3.3. Prøver fra silotank	29
3.4. Forventet mikrobiota på tank og silotank	30
3.5. PMA-behandling	32

3.6.	Holdbarhet ved uttakene.....	33
3.7.	Sammenligning av metodene for å kvantifisere bakterier	35
4.	Diskusjon.....	37
4.1.	Leverandører og uttak	37
4.2.	Siloprøver	40
4.3.	Forventet og observert mikrobiota på tankbil og silotank	41
4.4.	Pasteurisering og PMA.....	42
4.5.	Holdbarhet og uttak	44
4.6.	Metoder for kvantifisering av totalt antall bakterier	47
4.7.	Oppsummering	48
5.	Referanser.....	50
	Vedlegg	57

1. Innledning

1.1. Melk

Salg av konsummelk i Norge har de siste årene hatt en jevn nedgang, og i 2016 ble det solgt i underkant av 380 millioner liter Tinemelk (TINE 2016b). Konsummelk er en samlebetegnelse som favner om melk fra ku som har uendret eller standardisert fettprosent (Landbruks- og matdepartementet 2015). I Norge er det lovpålagt å varmebehandle rå melk før videre salg (Nærings- og fiskeridepartementet et al. 2009). Det eneste unntaket fra denne loven er salg direkte fra gård til privatperson til eget forbruk.

Melk er et næringsrikt næringsmiddel og en god kilde til fett, proteiner, vitaminer og mineraler, og er derfor et godt vekstmedium for bakterier. Melk inneholder mange av de viktigste næringsstoffene mennesker trenger (Haug et al. 2007). Det er om lag 3,5 % fett, 4,5 % karbohydrater (laktose) og 3,3 % protein i standardisert helmelk (TINE 2016a).

1.1.1. Pasteurisering

Pasteurisering har vært et viktig steg på veien for å bedre mattryggheten i forhold til melk og har en lang historie. Allerede på 1890-tallet begynte man å pasteurisere melk i Skandinavia (Holsinger et al. 1997). Den kritiske grensen ble etter hvert satt til 71,7 °C i 15 sekunder (HTST – high temperature, short time) (Holsinger et al. 1997), men i norsk lovverk er temperaturen oppjustert til 72 °C, eventuelt 63 °C i 30 minutter (Nærings- og fiskeridepartementet et al. 2009). Fastsettelsen av denne temperaturen er basert på destruksjon av de patogene bakteriene *Mycobacterium tuberculosis* og *Coxiella burnetii* (Holsinger et al. 1997), hvor *C. burnetii* ble ansett for å være den mest varmestabile (Cerf & Condron 2006). Ved denne kombinasjonen av tid og temperatur endres melkens sensoriske egenskaper ubetydelig (Nursten 1997; Walstra et al. 2006). Det har i senere tid blitt funnet *C. burnetii* i rå melk i noen områder i USA (Loftis et al. 2010), men smittefaren gjennom melk er relativt ukjent (Cerf & Condron 2006). *Mycobacterium paratuberculosis*, som også er en patogen bakterie, har vist seg å kunne overleve pasteurisering hvis den finnes i høye konsentrasjoner i rå melk, mens HTST pasteurisering ser ut til å være tilstrekkelig i hvis bakterien er tilstede i lave konsentrasjoner (<10 kde/ml) (Grant et al. 1998; Grant et al. 1996).

For å forsikre seg om at pasteuriseringsprosessen har vært tilstrekkelig kan man undersøke om enzymet alkaline fosfatase har blitt inaktivert. Dette er et enzym som er mer varmeresistent enn de fleste patogene mikroorganismer (Fadiloglu et al. 2004; Shamsi et al. 2008) og benyttes

derfor som en indikator på vellykket pasteurisering. En del andre enzymer inaktiveres også, men langt fra alle (Walstra et al. 2006).

I dag foregår pasteurisering ved hjelp av en platevarmeveksler, bestående av tynne plater, inndelt i minimum tre seksjoner. En hvor kald melk varmes opp av varm melk, og den varme, pasteuriserte melken kjøles ned av den kalde upasteuriserte melken. En seksjon hvor upasteurisert melk varmes opp av varmt vann, og en seksjon hvor pasteurisert melk kjøles ned av kaldt vann (Sundén & Manglik 2007). Det inngår også en holdecelle, som sikrer at melken blir holdt ved 72 °C i 15 sekunder.

1.1.2. Smittekilder for bakterier i rå melk

Det er mange kilder til bakterier i melken før pasteurisering. Ved sekresjon er melken tilnærmet steril, men allerede i juret kan bakterier kontaminere melken i et friskt dyr, blant annet slik som ulike *Micrococcus* (Evans 1916). Mengden og sammensetningen av bakterier vil endres ved mastitt i juret. Typiske bakterier som finnes i melk fra et jur med mastitt er blant andre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* og *Streptococcus dysgalactiae*, som alle kan forårsake mastitt (Leitner et al. 2006; Oviedo-Boyso et al. 2007).

Dårlig hygiene ved melking har vist seg å være en av de viktigste faktorene som påvirker rå melk kvaliteten (Gleeson et al. 2013). I et studie av Verdier-Metz et al. (2009) ble det funnet forskjeller i både mengde bakterier og sammensetningen i forhold til ulik praksis rundt melking. Parametere som vasking av juret, tørking av juret før melking og desinfeksjon av juret etter melking ble studert. Vasking, tørking og desinfisering etter melking ga de beste mikrobiologiske resultatene (Verdier-Metz et al. 2009). Det er også anslått at spore mengden i melken vil øke betraktelig når jord kontaminerer spenene sammenlignet med når det er fôr som er kilden til kontaminering (Vissers et al. 2007).

Fjøsmiljøet påvirker hvilke mikroorganismer som kan finnes på juret til melkekuer. Eksempelvis har bakterietellinger fra type strø som benyttes i kuenes liggebåser vist seg å korrelere med bakterier funnet på spenene (Zdanowicz et al. 2004). Det er også påvist relativt høye konsentrasjoner av *Bacillus cereus* i sagflis som benyttes som strø (Magnusson et al. 2007). Surfôr er også en viktig kilde for sporer i rå melk, ettersom de kontaminerer fjøsmiljøet (Konosonoka et al. 2012; Te Giffel et al. 2002). Sporer kan gå upåvirket gjennom kuenes fordøyelsessystem. Kontroll av surfôrproduksjonen gjennom tilsetning av melkesyrebakterier

eller kjemiske tilsetninger kan dermed bidra til å redusere mengden sporer i melken (Te Giffel et al. 2002).

Dårlig vask av melkingsanlegg eller gårdstank kan også bidra til dårligere rå melk kvalitet. Dårlig vedlikehold eller vask vil kunne føre til lettere dannelse av biofilm på overflater av rustfritt stål i melkeanlegget (Gleeson et al. 2013). Vannets hardhet kan også påvirke dannelse av biofilm. Dette kommer av at hardt vann inneholder mer kalsium og magnesium noe som kan resultere i dårligere effekt av desinfeksjonsmidler, samt at avleiringer på overflater, er noe som gjør biofilmdannelsen enklere (Gleeson et al. 2013).

1.1.3. Mikrobiota i rå melk

Melkens kjemiske sammensetning gjør den til et godt egnet vekstmedium for mange bakterier. Til vanlig kan rå melk inneholde en rekke melkesyrebakterier i varierende mengder. Typiske melkesyrebakterier og vanlige mengder av disse bakterieslektene i rå melk er presentert i Tabell 1.1 (Quigley et al. 2013b). I tillegg til melkesyrebakterier er det vanlig å finne psykrotorfe bakterier slik som blant andre *Pseudomonas*, *Acinetabacter* og *Aeromonas* spp (Quigley et al. 2013b).

Tabell 1.1 Melkesyrebakterieslekter og deres respektive mengder som er vanlig i melk (Quigley et al. 2013b).

Bakterieslekt	Cfu/ml
<i>Lactococcus</i>	$8.2 \times 10^1 - 1.4 \times 10^4$
<i>Streptococcus</i>	$1.14 \times 10^1 - 1.5 \times 10^4$
<i>Lactobacillus</i>	$1.0 \times 10^2 - 3.2 \times 10^4$
<i>Leuconostoc</i>	$9.8 \times 10^1 - 2.5 \times 10^3$
<i>Enterococcus</i> spp.	$2.57 \times 10^1 - 1.58 \times 10^3$

Ved bruk av molekylære metoder har man fått en dypere forståelse av hvilke mikroorganismer man finner i rå melk. I et studie hvor DNA-sekvensering ble benyttet til å detektere bakteriearter i rå melk, ble det funnet 256 forskjellige arter. *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus lactis* funnet å være de mest dominerende artene i melken, med henholdsvis 43,7 % og 19 % av den totale mikrobiotaen (Masoud et al. 2012). Det har ved hjelp av molekylære metoder blitt funnet bakterier som tidligere ikke har vært assosiert med melk, slik som bakterieslektene *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *prevotella* og *Catenibacterium* (Quigley et al. 2013a). Det er også, ved hjelp av «high-throughput» sekvensering, funnet at psykrofile bakterier dominerer i rå melk og i melken etter pasteurisering (Quigley et al. 2013a).

Rå melk er også en kilde til patogene mikroorganismer, hvor noen av de viktigste er *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. (liten betydning i Norge), *Listeria monocytogenes*, patogene *Escherichia coli* og bakterier fra *Bacillus cereus*-gruppen (Ivy et al. 2012; Jakobsen et al. 2011). I et forsøk gjort på norsk rå melk til osteproduksjon ble *L. monocytogenes* og *S. aureus* kartlagt. Det ble ikke funnet *L. monocytogenes* i noen av prøvene av rå melk, mens det ble funnet *S. aureus* i 47,2 % av prøvene (Jakobsen et al. 2011).

Psykrotrofe sporedannende bakterier utgjør også en utfordring i melk, og ettersom disse kan sporulere, utgjør de også en utfordring etter pasteurisering. De viktigste blant disse slektene er *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp. og *Clostridium* (Doyle et al. 2015; Huck et al. 2007; Huck et al. 2008). Clostridier er gram-positive, anaerobe bakterier som favner om blant annet *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum* og *Clostridium botulinum*, hvor sistnevnte forårsaker botulisme (Doyle et al. 2015). I konsummelk utgjør clostridier et lite problem, under 1 % av tilfellene av matbåren botulisme er forårsaket av meieriprodukter og da har det hovedsakelig vært yoghurt og ost som har vært smitekilden (Doyle et al. 2015).

Bacillus spp. og beslektede slekter finnes i likhet med andre sporedannende bakterier mange steder i omgivelsene, og er de ofte assosiert med jord, grovfôr, surfôr og avføring (Doyle et al. 2015). *Bacillus* spp. og beslektede slekter, slik som *Paenibacillus*, er hovedsakelig aerobe, gram-positive staver, men det er også foreslått tre anaerobe og syv ikke sporedannende *Bacillus*-arter (Logan 2012).

Bacillus spp. og *Paenibacillus* spp. er blitt identifisert som de mest fremtredende slektene av gram-positive sporedannere i miljøet hos melkeleverandører, i produksjonslokaler og i pasteurisert melk (Huck et al. 2007; Huck et al. 2008; Ivy et al. 2012). Disse er ofte til stede i rå melk og har evnen til å vokse i melk ned til 6 °C (Huck et al. 2007). Disse utdypes mer under avsnittet om aerobe psykrotolerante sporedannende bakterier.

1.1.4. Mikrobiota i pasteurisert melk

Mikrobiotaen etter pasteurisering bestemmes av bakterier og sporer som overlever pasteurisering, og post-pasteuriserings kontaminasjoner. *Pseudomonas* er en bakterieslekt som er tilstede i rå melk i relativt høye konsentrasjoner, ettersom kjølelagring av melken fremmer vekst av disse bakteriene (Vithanage et al. 2016). Tidligere har *Pseudomonas* og andre psykrotrofe bakterier vært ansett for å være en indikasjon på post-pasteuriserings kontaminasjoner (He et al. 2009). Ved bruk av molekylære metoder har man sett at *Pseudomonas* ikke nødvendig elimineres ved pasteurisering, men kun reduseres. Disse

bakteriene kan være metabolsk aktive, selv om de ikke kan dyrkes på et fast media (Quigley et al. 2013a).

Varmeresistente (termofile) bakterier kan deles i termofile, mesofile og psykrotrofe. De termofile varmeresistente bakteriene kan vokse fra 40 til 60 °C, og utgjør et lite problem ved kjølelagring av melk (Gleeson et al. 2013). Derimot har disse bakteriene vist å kunne formere seg under forvarming før pasteurisering (Murphy et al. 1999). De mesofile varmeresistente bakteriene kan vokse fra 5 til 50 °C, og kan derfor både vokse ved kjølelagring og under produksjon (Gleeson et al. 2013). Typiske slekter i denne gruppen er *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* og *Arthrobacter* (Gleeson et al. 2013). *Paenibacillus*, *Bacillus* og *Microbacterium* har blitt funnet i størst mengder i melk (Fromm & Boor 2004)

De fleste psykofile bakterier er ikke varmeresistente, men undergruppen psykrotrofe bakterier favner om bakterier som kan vokse under 7 °C. Denne gruppen inkluderer også varmeresistente psykrotrofe, mesofile bakterier (Gleeson et al. 2013). Dette er en stor utfordring for meieriindustrien ettersom disse kan overleve pasteurisering og formere seg ved kjølelagring. I denne gruppen finner vi vanlige kontaminanter i rå melk, slik som *Paenibacillus* spp. og *Bacillus* spp. som både kan være kvalitetsforringende og kan forårsake matforgiftning. (De Jonghe et al. 2010).

1.1.5. Aerobe psykrotrofe sporedannende bakterier

Psykrotrofe sporedannende bakterier er bakterier som produserer endosporer, som er svært robuste mot ytre påvirkning slik som varme, stråling, tørke og desinfeksjonsmidler (Logan 2012). Ved pasteurisering vil i utgangspunktet de vegetative cellene dø, mens sporene overlever og kan germinere ved gunstigere forhold.

Meieriassosierte psykrotrofe sporedannere representere hovedsakelig to slekter, *Paenibacillus* spp. og *Bacillus* spp. (Huck et al. 2007), men også andre slekter beslektede til *Bacillus* er funnet relatert til meierianlegg og melk, slik som *Solibacillus*, *Lysinibacillus*, *Viridibacillus* og *Psychrobacillus* (Ivy et al. 2012). *Paenibacillus* og *Bacillus* utgjør en utfordring i forhold til å øke holdbarheten på konsummelk (Huck et al. 2007; Huck et al. 2008). Når man ser bort fra post-pasteurisering kontaminasjon har det vist seg at *Bacillus*-arter er mer dominerende i melken i den første delen av holdbarhetsperioden, mens *Paenibacillus*-arter har vist seg å være en mer dominerende matforringende bakterie mot slutten av holdbarhetsperioden (Ranieri et al. 2012).

B. cereus-gruppen består av flere nært beslektede arter, og favner om *B. cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus toyonensis* og *Bacillus cytotoxicus* (Ceuppens et al. 2013; Jiménez et al. 2013). Dette er en gruppe patogene organismer med varierende toksisitet. Arter av *Bacillus* som ikke inngår i *B. cereus*-gruppen, har også flere ganger blitt isolert fra matbåren sykdom, men dette er primært hos mennesker med redusert immunforsvar. Sykdommer rapportert forårsaket av disse bakteriene er sjeldent (Logan 2012). I et studie på patogenisiteten til ulike *Bacillus* (utenom *B. anthracis*) og *Paenibacillus*-arter, ble det vist at mange av disse artene produserte proteinaser (Celandroni et al. 2016). Disse kan være viktig for overlevelsen og spredningen av bakteriene, og være med å bryte ned vert-assosierte proteiner og dermed ha en viktig rolle i bakterienes virulens (Celandroni et al. 2016).

B. cereus kan forårsake to ulike matforgiftninger, emetisk og entrotoksisk. Den emetiske matforgiftningen er en intoksikasjon forårsaket av produksjon av et varme-stabilt toksin i maten før konsum (Granum 2015). Dette toksinet kan i store konsentrasjoner forårsake dødsfall, men emetiske-stammer er foreløpig sjeldent i Norge (Granum 2015). Den entrotoksiske varianten er en infeksjon som kan forårsakes av produksjon av tre ulike varme-labile entrotoksiner, to av disse er cytotoxiske og ødelegger epitelceller i tarmen, den ene er et hemolytisk (Hbl) enterotoksin og det andre er Nhe (Granum 2015). De tredje entrotoksinet er cytotoxin K (CytK), som kan gi blodig diaré og forårsake dødsfall. (Granum 2015). Andre *Bacillus* spp. enn *B. cereus*-gruppen, slik som *B. subtilis*, *B. pumilus* og *B. licheniformis*, har også blitt sett i sammenheng med matbåren sykdom, men dette er sjeldent (From et al. 2005; Granum 2015)

Bakterier av *B. cereus*-gruppen isolert fra melk lagret under 6 °C, er som oftest *Bacillus weihenstephanensis*. Denne er sjeldent patogen for mennesker fordi den vokser dårlig ved 37 °C, noe som er en forutsetning, ettersom enterotoksinet produseres i tarmen (Granum 2015).

Paenibacillus er en slekt med høy diversitet og inkluderer bakterier som hovedsakelig er psykrotolerante (Ivy et al. 2012). Dette er en bakterieslekt, som på lik linje med *Bacillus* spp., har stor utbredelse, og er blant annet isolert fra jord, mennesker, kompost og kumøkk (Ivy et al. 2012). *Paenibacillus*-arter er sjeldent assosiert med matbåren sykdom, men det er derimot et større kvalitetsproblem. Flere *Paenibacillus* spp. har likevel blitt isolert fra kliniske tilfeller mennesker, men i flesteparten av tilfellene er dette ikke skadelig for verten. Kun noen få av stammene har vist seg å være patogene (Grady et al. 2016). Omtrent alle infeksjoner assosiert med *Paenibacillus*-slekter er opportunistiske og har en tendens til å ramme mennesker med dårlig immunforsvar (Grady et al. 2016). *Paenibacillus amylolyticus* har vist seg å inneha *nhe*-

genet, som koder for enterotoksinet Nhe (Ivy et al. 2012). Men det er også rapportert at 22 % av *Bacillus*- og *Peenibacillus*-stammene som har nhe-genet, har ingen eller liten produksjon av enterotoksinet Nhe (Guinebretière & Broussolle 2002).

Flere bakterier i *B.cereus*-gruppen, og *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B.clausii* og *P. polymyxa* produserer enzymer med matforringende egenskaper. *B.cereus*-gruppen, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* og *P. polymyxa* har vist seg å produsere enzymer med høy proteolytisk aktivitet (De Jonghe et al. 2010). *B. subtilis*, *B. pumilus* og *B. amyloliquefaciens* hadde også signifikant lipolytisk aktivitet (De Jonghe et al. 2010). Disse enzymene kan resultere i nedbryting av fett og proteiner i melken og ha negativ innvirkning på de sensoriske egenskapene.

1.2. Meieri

Det er ikke til å unngå at en viss mengde bakterier kommer inn på meieriet med rå melk. Det er derfor viktig at dette begrenses siden bakterier i anlegget kan gi opphav til flere utfordringer og redusere melkens kvalitet.

1.2.1. Biofilm og prosessutstyr

Biofilm er et samfunn av ulike bakterier omgitt av en matrix, bestående av ulike polymerer som kalles ekstracellulære polymeriske substanser (EPS). Det favner om polysakkarider, proteiner, glykoproteiner, glykolipider og DNA (Wiley et al. 2014). Denne matrixen er med på å feste bakteriene bedre til overflater og beskytte bakteriene mot blant annet vaskemidler og andre harde miljøforhold, slik som høy temperatur (Burgess et al. 2010). Biofilm kan dannes på nesten alle typer overflater, det starter med at bakterier fester seg til overflaten av eksempelvis et rør. Etter hvert begynner de å produsere EPS og danne den beskyttende matrixen. En moden biofilm er et dynamisk samfunn av mikroorganismer med store forskjeller innad som følge av ulik metabolsk aktivitet (Wiley et al. 2014). En biofilm kan fungere som et reservoar med bakterier som gjentatte ganger gir opphav til ny kontaminasjon.

I meieriindustrien utgjør biofilmer en utfordring fordi de kan feste seg til ulikt prosessutstyr, slik som rørverk, platevarmeveksler og tanker. Det har blitt funnet biofilmer med høy diversitet i produksjonsutstyr både før og etter pasteurisering (Cherif-Antar et al. 2016). Blant bakteriene som ble funnet etter pasteurisering var *Escherichia faecalis* og *B. cereus*. Det kan også tyde på at sammensetningen i biofilmen varierer fra dag til dag (Cherif-Antar et al. 2016). I et annet studie ble det funnet at *Bacillus*-arter sto for 37 % av bakteriene i en biofilm fra et meieranlegg

(Sharma & Anand 2002). Andre slekter som ble funnet i biofilmen var *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* og *Staphylococcus*. Iodophor (en jodholdig løsning som inneholder en oppløsende komponent) i en konsentrasjon på 10 ppm og med en kontakttid på 20 minutter viste å ha god effekt på de komplekse biofilmene (Sharma & Anand 2002).

1.2.2. CIP-vask

I konsummelk produksjon er det vanlig å benytte «cleaning in place» (CIP) systemer. Det betyr at vann og vaskemidler sirkulerer gjennom tanker, rør og prosesslinjer uten at utstyret må demonteres (Bylund 1995). Dette forutsetter at sirkulasjonen, temperaturen og konsentrasjonen på vaskemidlet er korrekt slik at vasken blir tilfredsstillende, samt at anlegget har et godt hygienisk design.

Et eksempel på CIP-program, som er beskrevet i Bylund (1995), starter med rensing med varmt vann i om lag 10 minutter, før et basisk vaskemiddel sirkulerer i 30 minutter ved 75 °C. Deretter skylles dette vaskemiddelet bort med varmt vann, før et surt vaskemiddel sirkulerer i om lag 20 minutter ved 70 °C. Deretter skylles det med kaldt vann (Bylund 1995). Praksisen rundt CIP-vask varierer.

CIP-systemer har vist seg å ikke være fullstendig effektive mot biofilm, standard CIP-vask fjerner ikke biofilm fra et CIP-system i laboratorieskala (Bremer et al. 2006). Studiet konkluderte derfor med at standard CIP-vask kan bli forbedret med blant annet testing av konsentrasjoner på basiske og sure vaskemidler. Det er også vist at biofilm bestående av ulike bakterier viser ulik resistens mot vasking og forskjellige vaskemidler (Furukawa et al. 2010).

Ved CIP-vask kan områder nedstrøms for et svært kontaminert område, kontamineres av bakterier som fester seg igjen. Dette ble vist for sporer av ulike *B. cereus*-stammer, som kontaminerte rene områder nedstrøms ved CIP-vask, spesielt ved vinklinger på rør eller i komplekst prosessutstyr (Le Gentil et al. 2010). Lengre vedheng på sporen har vist seg å være en egenskap som gjør at *B. cereus*-sporer lettere fester seg. Samtidig vil små sporer øke resistensen mot CIP-vask (Tauveron et al. 2006).

1.3. Deteksjon

1.3.1. Dyrkingsavhengig og dyrkingsuavhengige metoder

Når mikrobiotaen i melk skal undersøkes kan man hovedsakelig dele tilnæringsmetodene inn i dyrkingsavhengige (culture dependent) og dyrkingsuavhengige (culture independent). Ved bruk av high-throughput DNA sekvensering basert på 16S rRNA, har det blitt funnet flere

bakterier som ikke tidligere har vært assosiert med melk (Quigley et al. 2013a). Sammenligning av flow cytometry med tradisjonell platetelling har også vist seg å gi god korrelasjon (Gunasekera et al. 2000). Likevel fanges trolig ikke alt opp som følge av blant annet forskjeller i DNA ekstraksjon hos ulike bakterier, og flere mener at det er en kombinasjon av disse metodene som er mest hensiktsmessig å benytte (Miambi et al. 2003; Weber et al. 2014).

Ved bruk av dyrkingsavhengige metoder forutsetter man at bakteriene er i stand til å vokse ved de bestemte forutsetningene, slik som medietype, temperatur og oksygentilgang (Delbès et al. 2007). I tillegg har bakterier ulik generasjonstid, slik at noen bakterier er i stand til å vokse raskt, mens andre vokser sakte. Dette vil påvirke deteksjonen og forholdet mellom bakteriene, spesielt i anrikningsmedier (Delbès et al. 2007). Noen bakterier er også mer dominerende enn andre, noe som også vil påvirke mikrobiotaen i vekstmedier (Miambi et al. 2003). Selv på selektive vekstmedier er det vist at ikke alle ønskede bakterier er i stand til å vokse. I et forsøk hvor 100 stammer av *B. cereus* ble dyrket på PEMBA (polymixin pyruvate egg-yolk mannitol bromothymol blue agar) eller MYP (mannitol egg yolk polymyxin) hadde 75 *B. cereus*-stammer svake eller atypiske kolonier på PEMBA, mens 65 viste svake eller atypiske kolonier på MYP (Tallent et al. 2012).

En del ikke-sporedannende bakterier har vist seg å ha evne til å gå inn i en fase hvor de er levende, men de lar seg ikke detektere ved dyrkningsforsøk. Denne fase kalles viable but nonculturable state (VBNC) (Oliver 2005). Dette er en form for dvale, men bakteriene kan fremdeles være metabolsk aktive. En slik tilstand kan slå ut som følge av harde miljøforhold (Oliver 2010), slik som temperaturen under pasteurisering. Dette har blitt observert for *Pseudomonas* (Quigley et al. 2013a). En stor mengde bakterier, inkludert mange patogener, innehar evnen til å gå i denne formen for dvale. De kan returnere fra dvalen når vekstforholdene ligger til rette for det (Fakruddin et al. 2013; Oliver 2010). Dette utgjør en utfordring i meieriindustrien, både fordi disse bakteriene kan overleve pasteurisering, men også fordi de er vanskelig å detektere.

Dyrkingsuavhengige metoder baserer seg på deteksjon av DNA og inkluderer blant annet metoder som flow cytometry og DNA-sekvensering. Disse er derfor uavhengig av vekst i medier og gir en direkte forståelse av hva som befinner seg i prøven. I senere tid har slike metoder blitt mer effektive, samtidig som prisene har blitt mer overkommelige (van Dijk et al. 2014). Neste generasjon sekvensering kan produsere millioner av sekvenser i en enkelt kjøring, dette gjør at de gir en dypere og mer nøyaktig estimering av mikrobiotaens diversitet (Quigley et al. 2013b). Ulempen med dyrkingsuavhengige metoder er at de kan gi falske positive

resultater på grunn av tilstedeværelsen av DNA fra døde bakterier. Det finnes kjemiske stoffer som skal hindre dette, slik som PMA, som blir beskrevet senere. Det kan også være forskjell på hvor lett det er å ekstrahere DNA fra ulike matrixer.

1.3.2. Tradisjonell utsåing

Tradisjonell utsåing kan gjøres ved innstøping i agaren eller overflatespredning. Plate Count Agar (PCA) er en agar som ofte benyttes til innstøpningsmetoden for å bestemme totalt antall bakterier i en prøve. Innstøpingen gjøres ved at én milliliter av prøven overføres til en petriskål, hvor agar helles i og blandes med prøven. Dette kan påvirke resultatet ettersom agaren holder 50 ° C vil psykrotrofe/psykrofile bakterier kunne ødelegges og ikke være i stand til å vokse (Tortora et al. 2010). Inkuberingstemperaturen vil også påvirke hvilke bakterier som vokser frem (Tortora et al. 2010)

1.3.3. Flow cytometri – BactoCount

Flow cytometri baserer seg på deteksjon av fluoriserende lys ved hjelp av en photomultiplier (Veal et al. 2000). Bakteriene blir ofte farget med en fluoriserende markør slik at bakteriene lettere skal detekteres. Når prøven injiseres i instrumentet blir den belyst av en laser, den fluoriserende markøren avgir fluoriserende pulser som samles opp av optikk i instrumentet, som videre går gjennom et smalt bandpass filter, og detekteres av photomultiplieren (Bentley Instruments 2013; Veal et al. 2000). Dette er med på å gjøre flow cytometri til en rask, automatisert og objektiv analysemetode (Veal et al. 2000).

BactoCount IBCm er et instrument som baserer seg på flow cytometri for å bestemme bakterietallet i en prøve. Dette instrumentet er spesielt kalibrert for prøver av rå melk. I melkeprøven tilsettes det en løsning, som inneholder et proteolytisk enzym, en fluoriserende markør og en klarende buffer (Bentley Instruments 2013). Dette tilsettes for å lysere de somatiske cellene i melken, løse opp fettkuler og proteiner, permeabilisere bakteriene og farge deres dobbeltrådede DNA (dsDNA) (Bentley Instruments 2013). Dette inkuberes i forvarmede prøvekopper ved 50 °C for å optimalisere de kjemiske reaksjonene (Bentley Instruments 2013). Fettkuler og proteiner kan binde seg uspesifikt til de fluoriserende markørene og dermed påvirke deteksjonen av bakterier (Gunasekera et al. 2000). Fjerning av fett har vist seg å ikke være tilstrekkelig, og proteinase er derfor nødvendig for å bryte ned proteinene slik at de ikke påvirker resultatet (Gunasekera et al. 2000). Prøvene blir også sonikert i løpet av inkuberingstiden. Dette bidrar til bedre kjemisk nedbryting av forstyrrende partikler, redusering av bakgrunns fluoresensen og opp bryting av kjeder eller ansamlinger av bakterier. Dette gjør at tellingen blir mer nøyaktig (Bentley Instruments 2013).

1.3.4. Døde versus levende celler – PMA

Deteksjon av bakterier ved hjelp av molekylære eller dyrkingsuavhengige metoder vil i noen tilfeller kunne føre til en overestimering, hvis det ikke skilles på levende og døde bakterier. DNA kan være til stede i mediet i flere uker etter cellens død (Josephson et al. 1993), det er derfor viktig å kunne diskriminere mellom levende og døde celler for å få pålitelige resultater.

Ved bruk av propidium monoazide (PMA) før DNA-ekstraksjon vil man kunne hindre at DNA fra døde celler amplifiseres (Nocker et al. 2006). Dette baserer seg på at cellemembranen til bakteriene er ødelagt eller skadet slik at PMA kan trenge inn i cellen og danne kryssbindinger i dsDNA under en lysindusert reaksjon. Dette forhindrer amplifisering i en PCR-reaksjon (Nocker et al. 2006).

PMA ser ikke ut til å penetrere levende bakteriers cellemembraner, noe som gir dette kjemikalet en fordel sammenlignet med andre lignende stoff (Cawthorn & Witthuhn 2008; Nocker et al. 2006). Men det er også rapportert at PMA ikke har optimal virkning på bakterier som er drept ved lave temperaturer, siden disse har lite skade på cellemembranen. Dette er trolig på grunn av at for lite PMA trenger inn i cellene (Lee & Levin 2009).

Etttersom PMA baserer seg på å trenge gjennom ødelagte cellemembraner er det viktig at cellemembran til levende bakterier ikke ødelegges før PMA-behandling. Dette ville resultert i at levende celler ikke amplifiseres. Hard sentrifugering har i noen tilfeller vist seg å kunne påvirke utvalgte bakteriers levedyktighet, deriblant *E. coli* (Pembrey et al. 1999). I andre tilfeller har det resultert i overflateskader eller endring av cellenes overflateegenskaper (Peterson et al. 2012).

1.3.5. DNA-ekstraksjon

Det finnes mange ulike metoder for DNA ekstraksjon. Felles for dem alle er at målet er å isolere DNA og vaske bort urenheter slik at DNA kan benyttes for videre analyser. Det er vanlig å lysere cellene ved en lyserende buffer og fjerne proteiner ved hjelp av en proteinase. Det er også vanlig at det benyttes en mekanisk behandling slik at cellemembranene ødelegges og DNA-eksponeres.

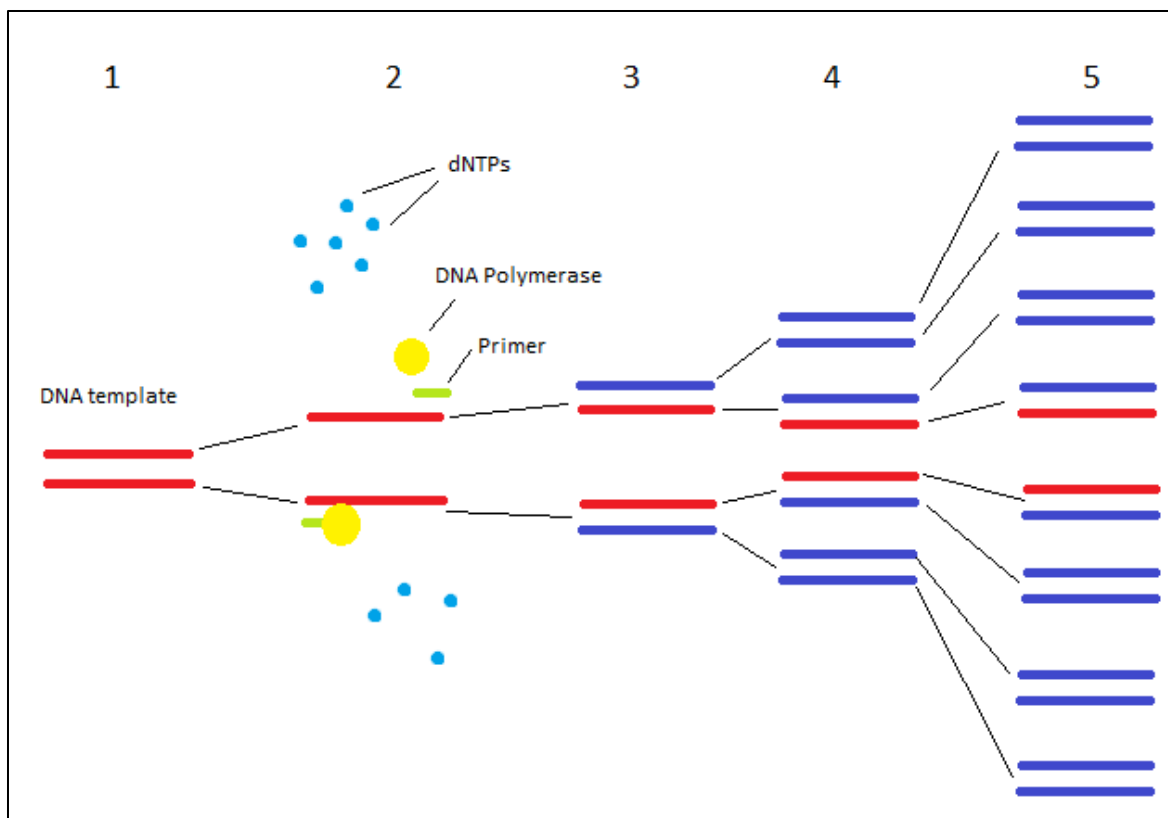
En metode for DNA ekstrahering, som også benyttes i denne oppgaven, er bruk av magnetisk separasjon av DNA. Det benyttes da magnetiske partikler som ved hjelp av klassisk polaritetsmekanisme binder seg til DNA (LGC 2014a). Når disse prøvene da settes i kontakt med en magnet vil det dannes en pellet med magnetkuler og DNA (LGC 2014b). Supernatanten

kan da fjernes og pellet kan vaskes gjentatte ganger for å fjerne mest mulig urenheter som kan være med å forstyrre i senere prosesser.

1.3.6. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR er grunnleggende for bruk av mange molekylære deteksjons metoder. Dette er en teknikk hvor DNA-fragmenter raskt kan bli amplifisert. En gensekvens kan etter noen få timer bli til over en billion kopier (Tortora et al. 2010). Prøven tilsettes en mastermix, som inneholder DNA-polymerase, deoxynukleotider (dNTP) og primere, som er korte sekvenser med nukleinsyrer (Tortora et al. 2010). Det benyttes både en forward og en reverse primer, som binder til enkelttrådet DNA (ssDNA) som har blitt denaturert i starten av PCR-reaksjonen. Primerne som velges avgjør hvilke gensekvenser som skal amplifiseres, ettersom det syntetiseres fra deres bindingsområder.

I en PCR-reaksjon, vil først DNA denatureres før primerne kan binde seg til ssDNA som fungerer som en template for DNA-syntesen (Tortora et al. 2010). Binding av dNTP katalyseres av enzymet DNA polymerase, som binder på 3'-enden (Watson et al. 2014). Etter endt syklus, denatureres DNA igjen og det nylige syntetiserte DNAet fungerer som nye templat for nye syntetiseringer ved neste syklus (Watson et al. 2014). Syklusene er illustrert i Figur1.1.



Figur 1.1 Illustrasjon av PCR. Denaturering av DNA templatet og binding av primere illustreres i steg 2, hvor også DNA polymerase og dNTPer er tilstede. De tre neste stegene illustrerer hvordan mengden PCR-produkt øker.

1.3.7. Droplet Digital-PCR

Droplet digital-PCR (ddPCR) er en kvantifiserende metode som estimerer antallet DNA-fragmenter til stede i prøven uten å måtte benytte en standardkurve. Den baserer seg på negative og positive dråper i en vann-i-olje emulsjon (Hindson et al. 2011). Prøven blandes med supermix og primere før den settes i en brønn, mens oljen plasseres i en annen brønn. Oljen og prøvene går gjennom flow-focusing åpninger i en dråpegenerator, hvor om lag 20 000 dråper genereres per prøve (Hindson et al. 2011). Oljen inneholder surfaktanter som stabiliserer de nylig dannede dråpene.

Det benyttes en supermix eller tilsvarende, som er en reaksjonsmiks som inneholder det som trengs i ddPCR, utenom primere, prober og DNA templatet. DNA, primere og prober blandes med denne supermixen før dråpene genereres (Bio-Rad 2010).

De genererte dråpene overføres til en 96-brønns plate som gjennomgår en PCR. Under denne reaksjonen genereres det kopier av DNA i de dråpene som inneholdt DNA fra starten. Dette kan videre detekteres av en dråpeleser (Hindson et al. 2011). Utfra dette blir prøvene

karakterisert som enten positive eller negative. Fluorosensen som sendes ut avgjør om den er over eller under terskelverdien (Hindson et al. 2011)

Det er blitt rapportert at ddPCR i sammenligning med qPCR (kvantitativ PCR, som baserer seg på en standardkurve) viser bedre presisjon og bedre reproduserbarhet fra dag til dag (Hindson et al. 2013). Det er også vist at ddPCR har en lavere deteksjonsgrense enn qPCR, noe som kan være en fordel i prøver med lave konsentrasjoner av DNA, slik som i melk (Porcellato et al. 2016).

1.3.8. Illumina MiSeq sekvensering

16S rRNA genet er en av de mest brukte genetiske markørene. Årsaken til dette er blant annet at den er tilstede i alle bakterier, funksjonen har ikke endret seg over tid og 16s rRNA geneene er lange nok til å gi tilfredsstillende bioinformatisk informasjon (Janda & Abbott 2007). Disse geneene består i overkant av 1500 basepar (bp) og inneholder 9 hypervariable regioner (V1-V9) som er oppdelt av mer konserverte sekvenser (Fadrosh et al. 2014). Ved Illumina sekvensering er V3 og V4 ofte brukt, dette utgjør en region på om lag 466 bp (Fadrosh et al. 2014; Mizrahi-Man et al. 2013).

Illumina MiSeq sekvensering er en neste generasjons sekvenserings teknologi, som gir high-throughput sekvensering av mikrobiotaen fra ulike prøver (Fadrosh et al. 2014). Men det er likevel noen tekniske utfordringer i forbindelse med slik sekvensering. Blant annet kan det være ulik DNA-ekstraksjon mellom forskjellige bakterier og partiskhet fra ulike primere ovenfor de forskjellige bakterienes DNA (Caporaso et al. 2012).

Ofte gjøres det to PCR-reaksjoner, den første er for å amplifisere opp DNA-fragmentet som skal sekvenseres (O'Donnell et al. 2016). Videre er det vanlig å rense PCR-produktet for å fjerne primer-dimerer og lignende, dette kan gjøres ved AMPure XP cleaning. Dette er magnetkuler som binder seg til DNA-fragmenter på 100 bp eller mer (Beckman Coulter 2016).

Ved PCR nummer to benyttes det index primere, som innehar en form for strekkode som gjør at mange prøver kan kjøres samtidig noe som reduserer kostnadene (Caporaso et al. 2012; O'Donnell et al. 2016). Disse index primerne er komplementær med sekvenser på flow cellen, hvor prøvene danner klustere (Kozich et al. 2013). Konsentrasjonen av DNA i prøvene som sekvenseres påvirker kvaliteten på sekvenseringen på grunn av ved høy konsentrasjon vil klusterne overlapp hverandre og alle sekvensene kan derfor ikke skilles (Kozich et al. 2013).

Selve sekvenseringen tar utgangspunkt i at den preparerte prøven går gjennom en kluster-generering, hvor DNA-fragmentene som skal sekvenseres er overført til en flow celle hvor de

binder seg til komplementære sekvenser festet på flow cellen (Illumina 2016). Hvert fragment blir amplifisert gjennom bro-amplifisering, slik at det dannes klustere. Selve sekvenseringen gjøres ved at basene blir detektert enkeltvis, etter rekkefølgen de har i DNA-templatet (Illumina 2016). Alle 4 dNTPene er til stede, noe som lar disse naturlig konkurrere, og reduserer feilfrekvensen. Disse sekvensene gjennomgår videre en databehandling for å identifisere bakteriene (Illumina 2016).

1.4. Hensikt

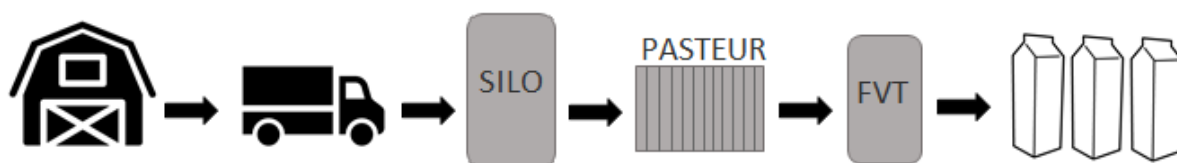
Hensikten med denne oppgaven er å gjøre et dypdykk i mikrobiotaen som finnes i rå melk, og observere hvilken effekt denne mikrobiotaen har på hva som blir observert på meieriet, i kartonger ved produksjonsdag og ved utgått holdbarhet. Ved å ta ut prøver gjennom store deler av verdikjeden kan mikrobiotaen følges og tendenser kan avdekkes. Hensikten er også å se hvordan mikrobiota endres ved pasteurisering og lagring ved ulike temperaturer. Et av hovedfokusene vil være forekomsten av *Bacillus* og hvilken innvirkning leverandørmelk og lagringstemperatur har på denne bakterieslekten.

2. Materialer og metoder

2.1. Prøveinnsamling

Det ble samlet inn prøver av rå melk fra totalt 27 forskjellige gårder (leverandørprøver) fordelt på to hentingsruter tilhørende et meieri. Det var 25 leverandører som leverte melk ved alle uttakene. I tillegg til én leverandør som leverte ved de to første (lev 23) og én leverandør som leverte ved det siste uttaket (lev 27). På hentingsdagen var melken tre dager gammel fra første melking. Prøvene fra gårdene ble tatt ut ved overpumping til tankbilen, hvor en liten mengde melk automatisk ble tatt ut ved jevne mellomrom og samlet i et 70 ml stort beger, for å gi en representativ prøve. Disse prøvene ble oppbevart i et kjøleskap, før det kom inn til meieriet. Det ble også tatt ut prøver fra tankbilene (lassprøver) når de kom inn til meieriet og fra silotanken hvor denne melken ble samlet på meieriet. Silotanken rommer 70 000 L og leverandørmelken som ble fulgt utgjorde om lag 45 000 L ved samtlige uttak. Prøvene fra tankbilene ble tappet ut ved prøvekran fra hvert skott på bilen og samlet i et 70 ml beger. Prøven fra siloen ble tatt ut ved hjelp av en steril sprøyte som ble stukket gjennom en membran på tanken. Før og etter prøvene ble tatt ut, ble denne membranen vasket med sprit. Den dagen melken kom inn til meieriet ble det tatt ut tre prøver fra silotanken med 10 minutters mellomrom. Det ble etterstrebet at melken ikke ble blandet med andre lass, men dette ble ikke oppnådd ved første uttak, hvor melken ble blandet med 10 000 L annen rå melk.

Dagen etter at melken kom inn til meieriet, ble det tatt ut prøver av silotanken før produksjon. Etter pasteurisering ble det tatt ut prøve av ferdigvaretanken med helmelk produsert fra den aktuelle siloen. Av denne helmelken ble det tatt ut 12 kartonger etter tapping, hvor det ble tatt ut prøver på produksjonsdagen (tre kartonger) og etter 14 døgn ved 4°C (tre kartonger), 6°C (tre kartonger) og 8°C (tre kartonger). Det ble totalt gjort tre uttak med to ukers mellomrom (uke 4, 6 og 8, 2017) av de samme gårdene og tilsvarende produksjon. Prøvepunktene er presentert i figur 2.1.



Figur 2.1 Flytskjema over melkeflyten fra gård til kartong. Prøver ble tatt ut ved gård, tankbil, silotank(SILO), ferdigvaretank (FVT) og kartonger (produksjonsdag og utgått holdbarhet ved 3 ulike temperaturer).

Samtlige prøver ble transportert fra meieriet til laboratoriet ved NMBU i isoporesker med kjøleelementer for å opprettholde en ubrutt kjølekjede.

2.2. Faktorer på gård

Det ble notert faktorer på de ulike gårdene som kan påvirke melke kvaliteten, eksempler på slike faktorer er type vask, om proppen på tappestussen på gårdstanken var på og om døra mellom melkerommet og fjøset var lukket. Utfyllende skjema som ble benyttet for å observere faktorer på gårdene er vedlagt (Vedlegg 1).

2.3. BactoCount IBCm

Alle prøvene av rå melk (leverandørprøver, lassprøver og silo) ble analysert med BactoCount IBCm. Dette ble gjort i henhold til praksisen på meieriet. Prøvene ble vendt 10 ganger, før det ble overført 1 ml av hver prøve til hver sine oppvarmede (50°C) prøvekopper, deretter ble det tilsatt 2 ml IBC-løsning. Denne løsningen inneholder en klarende buffer (component 1), et proteolytisk enzym (component 2) og en fluoriserende markør (component 3), henholdsvis i forholdet 18:1:1. Komponentene tilhører IBCm Bacto Kit er produsert av Bentley Instruments. Prøvene ble videre inkubert ved 50 °C i 10 minutter, etter ni minutter ble prøvene sonikert, ved hjelp av en sonikator (15 s). Etter endt inkuberings tid ble prøvene analysert av et flow cytometer av typen BactoCount IBCm (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota).

2.4. Prøvepreparering

Det ble spunnet ned en pellet av samtlige prøver, av de pasteuriserte prøvene ble det i tillegg spunnet ned en pellet med PMA-behandling. Pelleten ble laget ved å ha 40 ml av prøven i et 50 ml Falconrør, som ble sentrifugert ved $8000 \times g$ ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble løst opp i 1 ml citratvann, før den ble overført til et 1,5 ml eppendorfrør før den igjen ble sentrifugert ved $16\ 110 \times g$ i 3 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble vasket med 1 ml citratvann før den ble sentrifugert, dette ble totalt gjort to ganger. Prøvene som ikke ble behandlet med PMA ble frosset ned ved -20 °C inntil de ble benyttet til DNA-ekstraksjon. PMA-behandling av prøvene ble gjort ved at pelleten ble løst opp i 500 µl citratvann. Videre ble 1,25 µl PMA tilsatt, før prøvene ble ristet og inkubert mørkt ved romtemperatur i 5 minutter. Deretter ble prøvene lagt på is og eksponert for halogenlys i 5 minutter, før prøvene ble sentrifugert ved $16\ 110 \times g$ i 4 minutter, supernatanten ble fjernet og prøvene frosset ved -20°C.

2.5. Platetelling

Tradisjonell platetelling ble gjennomført ved NMBU av forskningsingeniøren Christine de Billot. For samtlige prøver (utenom kartong fra produksjonsdagen) ble totalt antall bakterier estimert ved bruk av innstøping i PCA-agar. Det ble laget en fortynningsrekke og etter inkubering ved 30 °C i 3 døgn, ble skålene med antall kolonier mellom 30 og 300 talt. Ut fra disse resultatene ble antall bakterier i den opprinnelige prøven estimert.

2.6. DNA-ekstraksjon

Før DNA-ekstraksjon ble det gjort en bead beating av pelleten resuspendert i 200 µl lysis buffer, som inneholder 20 mM Tris-Cl (pH 8.0) 2 mM sodium EDTA, 1,2 % Triton® X-100. Dette ble overført til et rør som inneholder om lag 0,5 g glasskuler. Disse rørene ble kjørt i en FastPrep96™ (MP Biomedicals, Santa Ana, California) i 3x50 sekunder ved 1800 rpm, før de ble sentrifugert ved 16 110 x g i 1 minutt. Deretter ble 50 µl av denne supernatanten overført til en 96-brønns plate.



Figur 2.2 Flytskjema over hovedtrinnene i DNA-ekstraksjonen.

DNA-ekstraksjonen ble gjort ved hjelp av et Mag Midi Kit (LGC, Teddington, UK), en skjematisk fremstilling er vist i Figur 2.2. Den vedlagte protokollen ble fulgt, med kun små endringer. Først ble proteinase K og Lysis Buffer BLm tilsatt, deretter ble prøvene inkubert ved 55 °C ved 20 minutter. Videre ble det tilsatt etanol (100%) og mag particle suspension BLm til alle prøvene. Etter at prøvene var blandet og inkubert i 2 minutter, ble 96-brønns platen satt i kontakt med magneter slik at mag-partiklene dannet en pellet. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble vasket 3 ganger som beskrevet i protokollen. Pelleten ble videre tørket før elueringsbuffer ble tilsatt. Det ble tilsatt 50 µl Elution Buffer BLm, før prøvene ble inkubert i 10 minutter og deretter satt i kontakt med magneten igjen. Supernatanten, som inneholdt ekstrahert DNA, ble satt på en ny 96-brønns plate før den ble fryst ved -20°C.

2.7. Droplet Digital-PCR

Droplet digital-PCR (ddPCR) ble gjennomført på samtlige prøver ved NMBU av masterstudenten Francesco Tomarchio. Prosedyren ble gjort som beskrevet av Porcellato et al. (2016). ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad™, Hercules, California) hadde i denne oppgaven konsentrasjoner noe avvikende fra Porcellato et al. 2016. I denne oppgaven ble det laget en supermix på totalt 20 µl, bestående av primere, både forward og reverse, i konsentrasjon

på 0.2 μM , probe på 0.1 μM og 1 μl av prøven. Det ble også benyttet noe forskjellige tid/temperatur-innstillinger ved amplifisering i denne oppgaven. Denaturering ble gjort i 10 minutter ved 95 $^{\circ}\text{C}$, og syklusen som ble repetert 35 ganger, bestod av denaturering ved 94 $^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder, annealing ved 54 $^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder og elongering ved 72 $^{\circ}\text{C}$ i 45 sekunder.

Etter at prøvene var blandet med ddPCR[™] Supermix for Probes, ble det generert dråper ved hjelp av en QX200[™] Droplet Generator (Bio-Rad[™], Hercules, California). Videre ble prøvene amplifisert ved PCR og prøvene avlest av en QX200[™] Droplet Reader (Bio-Rad[™], Hercules, California), før prøvene ble behandlet i QuantaSoft software (Bio-Rad[™], Hercules, California).

2.8. Illumina MiSeq sekvensering

Illumina sekvensering ble utført av postdoc Davide Porcellato ved NMBU i henhold til beskrivelsen av Porcellato og Skeie (2016). For å amplifisere V3 og V4 regionene av bakterienes 16S rRNA ble de universelle primerne PRK341F og PRK806R benyttet. I opparbeidelsen av prøvene før første PCR ble det tilsatt 0,5 mg/ml BSA og 2,5 mM MgCl på grunn av PCR-inhibitorer og at det ble benyttet 2 μl template DNA. PCR ble gjennomført med denaturering ved 98 $^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder. Syklusen som ble gjentatt 35 ganger, bestod av 98 $^{\circ}\text{C}$ i 10 sekunder, annealing ved 53 $^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder og elongering ved 72 $^{\circ}\text{C}$ i 20 sekunder. Siste trinn var 72 $^{\circ}\text{C}$ i 5 minutter før den ble kjølt ned til 4 $^{\circ}\text{C}$. PCR-produktet ble så vasket ved hjelp av AMPure XP beads. Det rensede PCR-produktet ble benyttet videre til Illumina indexing PCR ved hjelp av Illumina indexing PCR primere. I denne PCRen ble det benyttet 5 μl rensed DNA og trinnene var lik som ved første PCR, med unntak av at det ble gjort 10 sykluser istedenfor 35, og annealingtemperaturen var 55 $^{\circ}\text{C}$ istedenfor 53 $^{\circ}\text{C}$. Deretter ble PCR-produktet etter denne PCR-proseduren rensed og normalisert ved hjelp av Sequalprep normalization kit. Innholdet av DNA ble kontrollert ved hjelp av en Qubit test. Ved for lite DNA tilstede i det rensede PCR-produktet ble det utført en ny PCR med bruk av Illumina primere og en Iproof polymerase og deretter en ny vask. Konsentrasjonen i prøvene ble kvantifisert med Kapa Library Quantification Kit. Prøvenes konsentrasjoner ble kalkulert ved bruk av en kalibreringskurve i Excel. Tilslutt ble Illumina Library Denaturing and MiSeq Sample loading step (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Procol) brukt for endelig sekvensering.

2.9. Databehandling

Identifisering av OTUer og kalkulering av alfa- og betadiversitet ble gjort som beskrevet i Porcellato og Skeie (2016). Bakterieslektene inkludert i ANOVA eller lineære modeller ble først normalisert ved hjelp av cumulative sum scaling normalisering (Paulson et al. 2013). Shannon index ble beregnet utfra alfadiversiteten. Betadiversiteten ble benyttet til å bestemme vekta UniFrac som la grunnlaget for PCoA (principal coordinates analysis), som illustrer likhetene/ulikhetene mellom prøver. Søylediagrammer ble konstruert fra OTU-tabeller som var aggregert med hensyn på slekt.

RStudio ble benyttet for statistiske analyser. For å sammenligne metodene for kvantifisering av mengden bakterier i prøvene (BactoCount, platetelling og ddPCR) ble det brukt lineære modeller. Lineære modeller ble også benyttet for å undersøke om det var noen signifikante forskjeller basert på faktorene observert hos leverandørene.

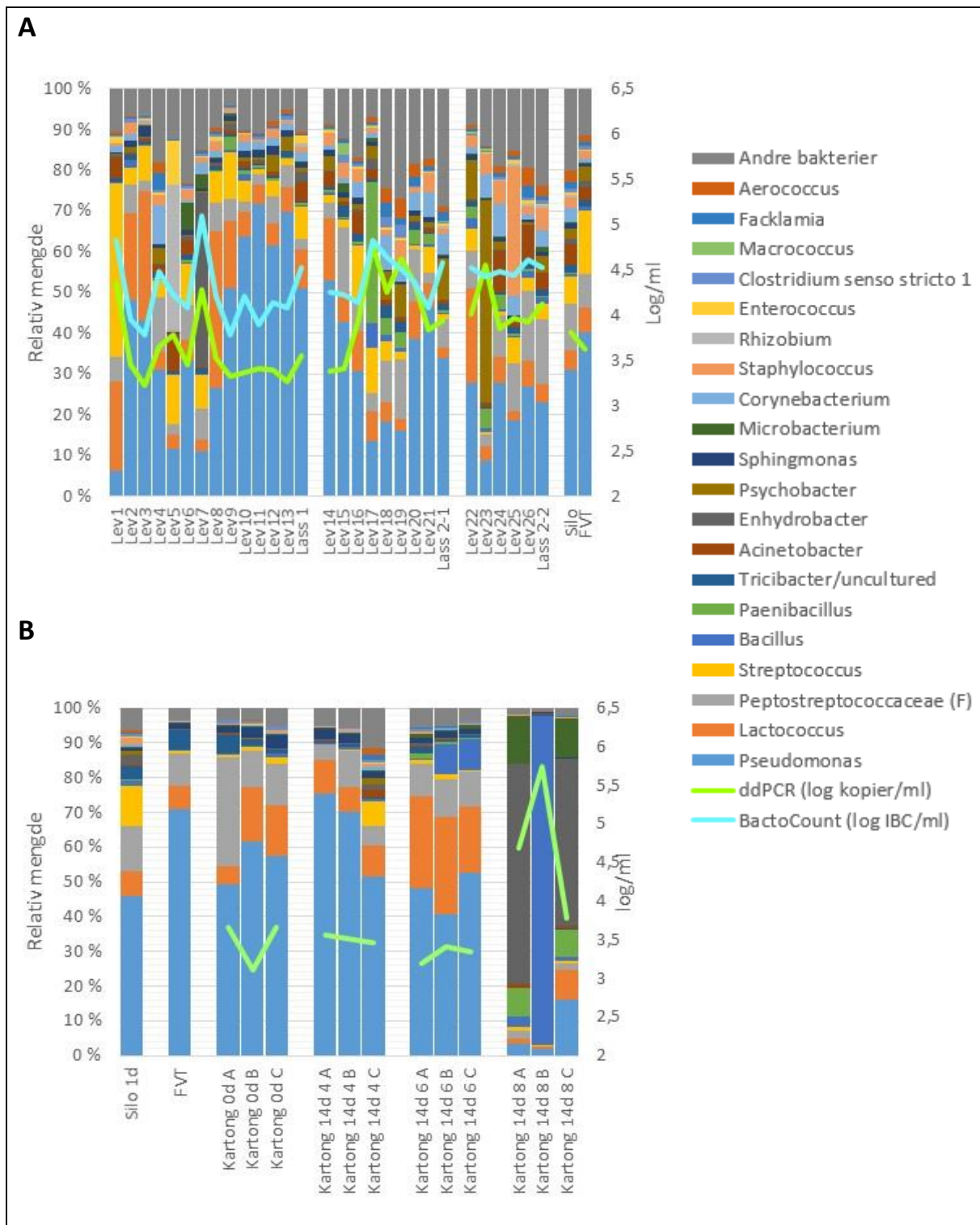
ANOVA, med påfølgende Tukeys post hoc test, ble benyttet for å undersøke forskjellene mellom uttak i leverandørmelk og ved utgått holdbarhet. Sammenligning av temperatur ved utgáttholdbarhet og kartongene fra produksjonsdagen ble også gjort med ANOVA. ANOVA med påfølgende Tukeys post hoc test, ble også benyttet for å analysere effekten av melkesystem på diversiteten.

3. Resultater

3.1. Uttakene

Det ble funnet generelt lite *Bacillus* i leverandørmelk ved første uttak i uke 4 (Figur 3.1A). *Pseudomonas* utgjorde en stor del av mikrobiotaen, sammen med *Lactococcus*, *Peptostreptococaceae* og *Streptococcus*. Noen av leverandørmelks prøvene (Figur 3.1A) skiller seg ut med en annen mikrobiota i melken sammenlignet med resten av leverandørmelken. Ved første uttak skiller blant annet melken fra leverandør 1 seg ut med en høy relativ mengde *Streptococcus* (42.42 % av 4.82 log IBC). Melken fra leverandør 5 og 7 skiller seg ut med høyere relativ mengde av henholdsvis *Rhizobium* (35.74 % av 4.23 log IBC) og *Enhydrobacter* (43.11 % av 5.10 log IBC) enn annen leverandørmelk. Melken fra leverandør 17 skiller seg også ut med høyere andel *Paenibacillus* (34.54 % av 4.83 log IBC), og det er også den leverandøren som ved dette uttaket leverer melk med høyest andel *Bacillus* (6.07 % av 4.83 log IBC). Melken hos leverandør 23 har en høyere andel *Psychrobacter* (49.51 % av 4.43 log IBC) sammenlignet med annen leverandørmelk. De fleste leverandørprøvene som skiller seg ut viser en økning i både ddPCR-verdier og BactoCount-verdier sammenlignet med melken fra andre leverandører.

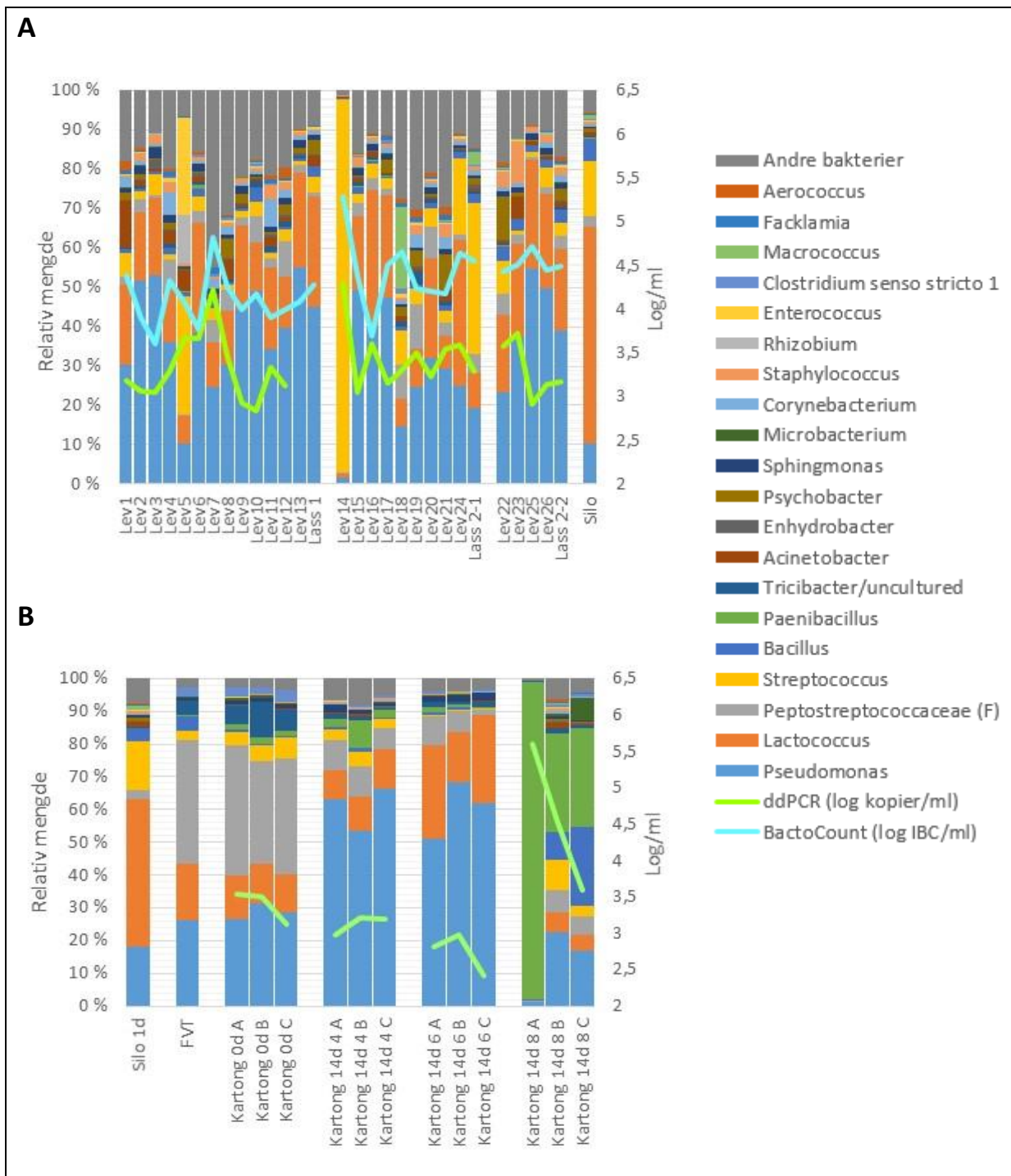
Etter pasteurisering kan det observeres en reduksjon av antall bakterier basert på ved ddPCR-verdier sammenlignet med silotanken (Figur 3.1). Totalt antall bakterier reduseres fra om lag 3.6 log kopier/ml til i underkant av 3.5 log kopier/ml. Kartonger fra produksjonsdagen og kartonger lagret ved 4 °C i 14 døgn viser tilsvarende resultater. Kartongene lagret ved 6 °C i 14 døgn viser en økning i *Lactococcus*, i tillegg til en liten økning av *Bacillus*. Kartongene lagret ved 8 °C i 14 døgn viser derimot en helt annen mikrobiota, hvor en av kartongene domineres av *Bacillus*, mens de to andre har en høy andel av *Enhydrobacter*.



Figur 3.1 Resultater fra uttak 1. Relativ mengde av ulike bakterieslekter er presentert sammen med resultatene fra BactoCount og ddPCR (angitt på sekundæraksen). (A) Illustrerer leverandører, de respektive tankbilene og silotanken som melken til slutt samles på. Alle prøvene i (A) er uten PMA-behandling. (B) Illustrerer mikrobiotaen fra silotanken, ferdigvaretanken (FVT) og kartongene ved produksjonsdag (Kartong 0d) og kartongene lagret ved ulike temperaturer (Kartong 4/6/8). Alle prøver, utenom silo, er med PMA-behandling i (B).

Ved uttak 2 var det også noen melkeprøver fra leverandører som skilte seg ut (Figur 3.2A). Blant annet hadde melken fra leverandør 5 en høyere andel *Streptococcus* (30.05 % av 4.08 log IBC) og *Enterococcus* (24.65 % av 4.08 log IBC). Melken fra leverandør 14 var dominert av *Streptococcus* (94.76 % av 5.28 log IBC), og hadde samtidig høye verdier for både ddPCR og BactoCount. Leverandør 18 skiller seg også ut med en relativt høy andel *Macrooccus* (20.92 % av 4.65 log IBC). Ved dette uttaket var det generelt mer *Lactococcus* tilstede sammenlignet med første uttak. Det ble også ved dette uttaket funnet lite *Bacillus*.

Tilsvarende som ved første uttak reduseres *Streptococcus* etter pasteurisering. I Figur 3.2B kommer det frem at det nok en gang ikke er så stor forskjell i mikrobiota mellom kartong fra produksjonsdagen og kartongene lagret ved 4 °C i 14 døgn. Men det kan observeres noe mer *Paenibacillus* i de lagrede kartongene. Ved 8 °C domineres prøvene av *Paenibacillus* og den relative mengden av *Bacillus* har også økt ved 8 °C sammenlignet med mikrobiotaen funnet i kartongene lagret ved andre temperaturer.



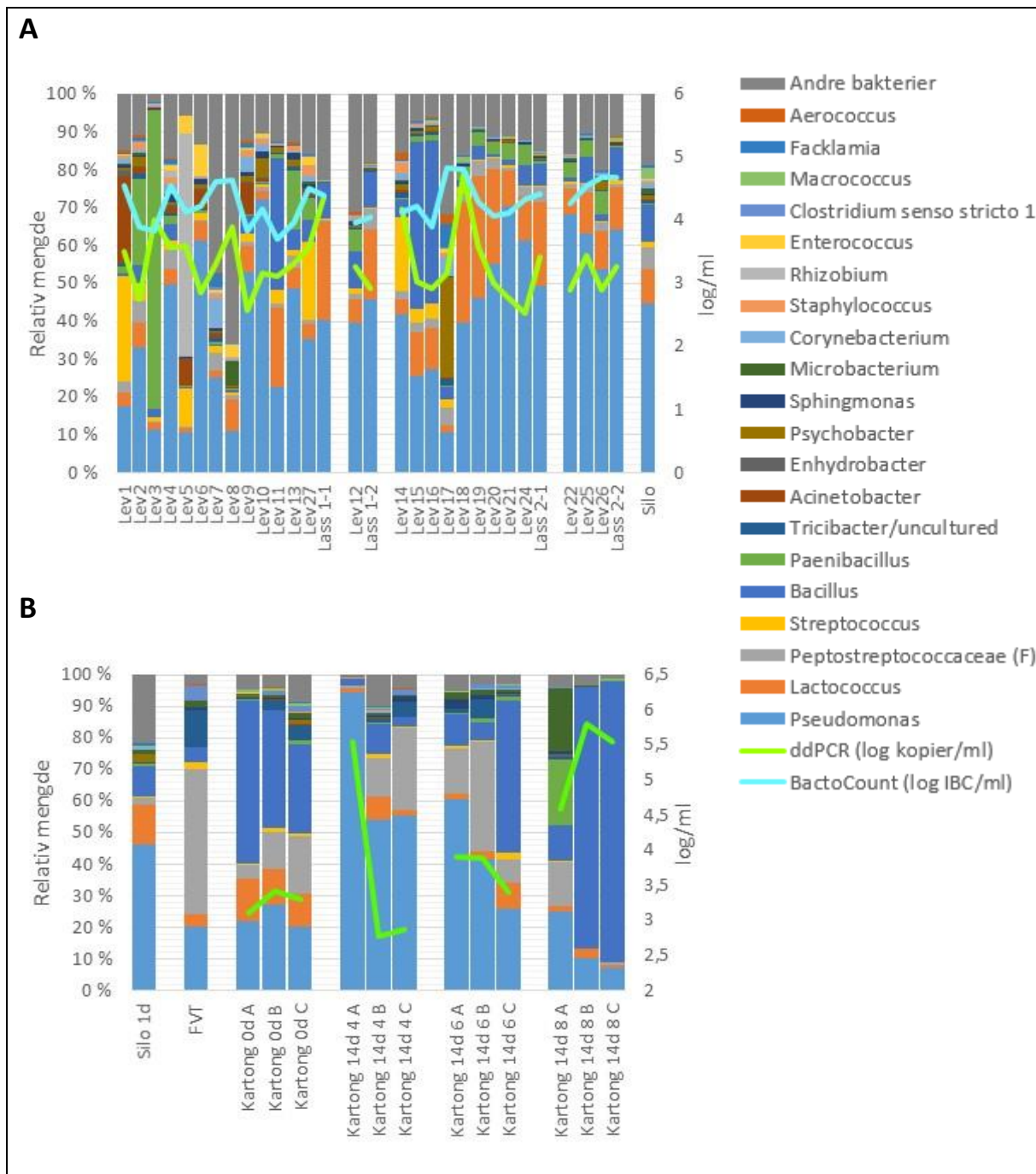
Figur 3.2 Resultater fra uttak 2. Relativ mengde av ulike bakterieslekter er presentert sammen med resultatene fra BactoCount og ddPCR (angitt på sekundæraksen). (A) Illustrerer leverandører, de respektive tankbilene og silotanken som melken til slutt samles på. Alle prøvene i (A) er uten PMA-behandling. (B) Illustrerer mikrobiotaen fra silotanken, ferdigvaretanken (FVT) og kartongene ved produksjonsdag (Kartong 0d) og kartongene lagret ved ulike temperaturer (Kartong 4/6/8). Alle prøver, utenom silo, er med PMA-behandling i (B).

Det ble generelt detektert større mengder *Bacillus* og *Paenibacillus* ved tredje uttak sammenlignet med de to foregående uttakene (Figur 3.3A). Resultater fra ANOVA og Tukeys test er presentert i Tabell 3.1 (leverandører) og 3.2 (holdbarhet). Det ble funnet signifikant større mengde *Bacillus* i leverandørmelken ved uttak 3 sammenlignet med uttak 1 og 2. I Figur 3.3A kan man se at flere av leverandørene skiller seg ut, blant annet melken fra leverandør 3 som domineres av *Paenibacillus* (78.82 % av 3.85 log IBC) og melken fra leverandør 11, 15 og 16 som har relativt store mengder *Bacillus* (henholdsvis 34.93 % av 3.70 log IBC, 44.36 % av 4.23 log IBC og 43.27 % av log 3.90).

I Figur 3.3B ser man også at *Bacillus* finnes i en høyere andel etter pasteurisering ved uttak 3 enn ved de andre uttakene. I kartongene lagret ved 4 °C i 14 døgn er det i motsetning til på produksjonsdagen, lite *Bacillus*. Dette gjelder også for to av kartongene lagret ved 6 °C. I kartongene lagret ved 8 °C er det to av kartongene som domineres av *Bacillus*, mens den siste kartongen har en mer sammensatt mikrobiota hvor både *Bacillus* og *Paenibacillus* er tilstede i betydelige mengder.

Tabell 3.1 Sammenligning av *Bacillus* og *Paenibacillus* i leverandørmelken ved de tre uttakene. Analysert med Tukeys post hoc test for ANOVA.

	Diversitet (Shannon)		Bacillus		Paenibacillus	
	Effekt	P-verdi	Effekt	P-verdi	Effekt	P-verdi
U2-U1	-0.244	0.2237	318.14	0.9451	-520.44	0.9889
U3-U1	-0.500	0.0024**	3841.45	0.0007***	5866.52	0.2505
U3-U2	-0.255	0.1938	1144.88	0.0020**	6386.96	0.1953



Figur 3.3 Resultater fra uttak 3. Relativ mengde av ulike bakterieslekter er presentert sammen med resultatene fra BactoCount og ddPCR (angitt på sekundæraksen). (A) Illustrerer leverandører, de respektive tankbilene og silotanken som melken til slutt samles på. Alle prøvene i (A) er uten PMA-behandling. (B) Illustrerer mikrobiotaen fra silotanken, ferdigvaretanken (FVT) og kartongene ved produksjonsdag (Kartong 0d) og kartongene lagret ved ulike temperaturer (Kartong 4/6/8). Alle prøver, utenom silo, er med PMA-behandling i (B).

For alle uttakene som er presentert i Figur 3.1, 3.2 og 3.3, kan det observeres at mye *Pseudomonas* er tilstede både før og etter pasteurisering. *Lactococcus* er også en av bakterieslektene med høyest tilstedeværelse og denne er også tilstede i prøvene etter pasteurisering.

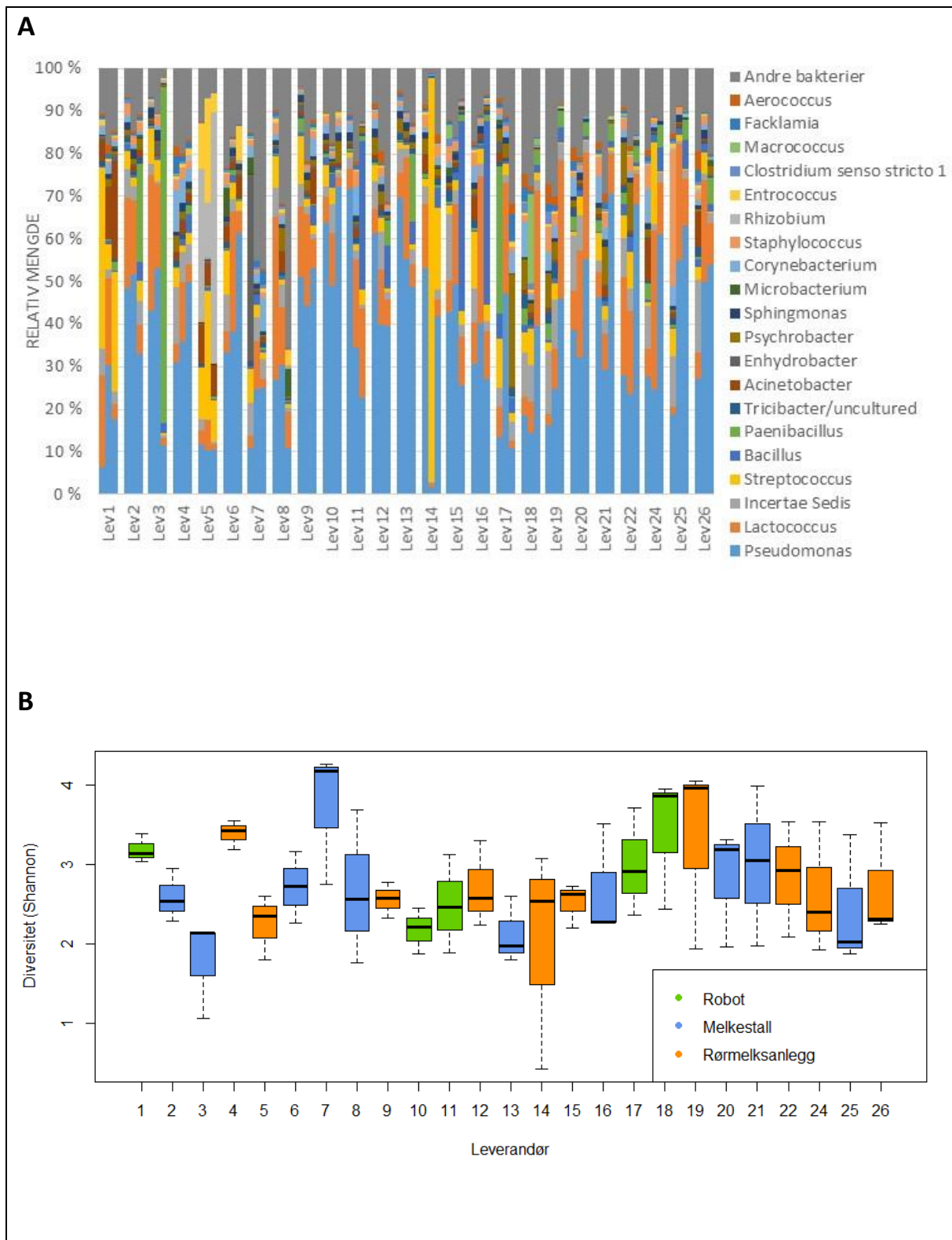
3.2. Leverandørmelk

Leverandørmelken fra de ulike uttakene viste ikke nødvendigvis en stabil mikrobiota innad hos leverandørene. Dette er også illustrert i Figur 3.4, hvor noen av leverandørene viser stabil mikrobiota gjennom hele forsøket, mens andre har større forskjeller mellom uttakene. Melken fra leverandør 5 skilte seg fra annen leverandørmelk med en relativt stabil mikrobiota bestående av blant annet betydelige mengder *Rhizobium* og *Enterococcus*. På artsnivå ble det funnet at arten som tilhørte *Enterococcus*-slekten var *Enterococcus italicus*. *Rhizobium* ble ikke definert på artsnivå.

I Figur 3.4B illustreres variasjonen i diversiteten, basert på shannon, mellom de ulike uttakene. Her kommer det frem at flere av leverandørene har relativt stabil mikrobiota i melken gjennom disse tre uttakene. Dette kan observeres hos leverandør 1, 9 og 15. Melken fra noen av de andre leverandørene viser en større variasjon i diversitet slik som melken fra leverandør 14. Dette kan også observeres i Figur 3.4A ved at den er dominert av *Streptococcus* ved uttak 2, hvor det var *Streptococcus dysgalactiae* det ble funnet mest av.

Ved å gå nærmere inn på flere av bakteriene som ble funnet i leverandørmelken ble det konstantert at *Streptococcus* som ble funnet hos leverandør 1 tilhørte artene *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus uberis* og *Streptococcus dysgalactiae*, hvor førstnevnte ble funnet i størst mengde ved uttak 1 og 3. Ved uttak 2 ble det funnet en relativt stor mengde av *Macroccoccus* i melken fra leverandør 18, arten tilhørende denne slekten som ble funnet i størst mengde var *Macroccoccus caseolyticus*. *Paenibacillus* som det ble funnet mye av i melken fra leverandør 3 ved tredje uttak var av slekten *Paenibacillus pabuli*. Ved uttak tre ble det også funnet en del *Bacillus* i leverandørmelken, disse ble funnet å høre til *B. cereus*-gruppen.

I Figur 3.4B er melkesystem hos leverandørene illustrert med farger i boksplottet. Ved bruk av ANOVA med påfølgende Tukeys test ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller i diversitet mellom melkesystemene (Vedlegg 2).

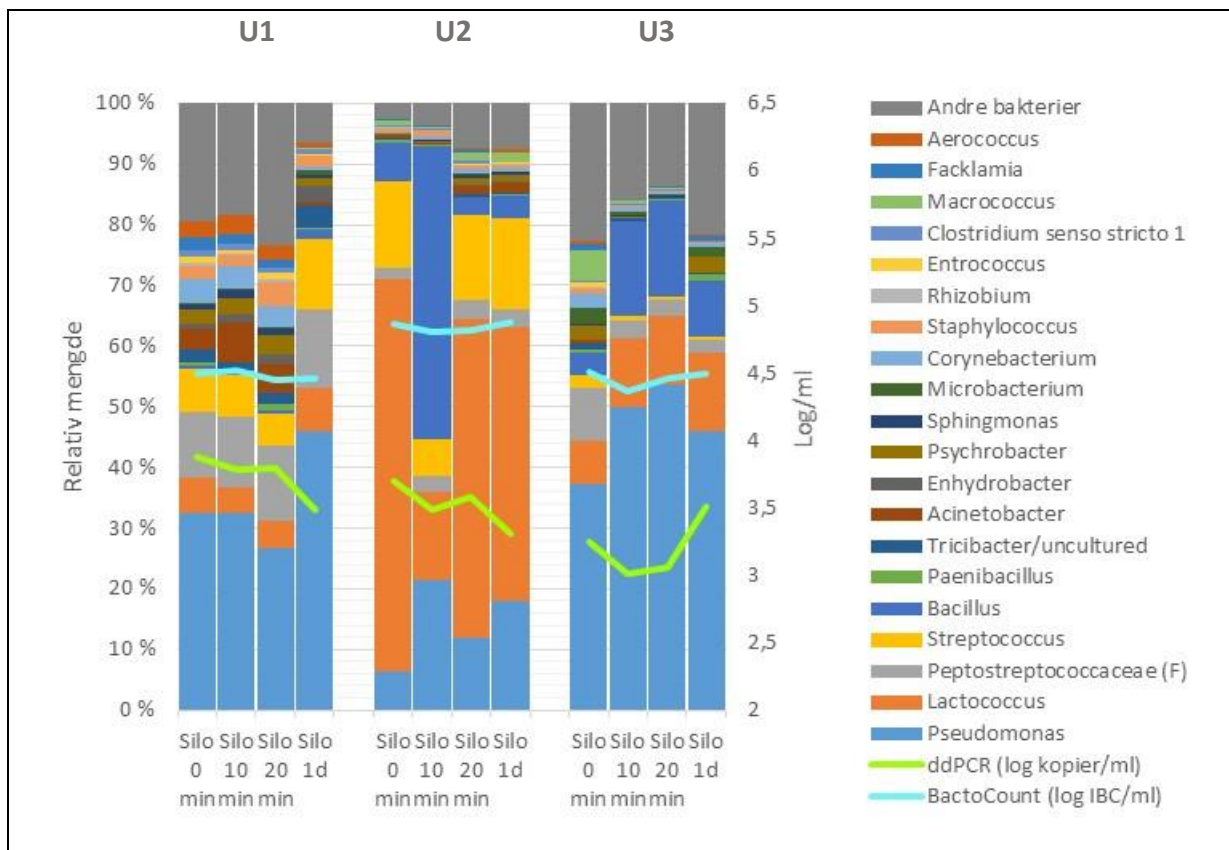


Figur 3.4 Sammenligning av leverandørenes melk fra de tre uttakene. (A) Illustrerer hvordan mikrobiotaen er forskjellig ved uttakene. (B) Illustrerer variasjon i diversiteten, hvor melkesystem er farget.

Ut fra faktorene observert på gård, ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller i diversitet (Shannon) eller mengde bakterier (ddPCR) ved bruk av lineære modeller (Vedlegg 3). Det ble funnet en signifikant sammenheng mellom mengden *Streptococcus* i leverandørmelken og om døren mellom melkerommet og fjøset var lukket. Mengden *Streptococcus* økte ved åpen fjøsdør. Det ble også funnet at *Paenibacillus* økte signifikant i mengde ved manuell vask (Vedlegg 3).

3.3. Prøver fra silotank

Ved første uttak ser det ut til å være en relativt stabil mikrobiota på silotanken, med små variasjoner mellom de ulike prøveuttakene (Figur 3.5). Ved uttak 2 var det derimot det større forskjeller mellom prøveuttakene, prøven tatt ut etter 10 minutter hadde en større andel *Bacillus* sammenlignet med de to andre prøvene og prøven fra produksjonsdagen. Ved uttak 3 var det også noen variasjoner, spesielt inneholdt prøven fra 10 og 20 minutter en høyere andel *Bacillus* sammenlignet med den første prøven.



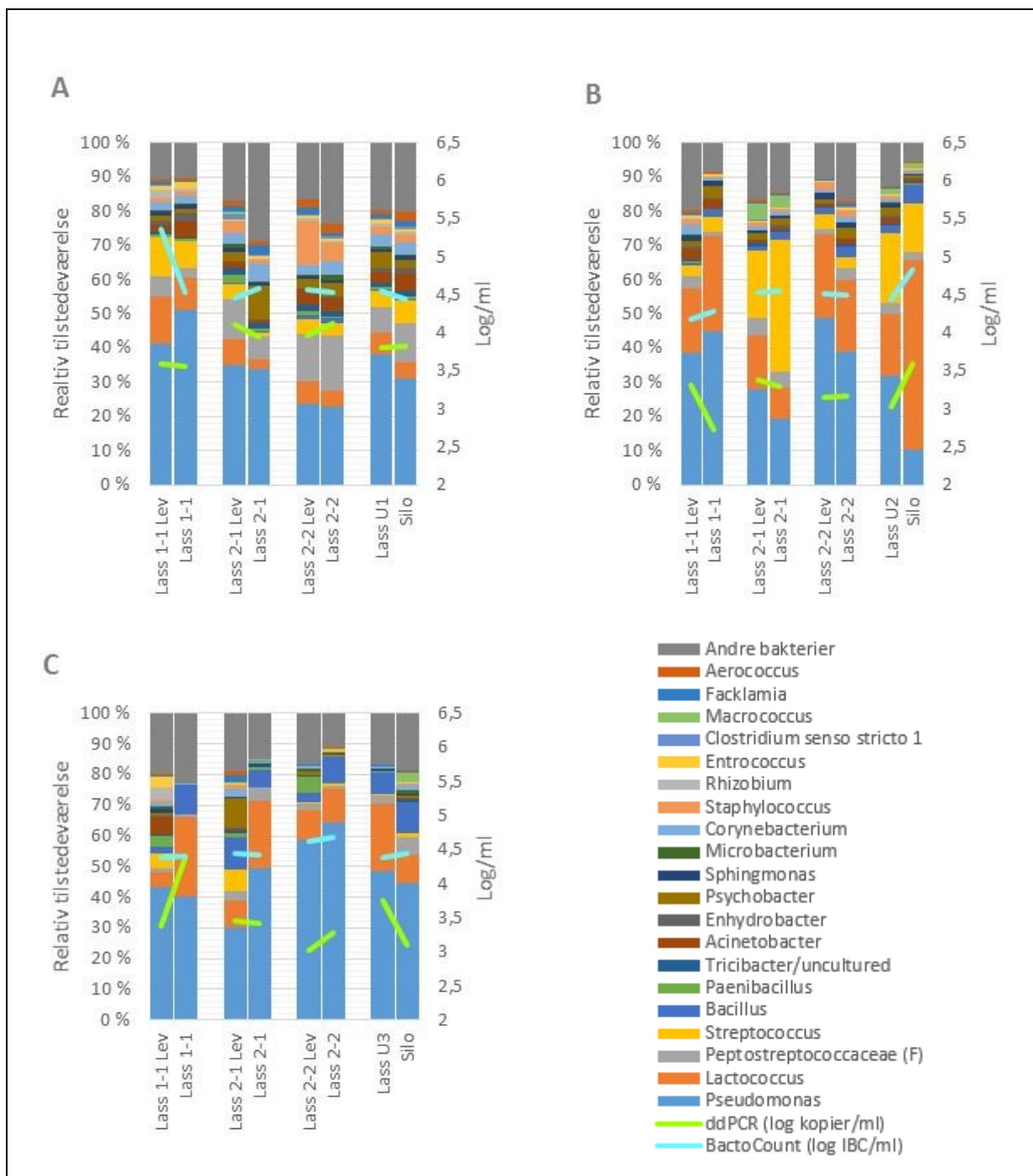
Figur 3.5 Illustrerer mikrobiotaen detektert i prøver tatt ut med 10 minutters mellomrom fra silo, og fra produksjonsdagen (1d). De ulike uttakene er beskrevet med U1 (uttak 1), U2 (uttak 2) og U3 (uttak 3).

3.4. Forventet mikrobiota på tank og silotank

Resultatene i Figur 3.6 viser den forventet mikrobiotaen, basert på gjennomsnittet av leverandørenes melk hensyntatt hvor mye melk de leverer, sammenlignet med den observerte mikrobiotaen på tankbilene. I tillegg vises den forventet mikrobiotaen på silotanken, basert på gjennomsnittet av tankbilene, sammenlignet med den observerte mikrobiotaen.

Resultatene fra uttak 1 er viser at den forventet og den observerte mikrobiotaen samsvarer, både på tankbilene og silotanken (Figur 3.6A). Ved uttak 2 var det større forskjell mellom den forventet og observerte mikrobiotaen (Figur 3.6B). Basert på hva som var forventet, utfra leverandørenes melk, var det mer *Lactococcus* i melken i tankbilen ved Lass 1-1. Ved lass 2-1 var det større mengder *Streptococcus* på tankbilen sammenlignet med hva som var forventet ut fra leverandørprøvene. Den forventet mikrobiotaen på silo viste avvik fra den observerte. Blant annet var mengden *Lactococcus* detektert i siloen høyere enn hva som var forventet basert på mengden detektert på tankbil. Det var også en større andel *Bacillus* på silotank.

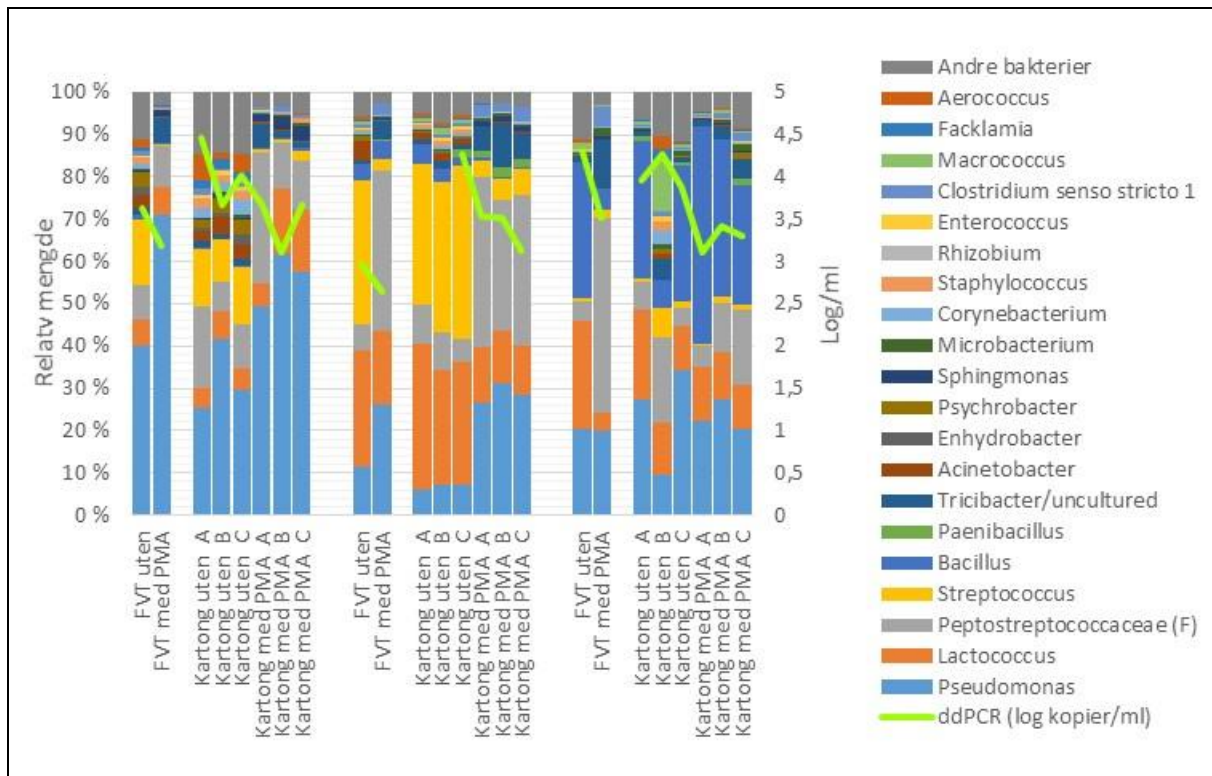
Ved tredje uttak (Figur 3.6C) domineres tankbilene av en mikrobiota bestående av *Pseudomonas*, *Lactococcus* og *Bacillus*. Jevnt over er det mer *Lactococcus* på bilene sammenlignet med hva som var forventet ut fra leverandørerne, og det er denne bakterieslekten som avviker mest ved dette uttaket.



Figur 3.6. Forventet mikrobiota basert på gjennomsnittet av leverandørmelken sammenlignet med mikrobiotaen som ble funnet på tankbil. Her vises også den forventet mikrobiotaen på silotank basert på hva som ble funnet i tankbilene. (A) Uttak 1, (B) Uttak 2 og (C) Uttak 3.

3.5. PMA-behandling

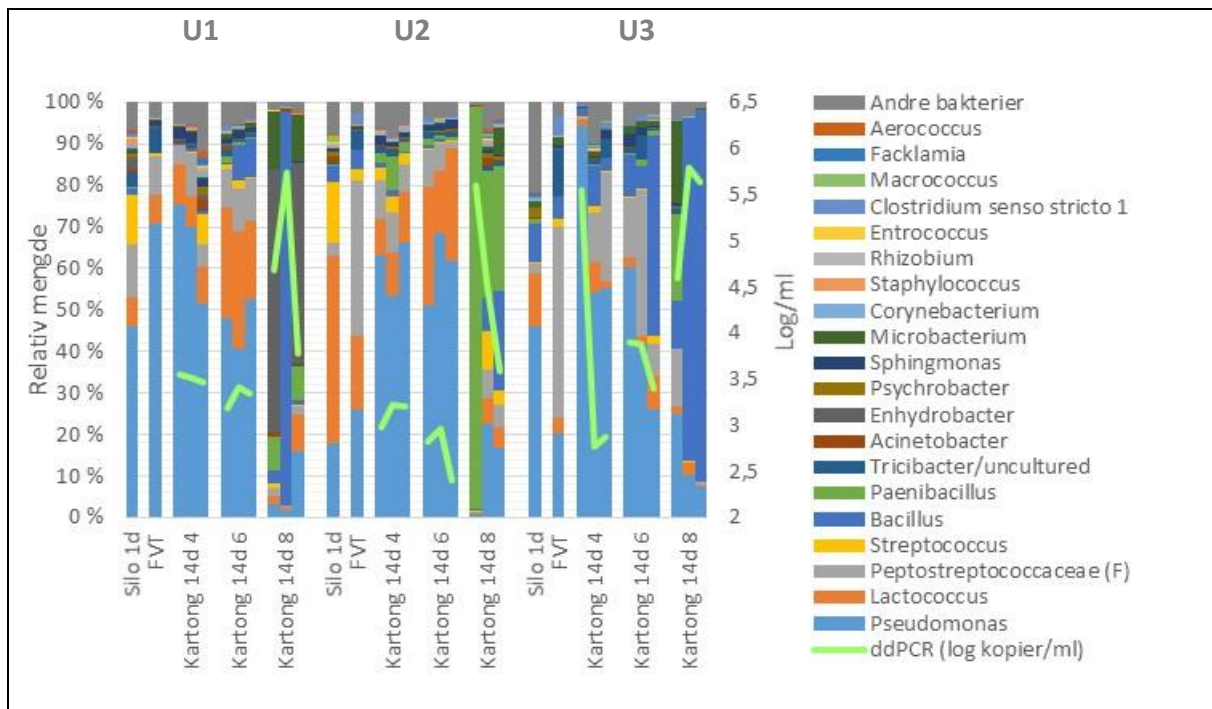
Ved PMA-behandling reduseres andelen av blant andre *Streptococcus* (Figur 3.7). Basert på resultatene presentert i Figur 3.7, kan det se ut som at det er en tendens til at *Lactococcus* også reduseres med PMA-behandling, spesielt i uttak 2, men dette er ingen markant forskjell. I alle prøvene reduseres ddPCR ved PMA-behandling, vanligvis er reduksjonen i underkant av 1 log kopier/ml. *Pseudomonas* og *Peptostreptococcaceae* har en økning i relativ mengde når prøvene er behandlet med PMA.



Figur 3.7. Illustrerer mikrobiotaen i ferdigvaretanken (FVT) og kartong fra produksjonsdag med og uten PMA-behandling. Reduksjon i antall bakterier detektert med ddPCR er vist på sekundæraksen.

3.6. Holdbarhet ved uttakene

Mikrobiotaen ved utgått holdbarhet viste noen forskjeller mellom uttakene (Figur 3.8). Her ser man at uttak 1 og 2 er relativt like ved 4 og 6 °C, mens det ved 8 °C er en annen mikrobiota. *Paenibacillus* dominerte mikrobiotaen i kartonger ved 8 °C i uttak 2. I kartongene lagret ved 4 °C var det også mer *Paenibacillus* sammenlignet med uttak 1. Uttak 3 skiller seg fra resten ved et høyt innhold av *Bacillus*.



Figur 3.8. Sammenligning av mikrobiotaen ved utgått holdbarhet ved 4, 6 og 8 °C fra de tre uttakene. Prøve fra siloen tatt på produksjonsdagen (1d) og ferdigvaretanken (FVT) er også inkludert. Alle prøver, utenom silo, er PMA-behandlet.

Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom diversiteten i melken ved utgått holdbarhet fra de ulike uttakene, uavhengig av temperatur. Det ble derimot funnet signifikante forskjeller av *Bacillus* (Tabell 3.2). *Bacillus* ble funnet i signifikant høyere mengde ved uttak 3 sammenlignet med uttak 2. *Paenibacillus* viste en tendens til å ha høyere mengde i uttak 2 sammenlignet med de to andre uttakene ved utgått holdbarhet.

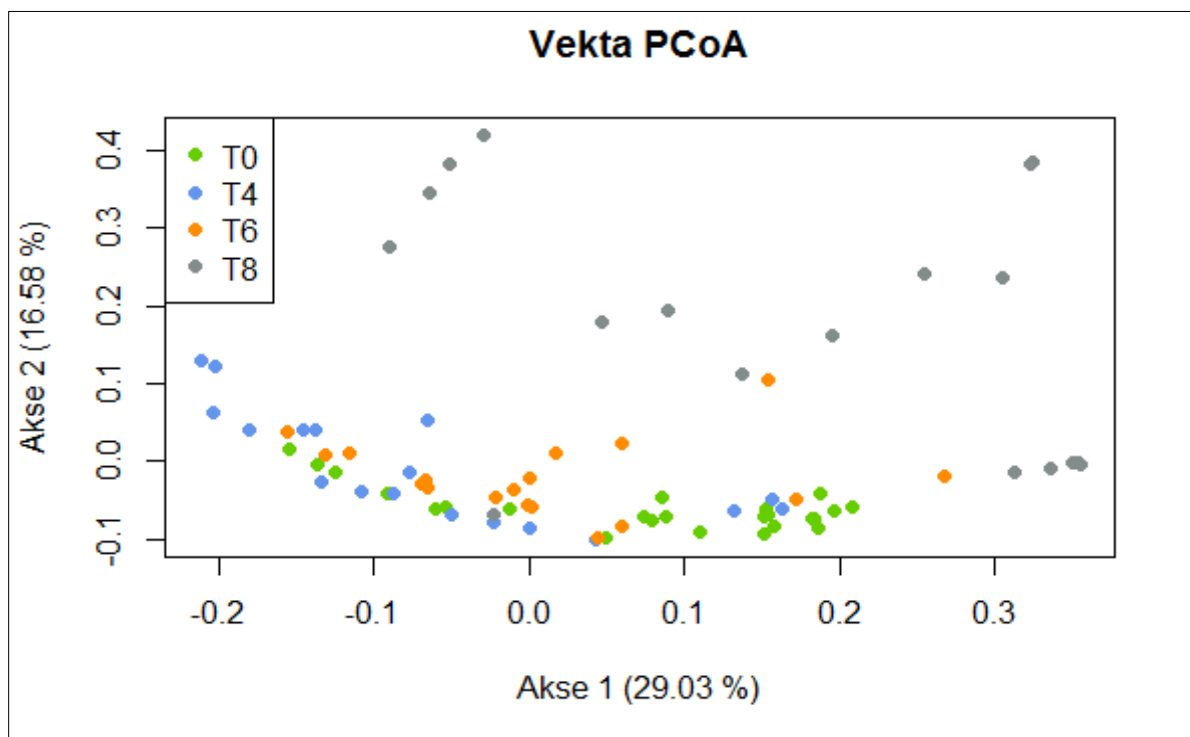
Paenibacillus som ble funnet ved utgått holdbarhet ved 8 °C i uttak 2 viste seg å være av slekten *P. pabuli*. *Bacillus* som dominerte ved utgått holdbarhet tilhørte *B. cereus*-gruppen.

Diversiteten (Shannon) ved 8 °C var signifikant lavere enn ved 4 og 6 °C. Det var også signifikant mer *Bacillus* ved 8 °C, sammenlignet med de andre lagringstemperaturene.

Tabell 3.2. Resultater fra Tukeys post hoc test basert på ANOVA av Shannon, *Bacillus* og *Paenibacillus* ved utgått holdbarhet ved de ulike uttakene og ved temperaturene 4, 6 og 8 °C.

Uttak						
	Shannon		Bacillus		Paenibacillus	
	Effekt	P-verdi	Effekt	P-verdi	Effekt	P-verdi
U2-U1	-0.299	0.54071	-8344.84	0.95657	74766.13	0.05881'
U3-U1	-0.492	0.19695	70802.65	0.05059'	2273.41	0.99721
U3-U2	-0.193	0.77268	79147.49	0.02546*	-72492.72	0.06899'
Temperatur						
	Shannon		Bacillus		Paenibacillus	
	Effekt	P-verdi	Effekt	P-verdi	Effekt	P-verdi
T6-T4	0.079	0.95221	8441.41	0.95278	5212.24	0.98559
T8-T4	-0.657	0,04465*	91583.05	0.00630**	72518.54	0.07118'
T8-T6	-0.767	0.02145*	83141.64	0.01419*	67306.29	0.10079

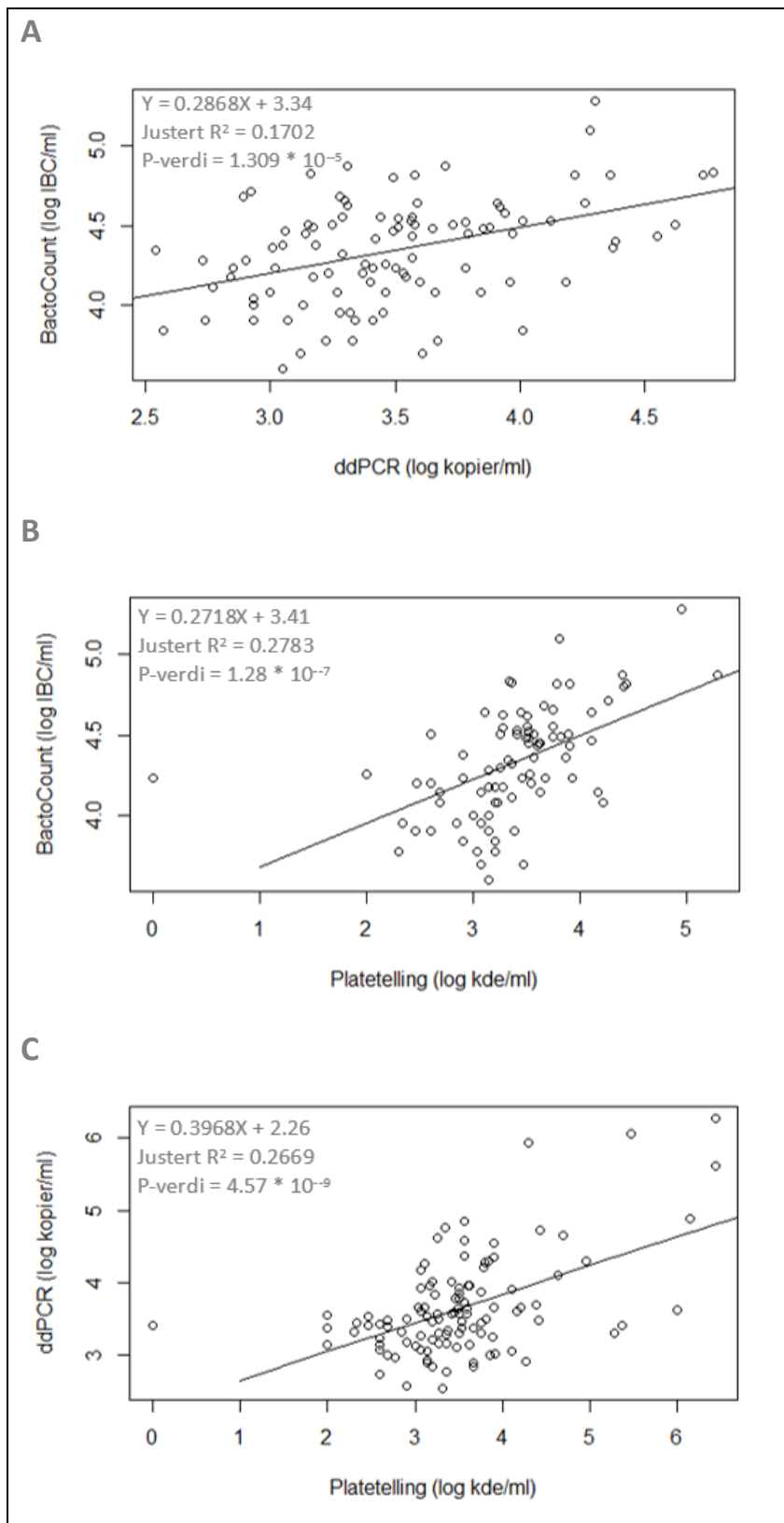
Samtlige prøver av kartonger ble sammenlignet med vekta PCoA (principal coordinate analysis), dette er presentert i Figur 3.9. Dette illustrerer avstanden mellom kartongene basert på deres mikrobiota og mengden av bakterieslektene detektert i de ulike prøvene. Kartongene lagret ved 8 °C skilte seg ut i PCoA-plottet. Disse kartongene skilte seg også signifikant ut i diversitet (Shannon) fra de resterende prøvene (Vedlegg 4).



Figur 3.9. Scatterplot basert på vekta PCoA av samtlige kartonger. T0 representerer kartongene fra produksjonsdagen, mens kartongene lagret ved 4, 6 og 8 °C er illustrert ved henholdsvis T4, T6 og T8.

3.7. Sammenligning av metodene for å kvantifisere bakterier

Alle kvantifiserings metodene ble funnet å ha en signifikant sammenheng, men den forklarte variasjonen i de lineære modellene var relativt lav for alle de tre sammenligningene (Figur 3.10). Variasjonen forklart av den lineære modellen mellom BactoCount og ddPCR var 17.02 %. Forklaringsprosenten mellom BactoCount og platetelling var 27.83 %. Den lineære modellen mellom platetelling og ddPCR ga en forklaringsprosent på 26.69 % ($\sqrt{R^2} = r =$ korrelasjon).



Figur 3.10. Lineære modeller for sammenligning av BactoCount, ddPCR og Plattetelling.

4. Diskusjon

4.1. Leverandører og uttak

Studier gjort på rå melk viser at mikrobiotaen oftest domineres av melkesyrebakterieslektene *Lactococcus*, *Lactobacillus* og *Streptococcus*, hvor *Streptococcus* og *Lactococcus* er de viktigste slektene (Masoud et al. 2011; Quigley et al. 2013a). I tillegg til disse melkesyrebakteriene har *Pseudomonas* også blitt funnet i relativt høy andel i irsk rå melk (Quigley et al. 2013a). Resultatene i denne oppgaven samsvarer med tidligere studier, hvor det først og fremst er *Pseudomonas* og *Lactococcus* som dominerer, men ved flere tilfeller er det også mye *Streptococcus* tilstede. I denne oppgaven var det *Pseudomonas* som ble funnet å ha høyest andel. Dette avviker noe fra litteraturen, hvor melkesyrebakterier generelt er rapportert å ha den høyeste andelen i rå melk fra ulike lokasjoner og med ulike deteksjonsmetoder (Quigley et al. 2013b). *Pseudomonas* er en uønsket bakterie i melk, både før og etter pasteurisering, på grunn av deres evne til å vokse under betingelsene i en kjølekjede og deres evne til å produsere varmem stabile enzymer som degraderer komponenter i melken, og dermed kan gi usmak (Chen et al. 2003). *Pseudomonas*-arter er i stand til å produsere ekstracellulære enzymer som proteinase, fosfolipase og lipase som spiller viktige roller i kvalitetsforringelse (Dogan & Boor 2003). Ikke alle *Pseudomonas* har like aktiv enzymproduksjon (Dogan & Boor 2003), men når de er tilstede utgjør de en kvalitetsforringende trussel, spesielt i forhold til forlengelse av holdbarhetsperioden.

I denne oppgaven ble ikke *Lactobacillus* funnet blant de 20 bakteriene med høyest tilstedeværelse noe som var litt overraskende basert på at denne slekten er beskrevet som en av de vanligste slektene i rå melk (Quigley et al. 2013b).

Peptostreptococcaceae ble funnet i relativt høy andel i mange avmelkeprøvene fra leverandørene. Det er lite litteratur på *Peptostreptococcaceae* i kumelk, men dette er en familie med bakterier som finnes i blant annet husdyrgødsel (Slobodkin 2014). *Peptostreptococcaceae* er ikke rapportert i store mengder i prøver av rå melk, men i et studie fra Australia dominerte *Peptostreptococcaceae* på en av de to gårdene det ble tatt prøve av (Lo et al. 2016).

Resultatene fra denne oppgaven viser en del variasjon mellom leverandørene og mellom uttakene. Noen av leverandørmelk prøvene har en mikrobiota som ligner hverandre, mens andre leverandørmelk prøver skiller seg ut. Årsaken til at noen av prøvene av leverandørmelk skiller seg fra resten kan trolig forklares gjennom praksisen på gårdene knyttet til melking, renhold og vedlikehold av anlegget. Disse faktorene har vist seg å være noen av de viktigste som påvirker

rå melk kvaliteten (Gleeson et al. 2013; Verdier-Metz et al. 2009; Zdanowicz et al. 2004). Dårlig vedlikehold av anlegg kan lettere resultere i biofilm i melkeanlegget og kan gi opphav til kontaminasjoner (Gleeson et al. 2013). Ingen av observasjonene gjort i melkerommet viste noen signifikant effekt på diversiteten av mikrobiota i melkeprøvene. I denne oppgaven ble det kun observert faktorer fra melkerommet, uten at faktorer rundt melking og renhold av dyr, anlegg og fjøs ble inkludert. Variasjonen i rå melk kvalitet mellom leverandørene kan trolig i stor grad forklares av faktorer i fjøset, ettersom disse momentene har vist seg å ha stor innvirkning på melkekvaliteten (Gleeson et al. 2013).

Noen av leverandørene leverer rå melk med stabil diversitet gjennom disse tre uttakene, mens andre har en varierende diversitet i melken. Ettersom det i denne oppgaven kun var tre uttak, trenger ikke denne variasjonen i diversitet være representativ for leverandørens melk. Hvis et av disse uttakene var et avvik, med for eksempel ei ku med mastitt eller en feil på melkeanlegget vil dette resultere i stor variasjon i resultatene. For å undersøke om leverandørene leverer stabil melkekvalitet, eller diversitet trengs det flere uttak av hver leverandør gjennom hele året.

Leverandørmelken ga en indikasjon på at praksisen på gården har innvirkning på rå melk kvaliteten. Slik som det ble observert for *Streptococcus*, hvor åpen fjøsdør resulterte i signifikant mer *Streptococcus* i leverandørmelken. Dette kan ha sammenheng med at det i fjøsmiljøet er en høyere tilstedeværelse av både *Streptococcus* og *Staphylococcus* enn det er utendørs (Matković et al. 2007). Det kan også være betydelige mengder med *Bacillus* i luften både utendørs og innendørs (Matković et al. 2007). Det har blitt rapportert at luft fra stall/fjøsområdet kan være en av de viktigste kontaminasjonskildene sammen med forurensede spener (Vacheyrou et al. 2011).

Faktorene observert på gård avslørte også en signifikant sammenheng mellom *Paenibacillus* i leverandørmelken og vask av gårdstanken, hvor *Paenibacillus* økte ved manuell vask. Dette kan ha sammenheng med at manuell vask er mindre standardisert enn automatisk, noe som kan resultere i variasjon av vaskens effektivitet og dannelse av biofilm kan lettere forekomme. Samtidig er disse resultatene usikre på grunn av at det er mye variasjon i melken mellom leverandører, men også innad hos samme leverandør. Dette gjør at det blir mye uforklart variasjon i datasettet, så det ville vært nyttig med flere uttak av hver leverandør.

Mengden *Bacillus* varierte betydelig i leverandørmelken mellom uttakene, hvor tredje uttak skilte seg signifikant fra de to andre. Ettersom dette var en tendens i flere av leverandørmelk prøvene, kan dette ha sammenheng med en felles faktor, slik som eksempelvis temperaturen i været eller lignende. Kanskje var det høy temperatur den dagen gårdstanken ble vasket slik at

hvis det var biofilm tilstede i tanken kan disse ha fått gode vekstvilkår og rukket å formere seg mer enn vanlig før tanken ble kjølt ned. Basert på resultatene i denne oppgaven er dette vanskelig å si noe om, og videre forskning er nødvendig for å kunne finne årsak til slik variasjonen. Det er kjent at *Bacillus* varierer med årstid/season, hvor man detekterer mest *Bacillus* i sommer halvåret (Bartoszewicz et al. 2008). Hovedårsaken til denne endringen er beitesesongen hvor spene kontamineres med jord som inneholder store mengder sporer (Christiansson et al. 1999). En medvirkende faktor kan kanskje også være økt temperatur i omgivelsene som kan resultere i at *Bacillus* lettere vil vokse opp på tomme gårdstanker, tankbiler og silotanker hvis vask ikke har vært tilstrekkelig.

Mikrobiotaen i rå melk fra noen av leverandørene skilte seg ut sammenlignet med resten av leverandørprøvene. Leverandør 5 hadde melk med et høyt innhold av blant annet *Rhizobium* og *E. italicus*. *Rhizobium* er en bakterie slekt som ofte er assosiert med planter (Young et al. 2001). Disse er blant bakterieslektene som fikserer nitrogen fra atmosfæren og lever i symbiose med en del planter i erteblomstfamilien, deriblant kløver (van Rhijn & Vanderleyden 1995). Det er lite litteratur som referer til at denne er funnet i melk. Trolig bruker denne leverandøren kløverholdig fôr slik at *Rhizobium* kommer inn i fjøsetmiljøet gjennom fôret. Alternativt kan det være en stamme som har etablert seg i fjøsmiljøet, i for eksempel fôrrester. *E. italicus* ble også funnet i relativt store mengder i melken levert fra denne leverandøren. *Enterococcus* er en omstridt melkesyrebakterieslekt som også inneholder noen patogene bakterier, men *E. italicus* utgjør ingen helsefare (Fortina et al. 2008). *Enterococcus* er ofte assosiert med melk og meieriprodukter, med *Enterococcus faecalis* og *Enterococcus faecium* som de vanligste slektene, men *E. italicus* er heller ikke unormal å finne i melk (Quigley et al. 2013b). Slekten *Enterococcus* benyttes til fermentering på grunn av dens proteolytiske og lipolytiske aktiviteten (Quigley et al. 2013b). I konsummelk kan slike egenskaper utgjøre et problem i forhold til uønsket nedbryting av melkens komponenter. I dette tilfellet kan det også tyde på at denne bakterien har etablert seg i fjøsmiljøet hos leverandøren ettersom den blir funnet i betydelige mengder gjentatte ganger.

Det ble også hos leverandør 18 ved uttak 2 funnet større mengder *Macrocooccus* av arten *M. caseolyticus* i melken sammenlignet med melk fra de andre leverandørene. Denne bakterien har også tidligere blitt isolert fra melk, og er nært beslektede med patogene bakterier fra både slektene *Bacillus* og *Staphylococcus* (Baba et al. 2009). *M. caseolyticus* er ikke ansett for å være patogen fordi den mangler virulensgenene som er assosiert med *Bacillus* og *Staphylococcus* (Baba et al. 2009). Dette er en bakterieart som innehar evnen til å produsere enzymer som

hydrolysere og destabiliserer kaseinet (Schleifer et al. 1982). Dette kan resultere i koagulering under lagring og denne bakterien utgjør derfor et kvalitetsproblem hvis den overlever pasteuriseringen. Trolig utgjør denne bakterien et lite problem, siden den har en optimumstemperatur på 35 °C (Randazzo et al. 2002), og vil derfor vokse dårlig ved en kjølekjede. I denne oppgaven ble det ikke funnet betydelige mengder av denne bakterien etter pasteurisering eller ved lagring av kartonger ved de ulike temperaturene. Det kan dermed tyde på at den fjernes ved pasteurisering. Samtidig ble *M. caseolyticus* kun detektert i betydelige mengder ved et uttak i rå melken fra én leverandør, noe som kan tyde på at det er et avvik som resulterte denne økte forekomsten.

Flere av leverandørene, blant annet leverandør 1 og 14, hadde relativt store mengder *Streptococcus* i melken. Ved nærmere undersøkelse viste det seg å være *Streptococcus* av artene *S. dysgalactiae*, *S. paraubris* og *S. ubris*, som alle er assosiert med mastitt hos storfe (Riffon et al. 2001). Det kan dermed tyde på at leverandørene som leverte denne melken kan ha hatt ett eller flere dyr som hadde mastitt. Det kunne vært interessant å sett disse resultatene i sammenheng med celletallet i melken, som øker ved mastitt (Harmon 1994). Melk fra leverandør 14 var ved uttak 2 dominert av *S. dysgalactiae*, og ved uttak 3 (2 uker senere) var det fremdeles relativt store mengder av samme bakterie. Noe som kan tyde på manglene eller utilstrekkelig behandling, men det kan også være andre årsaker, som blant annet ny mastittinfeksjon.

Det kan se ut til at mikrobiotaen i melk kan si en del om forholdene på gården og tilstanden på dyrene, men mye av dette blir kun spekulasjoner uten mer informasjon. Miljøprøver fra leverandørene og deres praksis rundt melking og renhold kunne vært med å beskrive mer av den observerte variasjonen.

4.2. Siloprøver

Melkeprøvene tatt av silotankene med 10 minutters mellomrom viste noe varierende resultater ved de to siste uttakene, mens første uttak viste en stabil mikrobiota. Disse resultatene gir en indikasjon på at én prøve ikke nødvendigvis er representativ for hva som befinner seg på hele silotanken som rommer 70 000 L, og som ved disse uttakene var fylt med om lag 45 000 L.

Årsaken til variasjonene observert i siloprøvene kan være mange. Trolig kan noe av variasjonen skyldes biofilm hvor bakterier løsner som følge av røring og bevegelse i melken. I denne oppgaven ble prøvene tatt ut rett etter at all melken var samlet på silotanken, etter 10 minutter og etter 20 minutter. Melken har derfor ikke stått på silotanken over en lengre periode og fått

tid til å stabilisere seg. Ved andre uttak var melkeprøven tatt ved 20 minutter og dagen etter relativt like, noe som kanskje kan tyde på at etter 20 minutter har mikrobiotaen i melken fått tid til å stabilisere seg. Dette vil blant annet avhenge av når rørverket starter og mengde melk som er på tanken. Det kan derfor være interessant å studere mikrobiotaen i silotank nærmere, og undersøke hvor lang tid det tar for mikrobiotaen stabiliserer seg.

4.3. Forventet og observert mikrobiota på tankbil og silotank

Resultatene fra Figur 3.7 ga en indikasjon på om det var biofilm på tankbiler og silotanker eller ikke. Ved første uttak samsvarte den forventet og den observerte mikrobiotaen i melka, i motsetning til ved de to andre uttakene. Det kan dermed tyde på at det har blitt dannet biofilm på tankbil og/eller silotanken ved de to siste uttakene. Mange bakterier har evne til å danne biofilmer, noe som beskytter dem mot ytre faktorer slik som desinfeksjonsmidler (Simões et al. 2010). Både silotanker og tankbiler er laget av rustfritt stål som bakteriene er i stand til å feste seg til (Marchand et al. 2012). Biofilm er en utfordring i forbindelse med kvalitetsforringende bakterier, men gir også fare for økt forekomst av patogene bakterier slik som *S. aureus* og *B. cereus* (Marchand et al. 2012).

Det ble observert en tendens til at *Lactococcus* og *Bacillus* skiller seg fra den forventet mikrobiotaen i melken både på silotank og tankbiler, noe som kan tyde på at disse utgjør en stor del av en eventuell biofilm. Både *Bacillus* og *Lactococcus* er slekter som er i stand til å danne biofilm på prosessutstyr, rør og tanker i meierier (Kives et al. 2005). Sharma og Anand (2002) fant at *Bacillus*-slekten dominerte i biofilmer isolert fra to meierianlegg. I disse biofilmene var det også høy tilstedeværelse av *Lactococcus*, sammen med blant annet *Streptococcus* og *Lactobacillus*. Å ha en biofilm som inneholder *Bacillus* er uheldig, ettersom disse er sporedannende og utgjør en kvalitetsforringende utfordring, men de er også en utfordring i forhold til helseaspektet. I holdbarhetsprøvene på kartong hvor *Bacillus*-slekten dominerte, ble det funnet at det var bakterier tilhørende *B. cereus*-gruppen som var til stede. I tillegg kan slik biofilm være vanskelig å bli kvitt. Det er rapportert at *B. cereus* sporer etablert i en silotank kan tåle varme basiske (pH>13) og varme sure (pH<1) vaskemidler (Shaheen et al. 2010).

Biofilm, som resultatene tyder på at er tilstede i silotank og tankbiler, er ikke funnet å være et gjentakende problem på silotank (ikke nødvendigvis benyttet samme silotank ved alle uttak) eller på tankbilene. Likevel er det noen likhetstrekk. Ved uttak 2 kan det se ut til at det er en biofilm på silotanken, noe som korresponderer med variasjon i siloprøvene nevnt tidligere. Det er tilstedeværelse av bakterieslektene *Bacillus* og *Lactococcus* som skiller seg ut på silotanken ved uttak 2, hvor det også ble observert en økning i både ddPCR og BactoCount resultater. De

samme slektene skiller seg også ut på tankbilene ved uttak 3. En mulig forklaring kan være at det har vært noen små problemer med vasken som har resultert i redusert effekt, slik som feil konsentrasjon av vaskemiddel. Dette er noe som blir nøye kontrollert og vedlikeholdt på anlegget. Forskjellene i forventet og observert er gjentakende for bakterieslektene *Bacillus* og *Lactococcus* og kan dermed tyde på at det er en felles nevner for disse avvikene. Dette bør undersøkes nærmere for å avdekke årsaken til slike avvik og eventuelle feil som forårsaker dem.

Når man sammenlignet forventet mikrobiota basert på melk fra leverandørene og hva som i realiteten ble funnet på tankbilen, kan noe av variasjonen kanskje forklares av prøveuttaket på tankbilen. Prøveuttaket på tankbilen er små kraner som tapper melk fra hvert skott. For å få en representativ prøve forutsetter dette at tankbilsjåføren tar ut tilsvarende mengde fra alle skottene så sant alle skottene inneholder like mye melk. Dette er trolig med på å gi noe variasjon i prøvene.

Biofilm i et anlegg kan variere fra dag til dag, og trenger derfor ikke gi opphav til en stabil mikrobiota ved for eksempel utgått holdbarhet (Cherif-Antar et al. 2016). Selv om det i denne oppgaven ikke observeres en stabil mikrobiota kan det likevel være biofilm tilstede. Resultatene gir en indikasjon på at det kan være biofilm på tankbilene og siloene, og bakteriene som skiller seg ut er de samme.

4.4. Pasteurisering og PMA

PMA-behandling illustrer hvordan pasteuriseringen har påvirket mikrobiotaen siden døde bakterier ekskluderes ved at PMA binder seg til dsDNA (Nocker et al. 2006). Ved undersøkelse av prøvene av rå melk er det satt som en forutsetning at det ikke er noen betydelige mengder med døde celler i melken før pasteurisering. For å kunne observere endringene i mikrobiota før og etter pasteurisering i denne oppgaven, er det en forutsetning at PMA-behandlingen har fungert optimalt.

Slik som Quigley et al. (2013a) beskriver fjernes ikke alle *Pseudomonas* ved pasteurisering, men de reduseres. I Figur 3.7 vises det en økning i relativ mengde av *Pseudomonas* i melkeprøvene fra uttak 1 og 2, mens ddPCR totalt reduseres med om lag 1 log kopier/ml. Heller ikke *Lactococcus* og *Streptococcus* elimineres ved pasteuriseringen, men de reduseres i andelen, og har dermed en større reduksjon enn *Pseudomonas*. Etersom *Pseudomonas* er en psykrotrof bakterieslekt skulle man forvente at den elimineres med pasteuriseringen. Disse bakteriene går trolig i en form for dvale (VBNC) som gjør dem mer robuste mot ytre påvirkning

slik som temperaturøkningen under pasteurisering (Fakruddin et al. 2013; Oliver 2010). Flere ikke-sporedannende bakterier har denne evnen (Fakruddin et al. 2013).

Bakteriene fra *Bacillus*-slekten reduseres totalt sett, men andelen av mikrobiotaen endres ikke betydelig. Ettersom dette er en slekt med sporedannende bakterier var det forventet at en del av disse ville overleve pasteuriseringen. De vegetative cellene dør under pasteurisering, mens endosporene tåler denne temperaturbehandlingen og kan germinere ved kjølelagringen (Logan 2012). Trolig kan noe av reduksjon som observeres for *Bacillus*-slekten forklares med at det hovedsakelig er sporer igjen i melken etter pasteurisering, og disse kan underestimeres som følge av at DNA ekstraksjon forutsetter at sporene lyseres. Lysering av sporer er mer krevende enn for bakterier, men det er vist at en kombinasjon av for eksempel kjemisk lysering og bead-beat homogenisering har gitt gode resultater (Saikaly et al. 2007).

En annen bakterie som økte i relativ mengde etter pasteurisering hører til familien *Peptostreptococcaceae*. Den ble ikke klassifisert til slektsnivå på grunn av usikkerhet rundt hvilken av slektene i denne familien som var tilstede (*incertae sedis*). Bakterier fra denne familien ble også funnet i relativ høyer forekomster i melk levert fra mange av leverandørene. *Peptostreptococcaceae*-familien omfavner de anaerobe bakterieslektene *Peptostreptococcus*, *Acetoanaerobium*, *Filifactor*, *Proteocatella*, *Sporacetigenium* og *Tepidibacter* (Slobodkin 2014). Dette er slekter med varierende morfologi, men slektene *Filifactor*, *Proteocatella*, *Sporacetigenium* og *Tepidibacter* har alle til felles at de danner endosporer (Slobodkin 2014). *Filifactor* er den eneste av slektene i denne familien som er patogen og assosiert med tannkjøttssykdommer hos mennesker (Slobodkin 2014).

Det er mulig at det er sporedannende slekter av *Peptostreptococcaceae* tilstede i prøvene av leverandørmelk og prøvene tatt på meieriet, ettersom en stor andel av denne familien som overlever pasteuriseringen. Dette er likevel lite sannsynlig siden de sporedannende slektene er isolert fra omgivelser som gjør at det er lite trolig at de finnes i melk, slik som pingviner (*Proteocatella*) og dyphavs områder (*Tepidibacter*) (Slobodkin 2014). Det er mer trolig at det er bakterier av slekten *Peptostreptococcus* som er detektert i denne oppgaven, ettersom bakterier i denne slekten er isolert fra blant annet husdyrgjødsel og har vist seg å ha en viktig rolle i vomma hos drøvtyggere (Attwood et al. 1996; Slobodkin 2014). Veksttemperaturen til denne bakterieslekten er rapportert å være mellom 25 og 45 °C, med en optimumstemperatur på 37 °C (Slobodkin 2014). Trolig vokser den også ved lavere temperaturer, hvis det er denne slekten som er observert i melken i denne oppgaven. Dette er en slekt som potensielt kan ha kvalitetsforringende egenskaper siden noen av artene har høy proteinase aktivitet (Schneider &

Topalova 2014). Basert på endringene i mikrobiota observert i denne oppgaven kan det se ut til at disse bakteriene har evne til å gå i dvale (VBNC) på lik linje med *Pseudomonas*. *Peptostreptococcaceae* og *Pseudomonas* viser lik endring ved pasteurisering, med en økning i relativ mengde.

Ved PMA-behandling avsløres en reduksjon i antall levende bakterier. Hvis man ser bort fra *Pseudomonas* og *Peptostreptococcaceae* reduseres de fleste ikke-sporedannende slektene betydelig. De sporedannende bakteriene viser liten endring i relativ mengde.

4.5. Holdbarhet og uttak

Kartongen lagret ved 8 °C viste signifikant lavere diversitet (Shannon) sammenlignet med melk fra de andre kartongene, inkludert kartongene fra produksjonsdagen. Ettersom mikrobiotaen i melken ikke endrer seg noe av betydning under lagring mellom 4 og 6 °C, annet enn en økning av *Lactococcus*, tyder det på at det ikke er noen betydelig endring i hvilke bakterier som trives under disse forholdene. *Lactococcus* er en bakterieslekt som inneholder blant annet den mesofile bakterien *Lactococcus lactis* som er vanlig å finne i rå melk og ofte benyttes i starterkulturer (Quigley et al. 2013b; Teuber & Geis 2006). Denne vokser også godt ved 10 °C, og det er derfor å forvente at den vokser bedre ved økt temperatur i melken (Teuber & Geis 2006). Samtidig kan det se ut som at denne bakterien er lite konkurransedyktig i melk sammenlignet med de bakteriene som vokser frem ved 8 °C.

Basert på variasjonen i mikrobiota i melk ved utgått holdbarhet mellom de ulike uttakene kan det tyde på at det ikke er en fast mikrobiota på meieriet. Det ser derimot ut til at det er en tendens til at rå melk kvaliteten er en avgjørende faktor for hvordan mikrobiota i kartong ved utgått holdbarhet vil være.

I kartongene lagret ved 8 °C ble det funnet en annerledes mikrobiota i melken sammenlignet med det som ble funnet 4 og 6 °C. Ved 8 °C var det forskjellige bakterier som dominerte i melken ved de ulike uttakene. Blant bakteriene som dominerte var *Enhydrobacter*, *Paenibacillus* og *Bacillus*. *Enhydrobacter* er en slekt som kun består av én bakterie, *Enhydrobacter aerosaccus* (Kawamura et al. 2012). Det er rapportert at disse ikke vokser under 7 °C (Staley et al. 1987), som samsvarer med at det kun ble funnet betydelig vekst av disse i kartonger lagret ved 8 °C. Denne bakterien utkonkurrerte mye av den andre mikrobiotaen ved 8 °C, selv om optimumstemperaturen er mellom 37 og 39 °C (Staley et al. 1987). *E. aerosaccus* ble kun observert i betydelige mengder i to av kartongene lagret ved 8 °C i det første uttaket.

Ved dette uttaket ble det også observert en leverandør med større mengder av denne bakterien i melken, noe som kan tyde på at det er en sammenheng, uten at dette kan bli bekreftet.

Ved uttak 2 dominerte *P. pabuli* i melk fra flere av kartongene lagret ved 8 °C. Denne sporedannende slekten er kvalitetsforringende som følge av produksjon av enzymer med blant annet proteolytisk aktivitet (De Jonghe et al. 2010). Studier har vist at *Paenibacillus* har en tendens til å dominere i melk mot slutten av holdbarhetsperioden (Ranieri et al. 2012), slik som observert her.

Paenibacillus og *Bacillus* utgjør en stor utfordring i konsummelk, spesielt i relasjon til økt holdbarhet (Huck et al. 2007; Huck et al. 2008). Både *Paenibacillus* og *Bacillus* ble funnet ved utgått holdbarhet i melk fra samtlige uttak, og de dominerte store deler av mikrobiotaen ved 8 °C. *Paenibacillus* har vist seg å ofte dominere mot slutten av holdbarhetsperioden og er trolige et stort hinder i forbindelse med økning av holdbarhetsperioden på konsummelk (Ranieri et al. 2012). Denne slekten har vist seg å inneha kvalitetsforringende, slik som lipase og proteinase aktivitet (De Jonghe et al. 2010). Bakteriene av *Bacillus* ble funnet å tilhøre *B. cereus*-gruppen og var blant bakteriene *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. toyonensis* og *B. weihenstephanensis*, da disse ikke ble differensiert. Det ble funnet relativt store mengder av bakterier fra *B. cereus*-gruppen. Det kan se ut til at bakterien fra denne gruppen har evne til å vokse seg tallrike selv med et lavt utgangspunkt, som observert ved uttak 1. Dette er en bakteriegruppe som danner endosporer, og elimineres derfor ikke ved pasteurisering (Huck et al. 2007; Logan 2012). *Bacillus* spp. utgjør en kvalitetsmessig utfordring i forbindelse med at dette er en bakterieslekt som er i stand til å produsere relativt store mengder ekstracellulære enzymer (Schallmeyer et al. 2004), blant annet enzymer som kan resultere i koagulering av melken (Shieh et al. 2009).

Mengden bakterier fra *B. cereus*-gruppen varierer ikke bare mellom de ulike lagringstemperaturene men også mellom kartonger fra samme uttak og samme lagringstemperatur. Dette kan tyde på at bakteriene ikke fordeler seg likt i melken eller at antallet rett etter pasteurisering var svært lavt. Dette gir også en indikasjon på at bakteriene fra denne gruppen har evnen til å vokse seg tallrike, selv om mengden bakterier i utgangspunktet er lavt.

Ved en optimal kjølekjede for melk utgjør *Bacillus* et minimalt problem, spesielt hvis det er lite *Bacillus* tilstede i utgangspunktet. Derimot øker problemet i takt med økning av temperaturen, dette understreker dermed viktigheten av en ubrutt kjølekjede og riktig kjøleskaptemperatur for å unngå oppblomstringen av disse patogene mikroorganismene. I et norsk studie på

oppbevaring av kjøttpålegg hos forbrukere, ble det funnet at kjøttpålegget ble utsatt for en gjennomsnittstemperatur (i løpet av 11 døgn) på 6.2 °C (Røssvoll et al. 2014). Dette inkluderte også temperaturen under et måltid hvor pålegget lå på bordet. Hvis man tar utgangspunkt i at en melkekartong behandles på lik linje, vil mikrobiotaen ved utgått holdbarhet kunne inneholde betydelige mengder bakterier fra *B. cereus*-gruppen. I det samme studiet fant de at den gjennomsnittlige kjølskapstemperaturen lå på 5.6 °C, men den varierte fra 1.3 til 9.9 °C (Røssvoll et al. 2014). Altså hadde noen av forbrukerne, som var med i denne undersøkelsen, temperaturer langt over 6 °C i kjøleskapet sitt. 6°C kan se ut til å være en smertegrense i forhold til forekomst av *Bacillus* og *Paenibacillus* i melk. Dette reduserer melkens holdbarhet og utgjør en risiko i forhold til smitte av patogene bakterier fra *B. cereus*-gruppen.

Selv om bakterier fra *B. cereus*-gruppen er funnet i store mengder i melk, er det ikke sikkert disse stammene produserer toksinene som forårsaker matforgiftning. I et studie gjort på melk i Skandinavia ble det funnet svært små mengder av stammer fra denne gruppen som er i stand til å produsere emetisk toksin (Svensson et al. 2006). I løpet av beitesesongen ble det ikke funnet noen stammer som produserte emetisk toksin. Disse stammene ble i tillegg funnet i svært små mengder i løpet av vinteren. I et annet studie gjort på slutten av 1980-tallet ble det funnet flere stammer av *B. cereus* som var i stand til å produsere toksiner ved 8 °C, men det var usikkert om dette var reelle toksiner (Christiansson et al. 1989). Stammer av *B. cereus* som produserer emetisk toksin har vist seg å ikke vokse under 12 °C (Finlay et al. 2000). Det var likevel ved de laveste temperaturene det ble observert størst produksjon av toksinet (Finlay et al. 2000).

Det er funnet flere psykrotrofe stammer fra *B. cereus*-gruppen som er i stand til å produsere enterotoksin ved 25 °C (Griffiths 1990). Så mange som 85 % av stammene som ble undersøkt hadde enterotoksinproduksjon. Likevel utgjør trolig de psykrotrofe stammene en liten risiko for matbåren sykdom ettersom enterotoksinet må produseres i tarmen for å forårsake infeksjon. Dette gjør at det som regel er de mesofile stammene som forårsaker sykdom, siden de vokser godt ved 37 °C, mens de psykrotrofe vokser dårlig ved så høy temperatur (Wijnands et al. 2006).

Holdbarhetsprøvene avslørte viktigheten av å ha en god kjølekjede på melken, og spesielt unngå overskride 6 °C. Selv om bakteriene som tilhørte *Bacillus*-slekten var av *B. cereus*-gruppen utgjør dette trolig en liten fare for matbåren smitte, ettersom stammer som produserer emetisk toksin er sjeldne i Norge (Granum 2015) og sjeldent isoleres fra melk. Den enterotoksiske varianten forårsakes sjeldent av psykrotrofe stammer, noe som også reduserer smittefaren. Likevel er smittepotensialet til stede og feil oppbevaring eller annen bruk, slik som krem på bløtekake (som blir stående i temperatur >8 °C i lengre tid), kan resultere i vekstfremming av

uønskede patogene stammer. *Bacillus* og *Paenibacillus* utgjør uansett en stor utfordring i forbindelse med kvaliteten, ettersom disse produsere ekstracellulære enzymer som er i stand til å bryte ned en del av komponentene i melk.

4.6. Metoder for kvantifisering av totalt antall bakterier

BactoCount, platetelling på PCA-skåler og ddPCR er alle metoder som ble brukt for å kvantifisere bakteriene i melkeprøvene. I teorien burde disse metodene vise en relativt god sammenheng ettersom alle metodene beskriver det samme, bare målt på ulike måter. Alle metodene viste en signifikant sammenheng.

Mellom BactoCount og tradisjonell platetelling var det en forklart variasjon på 27.83 %. Dette viser til at mesteparten av variasjonen ikke forklares av modellen. Dette kan komme av flere faktorer. I modellene hvor platetelling inngår er det en prøve som skiller seg betydelig fra resten av prøvene. Denne utliggeren kan bidra til å redusere forklaringsprosenten. Samtidig er BactoCount et flow cytometer, som detekterer bakteriene ved å farge DNAet (Bentley Instruments 2013). Som følge av sonikeringen separeres bakterier som har dannet ansamlinger og kjeder (Bentley Instruments 2013), noe som skal gi et mer reelt bakterietall. Ved dyrking på skåler vil slike kjeder av bakterier kun danne én kolonidannende enhet, samtidig er det ikke sikkert at alle bakterier vokser på PCA-skåler. I tillegg kan den varme agaren trolig påvirke noen av bakteriene til å gå inn i en VBNC-fase, slik at de ikke så lett vokser og ikke kan detekteres på agaren. PCA-skålene ble også inkubert ved 30 °C, som er en temperatur hvor psykrofile bakterier vokser dårlig. Dette inkluderer *Pseudomonas* som finnes i relativt store mengder i melk. BactoCount IBCm er validert til å samsvare med tradisjonell platetelling og rapporterer å ha en forklart variasjon mellom BactoCount og tradisjonell platetelling på 82.27 % (Bentley Instruments 2013). I denne sammenligningen ble det benyttet flere prøvepunkter (6504 prøver samlet fra 12 ulike land) enn i denne oppgaven. Et annet moment som kan være med å forklare noe av variasjonen, kan være at BactoCount-analysen ble gjort med en gang melken kom inn til meieriet, mens ved uttak 2 og 3 ble utsåingen av bakteriene i PCA-agar gjort dagen etter, noe som kan resultere i en endret vekst.

Den observerte sammenhengen mellom BactoCount og ddPCR var også lav, med en forklaringsprosent på kun 17.02 %. I teorien skulle disse metodene samsvare relativt bra siden begge baserer seg på å kvantifisere bakterier molekylært uavhengig av vekstmedium. Samtidig er det flere trinn i ddPCR, både med DNA-ekstraksjon og de forskjellige trinnene som inngår i selve prosedyren som gir rom for feil, som eksempelvis pipetteringsfeil og andre unøyaktigheter i oppmåling.

Trolig av de samme årsakene som har blitt beskrevet ovenfor er det også en relativt lav forklaringsprosent mellom ddPCR og platetelling. Selv om alle disse metodene skal estimere mengden bakterier i en prøve forklarer de kun en lav prosent av variasjonen, selv om alle modellene viser at det finnes en signifikant sammenheng mellom metodene.

4.7. Oppsummering

Denne oppgaven gir et dypdykk i melkens mikrobiota fra leverandørmelk til utgått holdbarhet ved meieriet prøvene ble tatt ut. Det kan se ut til at bakteriene som kommer inn med rå melken har en viktig betydning i forhold hvilke bakterier man finner i kartongene ved utgått holdbarhet. Rå melkens mikrobiota varierer mellom leverandører, men den varierer også innad hos leverandørene ved de ulike uttakene. Spesielt *Bacillus* var signifikant høyere ved uttak 3. Årsaken til denne variasjonen er vanskelig å si noe om basert på disse resultatene, og det trengs nærmere undersøkelser for å finne årsaken til en slik variasjon.

Pasteurisingen viste at også en del ikke-sporedannende bakterier overlevde, deriblant en del i den psykrotofe slekten *Pseudomonas*. Dette utgjør en utfordring i forhold til utvidelse av holdbarhetsperioden, ettersom *Pseudomonas* produserer enzymer som kan ødelegge melkens kvalitet. Andre kvalitetsforringende bakterieslekter, slik som de sporedannende slektene *Bacillus* og *Paenibacillus* er også en del av denne utfordringen.

Mikrobiotaen som ble funnet i melken ved utgått holdbarhet varierer mellom uttakene og lagringstemperaturene. Ved 8 °C var det en annen mikrobiota i melken sammenlignet med mikrobiotaen funnet i melken ved 4 og 6 °C, samt i kartongene fra produksjonsdagen. *Bacillus* var en av artene som viste seg å dominere i melken lagret ved 8 °C. Det er usikkert ved nøyaktig hvilken temperatur *Bacillus* begynner å dominere i melken, men utfra resultatene i denne oppgaven skjer det mellom 6 og 8 °C. Den kritiske temperaturen kan konstateres ved utvidet undersøkelse av temperatur ved utgått holdbarhet. *Bacillus* som dominerer i melken tilhører *B. cereus*-gruppen, og det er derfor helsemessig viktig å holde denne bakteriegruppen til det minimale, selv om det er lite sannsynlig at de skal forårsake matbåren smitte, er risikoen tilstede.

Mikrobiotaen som ble detektert i kartongene ved utgáttholdbarhet varierte mellom hvert uttak, noe som kan tyde på at det ikke er en etablert meieriflora på anlegget. Likevel er det mye som kan tyde på at det var biofilm på silotanken ved et tilfelle. Samtidig kan det tyde på at det også var biofilm på tankbilene ved et av uttakene.

Utfra resultatene i denne oppgaven kan man få mye informasjon om melke kvaliteten hos de forskjellige leverandørene og hvordan mikrobiotaen endrer seg ved de ulike uttakene og lagringstemperaturene. Årsakene til de observerte forskjellene bør undersøkes nærmere, men resultatene i denne oppgaven kan gi indikasjoner på at *Bacillus* er en stor utfordring i kartonger lagret ved 8 °C. Samtidig varierer mengden *Bacillus* i kartong ved utgått holdbarhet i takt med mengden *Bacillus* som finnes i leverandørmelken. Årsaken til denne observerte variasjon i *Bacillus* mellom uttak hos leverandørene ville være interessant å undersøke nærmere.

5. Referanser

- Attwood, G., Reilly, K. & Patel, B. (1996). *Clostridium proteoclasticum* sp. nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46 (3): 753-758.
- Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T. & Hiramatsu, K. (2009). Complete genome sequence of *Macroccoccus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *Journal of bacteriology*, 191 (4): 1180-1190.
- 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 (4): 588-596.
- Beckman Coulter. (2016). Instructions For Use, Agencourt AMPure XP.
- Bentley Instruments. (2013). *Highly Accurate, Reliable and Real-time Enumeration of Individual Bacteria for the Determination of Raw Milk Hygienic Quality*.
- Bio-Rad. (2010). *ddPCR Supermix for probes (No dUTP)* (lest 20.03.17).
- Bremer, P. J., Fillery, S. & McQuillan, A. J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International journal of food microbiology*, 106 (3): 254-262.
- Burgess, S. A., Lindsay, D. & Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology*, 144 (2): 215-225.
- Bylund, G. (1995). *Dairy Processing Handbook*. Sverige: Tetra Pak Processing Systems AB. Tilgjengelig fra: <http://dairyprocessinghandbook.com/> (lest 20.03.17).
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L. & Bauer, M. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6 (8): 1621-1624.
- Cawthorn, D. M. & Witthuhn, R. (2008). Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (4): 1178-1185.
- Celandroni, F., Salvetti, S., Gueye, S. A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Senesi, S. & Ghelardi, E. (2016). Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS one*, 11 (3): e0152831.
- Cerf, O. & Condron, R. (2006). *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology and Infection*, 134 (05): 946-951.
- Ceuppens, S., Boon, N. & Uyttendaele, M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS microbiology ecology*, 84 (3): 433-450.
- Chen, L., Daniel, R. M. & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International dairy journal*, 13 (4): 255-275.
- Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B. & Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science & Technology*, 96 (1): 27-38.
- Christiansson, A., Naidu, A. S., Nilsson, I., Wadström, T. & Pettersson, H. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (10): 2595-2600.
- 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 (2): 305-314.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P. & Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International journal of food microbiology*, 136 (3): 318-325.

- 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 (6): 1882-1891.
- 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 (1): 130-138.
- Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Cotter, P. D. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International journal of food microbiology*, 197: 77-87.
- Evans, A. C. (1916). The bacteria of milk freshly drawn from normal udders. *The Journal of Infectious Diseases*: 437-476.
- Fadiloglu, S., Erkmén, O. & Sekeroglu, G. (2004). Thermal and carbon dioxide inactivation of alkaline phosphatase in buffer and milk. *Food Technology and Biotechnology*, 42 (1): 27-32.
- Fadrosh, D. W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R. M. & Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2 (1): 6.
- Fakruddin, M., Mannan, K. S. B. & Andrews, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN microbiology*, 2013.
- Finlay, W., Logan, N. & Sutherland, A. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Letters in applied microbiology*, 31 (5): 385-389.
- Fortina, M., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M. & Grohmann, E. (2008). A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *International journal of food microbiology*, 123 (3): 204-211.
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazábal, V. & Granum, P. E. (2005). Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and environmental microbiology*, 71 (3): 1178-1183.
- Fromm, H. I. & Boor, K. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of food science*, 69 (8).
- Furukawa, S., Akiyoshi, Y., Komoriya, M., Ogihara, H. & Morinaga, Y. (2010). Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. *Food Control*, 21 (5): 669-672.
- Gleeson, D., O'Connell, A. & Jordan, K. (2013). Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*: 217-227.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15 (1): 203.
- Grant, I., Ball, H. & Rowe, M. (1998). Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Letters in Applied Microbiology*, 26 (2): 166-170.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Neill, S. D. & Rowe, M. T. (1996). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Applied and environmental microbiology*, 62 (2): 631-636.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning*. 2. utg. Norge: Cappelen Damm.
- Griffiths, M. (1990). Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *Journal of Food Protection*, 53 (9): 790-792.
- Guinebrière, M.-H. & Broussolle, V. (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (8): 3053-3056.
- Gunasekera, T. S., Atfield, 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 (3): 1228-1232.
- Harmon, R. (1994). Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts¹. *Journal of dairy science*, 77 (7): 2103-2112.

- Haug, A., Høstmark, A. T. & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in health and disease*, 6 (1): 25.
- He, H., Dong, J., Lee, C. N. & Li, Y. (2009). Molecular analysis of spoilage-related bacteria in pasteurized milk during refrigeration by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of food protection*, 72 (3): 572-577.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L. & Legler, T. C. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, 83 (22): 8604-8610.
- Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., Vessella, R. L. & Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*, 10 (10): 1003-1005.
- Holsinger, V., Rajkowski, K. & Stabel, J. (1997). Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties*, 16: 441-466.
- Huck, J., Hammond, B., Murphy, S., Woodcock, N. & Boor, K. (2007). Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of dairy science*, 90 (10): 4872-4883.
- Huck, J., Sonnen, M. & Boor, K. (2008). Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *Journal of dairy science*, 91 (3): 1218-1228.
- Illumina. (2016). *An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. USA: Illumina
Tilgjengelig fra: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf (lest 20.03.17).
- Ivy, R. A., Ranieri, M. L., Martin, N. H., den Bakker, H. C., Xavier, B. M., Wiedmann, M. & Boor, K. J. (2012). Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and environmental microbiology*, 78 (6): 1853-1864.
- Jakobsen, R. A., Heggebø, R., Sunde, E. B. & Skjervheim, M. (2011). Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology*, 28 (3): 492-496.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45 (9): 2761-2764.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.-B., Ramón, D. & Martínez, J. F. (2013). Description of Bacillus toyonensis sp. nov., a novel species of the Bacillus cereus group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and applied microbiology*, 36 (6): 383-391.
- Josephson, K., Gerba, C. & Pepper, I. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (10): 3513-3515.
- Kawamura, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Mitani, A., Kubota, H., Tomida, J., Morita, Y. & Hitomi, J. (2012). Genus Enhydrobacter Staley et al. 1987 should be recognized as a member of the family Rhodospirillaceae within the class Alphaproteobacteria. *Microbiology and immunology*, 56 (1): 21-26.
- Kives, J., Guadarrama, D., Orgaz, B., Rivera-Sen, A., Vazquez, J. & SanJose, C. (2005). Interactions in biofilms of Lactococcus lactis ssp. cremoris and Pseudomonas fluorescens cultured in cold UHT milk. *Journal of dairy science*, 88 (12): 4165-4171.
- Kononoka, I., Jemeljanovs, A., Osmane, B., Ikaunieca, D. & Gulbe, G. (2012). Incidence of Listeria spp. in dairy cows feed and raw milk in Latvia. *ISRN veterinary science*, 2012.
- 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. *Applied and environmental microbiology*, 79 (17): 5112-5120.

- Landbruks- og matdepartementet. (2015). *Forskrift for kvalitet på melk og melkeprodukter*
Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/LTI/forskrift/2015-06-03-607> (lest 20.03.17).
- Le Gentil, C., Sylla, Y. & Faille, C. (2010). Bacterial re-contamination of surfaces of food processing lines during cleaning in place procedures. *Journal of food engineering*, 96 (1): 37-42.
- Lee, J.-L. & Levin, R. E. (2009). A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *Journal of microbiological methods*, 76 (1): 93-96.
- Leitner, G., Krifucks, O., Merin, U., Lavi, Y. & Silanikove, N. (2006). Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, 16 (6): 648-654.
- LGC. (2014a). *mag blood kit - Customised kit solutions for blood DNA preparations*. Tilgjengelig fra: <https://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Extraction/mag-blood-kit.pdf?ext=.pdf> (lest 20.03.17).
- LGC. (2014b). *mag midi kit*. Tilgjengelig fra: <https://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Extraction/Kits%20inserts/mag-midi.pdf> (lest 20.03.17).
- Lo, R., Turner, M. S., Weeks, M. & Bansal, N. (2016). Culture-independent bacterial community profiling of carbon dioxide treated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 233: 81-89.
- Loftis, A. D., Priestley, R. A. & Massung, R. F. (2010). Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne pathogens and disease*, 7 (12): 1453-1456.
- Logan, N. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of applied microbiology*, 112 (3): 417-429.
- Magnusson, M., Svensson, B., Kolstrup, C. & Christiansson, A. (2007). *Bacillus cereus* in free-stall bedding. *Journal of dairy science*, 90 (12): 5473-5482.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. & Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11 (2): 133-147.
- Masoud, W., Takamiya, M., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J. & Jakobsen, M. (2011). Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International Dairy Journal*, 21 (3): 142-148.
- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J. & Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International journal of food microbiology*, 153 (1): 192-202.
- Matković, K., Vučemilo, M., Vinković, B., Šeol, B., Pavičić, Ž. & Matković, S. (2007). Qualitative structure of airborne bacteria and fungi in dairy barn and nearby environment. *Czech J. Anim. Sci*, 52 (8): 249-254.
- Miambi, E., Guyot, J.-P. & Ampe, F. (2003). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (2): 111-120.
- 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 (1): e53608.
- Murphy, P. M., Lynch, D. & Kelly, P. M. (1999). Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52 (2): 45-50.

- Nocker, A., Cheung, C.-Y. & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of microbiological methods*, 67 (2): 310-320.
- Nursten, H. (1997). The flavour of milk and dairy products: I. Milk of different kinds, milk powder, butter and cream. *International Journal of Dairy Technology*, 50 (2): 48-56.
- Nærings- og fiskeridepartementet, Landbruks- og matdepartementet & omsorgsdepartementet, H.-o. (2009). *Animaliehygieneforskriften, Forskrift om særlig hygieneregler for næringsmidler av animalsk opprinnelse*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1624/> (lest 20.03.17).
- O'Donnell, J. L., Kelly, R. P., Lowell, N. C. & Port, J. A. (2016). Indexed PCR primers induce template-specific bias in large-scale DNA sequencing studies. *PLoS one*, 11 (3): e0148698.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*, 43 (1): 93-100.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34 (4): 415-425.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A. & Baizabal-Aguirre, V. M. (2007). Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *Journal of Infection*, 54 (4): 399-409.
- Paulson, J. N., Stine, O. C., Bravo, H. C. & Pop, M. (2013). Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nature methods*, 10 (12): 1200-1202.
- Pembrey, R. S., Marshall, K. C. & Schneider, R. P. (1999). Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (7): 2877-2894.
- 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 (1): 120-125.
- 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.
- 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 (8): 4928-4937.
- 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 (5): 664-698.
- Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D., de Vos, W. M. & Vaughan, E. E. (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4): 1882-1892.
- Ranieri, M. L., Ivy, R. A., Mitchell, W. R., Call, E., Masiello, S. N., Wiedmann, M. & Boor, K. J. (2012). Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. *Applied and environmental microbiology*, 78 (16): 5855-5863.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. & Lagacé, J. (2001). Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 39 (7): 2584-2589.
- Røssvoll, E., Rønning, H. T., Granum, P. E., Møretrø, T., Hjerpekjøn, M. R. & Langsrud, S. (2014). Toxin production and growth of pathogens subjected to temperature fluctuations simulating consumer handling of cold cuts. *International journal of food microbiology*, 185: 82-92.
- Saikaly, P. E., Barlaz, M. A. & Francis, L. (2007). Development of quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of surrogate biological warfare agents in building debris and leachate. *Applied and environmental microbiology*, 73 (20): 6557-6565.

- Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, 50 (1): 1-17.
- Schleifer, K. H., Klipper-Bälz, R., Fischer, U. & Endl, J. (1982). Identification of “*Micrococcus candidus*” ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of “*Micrococcus caseolyticus*” ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32 (1): 15-20.
- Schneider, I. & Topalova, I. (2014). Kinetic parameters of protease activity of *Peptostreptococcus* sp. as a tool for regulation of dairy wastewater treatment. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20 (1): 74-77.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A. & Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food microbiology*, 27 (3): 347-355.
- Shamsi, K., Versteeg, C., Sherkat, F. & Wan, J. (2008). Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9 (2): 217-223.
- Sharma, M. & Anand, S. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry—a case. *Food Control*, 13 (6): 469-477.
- Shieh, C.-J., Thi, L.-A. P. & Shih, L. (2009). Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal*, 43 (1): 85-91.
- Simões, M., Simões, L. C. & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43 (4): 573-583.
- Slobodkin, A. (2014). The Family Peptostreptococcaceae. I: *The Prokaryotes*, s. 291-302: Springer.
- Staley, J. T., Irgens, R. L. & Brenner, D. J. (1987). *Enhydrobacter aerosaccus* gen. nov., sp. nov., a gas-vacuolated, facultatively anaerobic, heterotrophic rod. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37 (3): 289-291.
- Sundén, B. & Manglik, R. M. (2007). *Plate heat exchangers: design, applications and performance*, b. 11: Wit Press.
- Svensson, B., Monthán, A., Shaheen, R., Andersson, M. A., Salkinoja-Salonen, M. & Christiansson, A. (2006). Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International dairy journal*, 16 (7): 740-749.
- Tallent, S. M., Kotewicz, K. M., Strain, E. A. & Bennett, R. W. (2012). Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *Journal of AOAC International*, 95 (2): 446-451.
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C. & Faille, C. (2006). Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International journal of food microbiology*, 110 (3): 254-262.
- Te Giffel, M. t., Wagendorp, A., Herrewegh, A. & Driehuis, F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81 (1): 625-630.
- Teuber, M. & Geis, A. (2006). The genus *Lactococcus*. I: *The prokaryotes*, s. 205-228: Springer.
- TINE, S. (2016a). *Tinemelk Helmelk 3,5 % fett*. Tilgjengelig fra: <http://www.tine.no/merkevarer/tinemelk/produkter/tinemelk-helmelk-3-5-fett> (lest 20.03.17).
- TINE, S. (2016b). *Årsrapport 2016 Produksjon*. Tilgjengelig fra: <http://arsrapport2016.tine.no/resultat/statistikk/produksjon.aspx> (lest 18.03.17).
- Tortora, G. J., Funk, B. R. & Case, C. L. (2010). *Microbiology - an introduction*. 10. utg.: Benjamin Cummings.
- 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 (3): 253-262.
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, 30 (9): 418-426.
- van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological reviews*, 59 (1): 124-142.

- Veal, D., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. & Attfield, P. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of immunological methods*, 243 (1): 191-210.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C. & Montel, M.-C. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology*, 26 (3): 305-310.
- Vissers, M., Te Giffel, M., Driehuis, F., De Jong, P. & Lankveld, J. (2007). Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. *Journal of dairy science*, 90 (1): 281-292.
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R. & Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57: 80-90.
- Walstra, P., Wouters, J. R. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2. utg. USA: Taylor & Francis.
- Watson, J. D., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2014). *Molecular biology of the gene*: Pearson/Benjamin Cummings.
- Weber, M., Geißert, J., Kruse, M. & Lipski, A. (2014). Comparative analysis of bacterial community composition in bulk tank raw milk by culture-dependent and culture-independent methods using the viability dye propidium monoazide. *Journal of dairy science*, 97 (11): 6761-6776.
- Wijnands, L., Dufrenne, J., Zwietering, M. & Van Leusden, F. (2006). Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *International journal of food microbiology*, 112 (2): 120-128.
- Wiley, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2014). *Prescott's microbiology*: McGraw Hill International.
- Young, J., Kuykendall, L., Martinez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (1): 89-103.
- Zdanowicz, M., Shelford, J., Tucker, C., Weary, D. & Von Keyserlingk, M. (2004). Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *Journal of dairy science*, 87 (6): 1694-1701.

Vedlegg

Vedlegg 1

Tabell V.1. Sjekklisten som ble benyttet for å observere faktorer i melkerommet hos leverandører.

Lev	Type vask (auto/manuell)	Type tank (Scala/Wedholms)	Tank- volum	Temp. melk	Melke- volum	Propp (av/på)	Fjøsdoor (åpen/lukket)
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							

Vedlegg 2

Tabell V.2. Oversikt over diversiteten i forhold til melkeanlegg. Resultater av Tukeys post hoc test basert på ANOVA.

	Effekt	P-verdi
Robot – Melkestall	0.4460	0.1429
Rørmelksanlegg – Melkestall	0.1428	0.7350
Rørmelksanlegg – Robot	-0.3032	0.4002

Vedlegg 3

Tabell V.3. Faktorer fra gård sammenlignet med ulike bakterier, ddPCR og Shannon. Effekten er oppgitt i tabellen med p-verdien i parentes. Signifikante verdier er uthevet. Sammenligningen ble gjort med lineær modell.

	Pseudomonas	Lactococcus	Peptostreptococcaceae (F)	Streptococcus	Bacillus	Paenibacillus	ddPCR	Shannon
Andel av gårdstanken som er fylt	136.5 (0.549)	-15994 (0.059')	0.681 (0.927)	-237.7 (0.336)	-11.43 (0.585)	-34.27 (0.627)	0.001 (0.735)	0.004 (0.4)
Korken på tappestuss av eller på (på mot av)	13834 (0.362)	678.8 (0.774)	328.5 (0.508)	6832 (0.682)	923.7 (0.507)	1540 (0.743)	-0.193 (0.281)	-0.4628 (0.0808')
Type vask (manuell mot automatisk)	-6674 (0.661)	2092.9 (0.374)	-379 (0.423)	-5888 (0.724)	-789.0 (0.571)	12106 (0.008**)	0.092 (0.609)	0.0023 (0.993)
Type tank Wedholms mot Scala	15755 (0.108)	-1061 (0.489)	-452.3 (0.159)	11900 (0.270)	-246.8 (0.785)	-2922 (0.337)	-0.126 (0.281)	-0.198 (0.253)
Temperatur	-3679 (0.537)	-1179 (0.200)	210.8 (0.277)	6217 (0.340)	460.5 (0.398)	667.2 (0.717)	0,007 (0.92)	-0.051 (0.627)
Lukket/åpen fjøsdør (åpen mot lukket)	4125 (0.738)	-2908.7 (0.126)	31.62 (0.938)	29805 (0.0251*)	808.2 (0.475)	-2483 (0.5146)	0.074 (0.614)	-0.323 (0.134)

Vedlegg 4

Tabell V.4. Oversikt over diversiteten (Shannon) i kartonger i forhold til temperaturer ved lagring. Kartonger fra produksjonsdagen er også inkludert. Resultater fra Tukeys post hoc test basert på ANOVA.

	Effekt	P-verdi
T4 – T0	-0.3262	0.5662
T6 – T0	-0.2466	0.7597
T8 – T0	-0.9834	0.0012**
T6 – T4	0.0796	0.9889
T8 – T4	-0.6571	0.0519'
T8 – T6	-0.7367	0.0230*



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway