

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

Pavičić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:167601>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

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

DIPLOMSKI RAD

Dora Pavičić

Zagreb, rujan 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

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

DIPLOMSKI RAD

Dora Pavičić

Mentor: Doc. dr. sc. Nataša Mikulec

Neposredni voditelj: Dr. sc. Snježana Kazazić

Zagreb, rujan 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

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

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

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

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

PRIMJENA PROTOČNE CITOMETRIJE I MALDI-TOF TEHNIKE ZA ODREĐIVANJE

PSIHROTROFNIH BAKTERIJA U SIROVOM MLIJEKU

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

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

Zahvala

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

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

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

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Cilj rada | 2 |
| 2. Psihrotrofne bakterije | 3 |
| 2.1. Gram negativne psihrotrofne bakterije | 3 |
| 2.1.1. <i>Pseudomonas</i> spp..... | 3 |
| 2.1.2. Porodica <i>Enterobacteriaceae</i> | 4 |
| 2.2. Gram pozitivne psihrotrofne bakterije | 5 |
| 2.2.1. <i>Bacillus</i> spp. | 5 |
| 2.2.2. <i>Clostridium</i> spp. | 6 |
| 2.3. Prisutnost psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku | 7 |
| 2.4. Izvori kontaminacije | 8 |
| 2.5. Promjene sastava sirovog mlijeka uzrokovanih povišenim brojem psihrotrofnih bakterija..... | 9 |
| 2.6. Metode određivanja psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku | 11 |
| 2.6.1. Klasična metoda određivanja psihrotrofnih bakterija u mlijeku | 11 |
| 2.6.2. Metoda protočne citometrije | 13 |
| 3. MALDI-TOF tehnika identifikacije psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku | 16 |
| 3.1. Spektrometrija masa..... | 16 |
| 3.2. MALDI tehnika..... | 17 |
| 3.3. MALDI-TOF analizator mase s vremenom leta | 18 |
| 3.4. Postupak uzorkovanja MALDI-TOF tehnikom | 19 |
| 4. Materijali i metode rada | 21 |
| 4.1. Uzorkovanje i analiza mlijeka..... | 21 |
| 4.2. Referentna metoda određivanja broja bakterija na čvrstom hranilištu..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 4.3. MALDI-TOF tehnika identifikacije psihrotrofnih bakterija..... | 24 |
| 5. Rezultati i rasprava | 28 |
| 5.1. Rezultati metode protočne citometrije | 28 |
| 5.2. Rezultati MALDI-TOF tehnike u identifikaciji psihrotrofnih bakterija..... | 30 |
| 6. Zaključak..... | 44 |
| 7. Popis literature | 45 |
| 8. Prilog | 47 |
| Životopis | 78 |

Sažetak

Diplomskog rada studentice Dora Pavičić, naslova

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

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

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

Summary

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

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

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

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

1. Uvod

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

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

1.1. Cilj rada

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

2. Psihrotrofne bakterije

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

2.1. Gram negativne psihrotrofne bakterije

2.1.1. *Pseudomonas* spp.

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

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



Slika 2.1.1.1. *Pseudomonas flourescens*

(<http://www.agrotekno-lab.com/2013/12/pseudomonas-flourescens.html>)

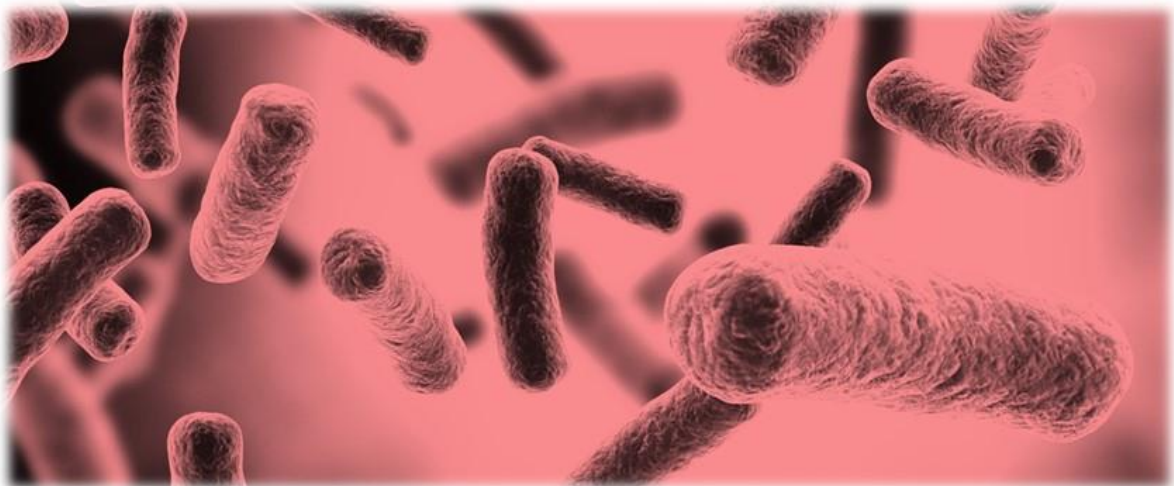
2.1.2. Porodica *Enterobacteriaceae*

Porodica *Enterobacteriaceae* pojavljuje se u 5 do 33% slučajeva psihrotrofne mikroflore sirovog mlijeka. Karakterizira ih izrazita pokretljivost, sitnija građa te veća optimalna temperatura rasta (> 30 °C). Koliformne bakterije koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* sposobne su fermentirati laktozu uz proizvodnju kiseline i plina (CO₂) pri 32 °C tijekom 48 sati. Najčešći uzročnici koliformnog kvarenja spominju se rodovi *Enterobacter* i *Klebsiella* spp. Jednako je važno spomenuti i bakterijsku vrstu *Escherichia coli* koja fermentira glukozu proizvodeći piruvat, koji prelazi u mliječnu, octenu i mravlju kiselinu. Pojedini sojevi proizvode enterotoksin od kojih su neki otporni na toplinu. Izvor ove bakterije je nečistoća i vrlo često uzrokuje kontaminaciju sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda.

2.2. Gram pozitivne psihrotrofne bakterije

2.2.1. *Bacillus* spp.

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

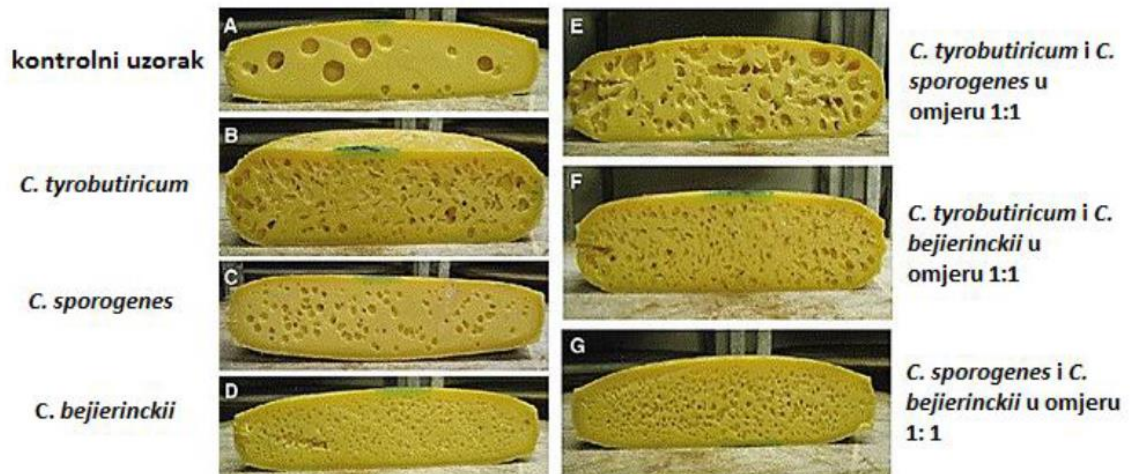


Slika 2.2.1.1. *Bacillus subtilis*

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

2.2.2. *Clostridium* spp.

Bakterijske vrste roda *Clostridium* spp. su sporogene, gram pozitivne bakterije koje često uzrokuju kvarenje mlijeka dovoljno da ih u uzorku ima u malim količinama. Od patogenih vrsta, koje imaju sposobnost tvorbe toksina, najznačajnije za mljekarsku industriju su *Clostridium perfringens* i u znatno manjoj mjeri *Clostridium botulinum*. U prirodi su široko rasprostranjene, pronađene u zemlji, blatu, prašini i raspadnom bilju. Pojavljuju se sezonski, zimi, za vrijeme boravka životinja u staji gdje se one zadržavaju na nečistoj sijeni i konzumiraju sporama kontaminiranu silažu. Prisutnost bakterijskih spora *Clostridium botulinum* značajna je za sterilizirano mlijeko i vrhnje radi visokog udjela masti i visoke pH vrijednosti te se za takve mliječne proizvode preporučuje visoki toplinski tretman koji će reducirati broj spora. Bakterijske vrste roda *Clostridium* spp. najčešći su izolirani uzročnici kasnog nadimanja sira. Za kasno nadimanje sira Gaude dovoljno je 5-10 spora *C. tyrobutiricum* u 1 L mlijeka (Samaržija, 2017.). Zbog obilnog stvaranja plina CO₂ i H₂ pogreške kasnog nadimanja sira manifestiraju se u obliku elastične teksture koja na prerezu pokazuje atipične oči razasute u tijestu sira (Slika 2.2.2.1.).



Slika 2.2.2.1. Prikaz kasnog nadimanja sira bakterijskim vrstama roda *Clostridium* spp.

(Samaržija, 2017.)

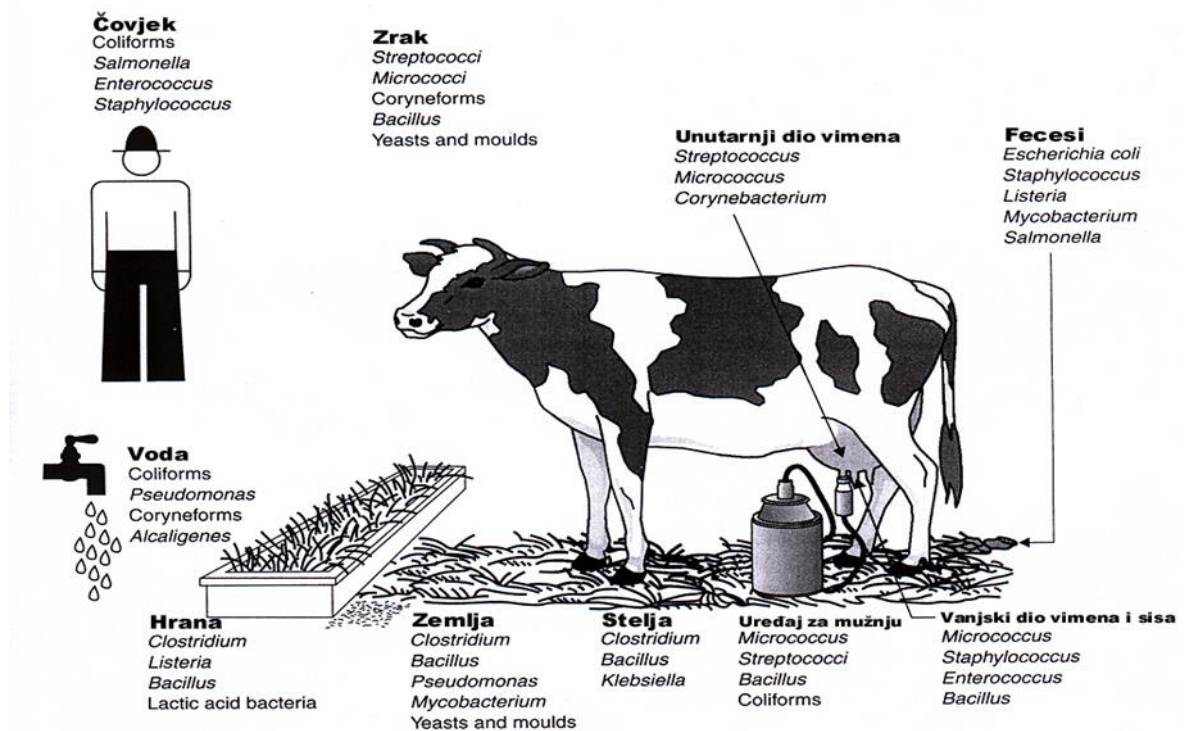
2.3. Prisutnost psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku

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

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

2.4. Izvori kontaminacije

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



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

2.5. Promjene sastava sirovog mlijeka uzrokovanih povišenim brojem psihrotrofnih bakterija

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

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

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

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

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

2.6. Metode određivanja psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku

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

2.6.1. Klasična metoda određivanja psihrotrofnih bakterija u mlijeku

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

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

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

$$\text{Broj mikroorganizama/mL} = \frac{\Sigma C}{\frac{1 \times n_1 + 0,1 \times n_2}{d}}$$

gdje predstavlja: ΣC - suma svih kolonija na svim izbrojanim zdjelicama

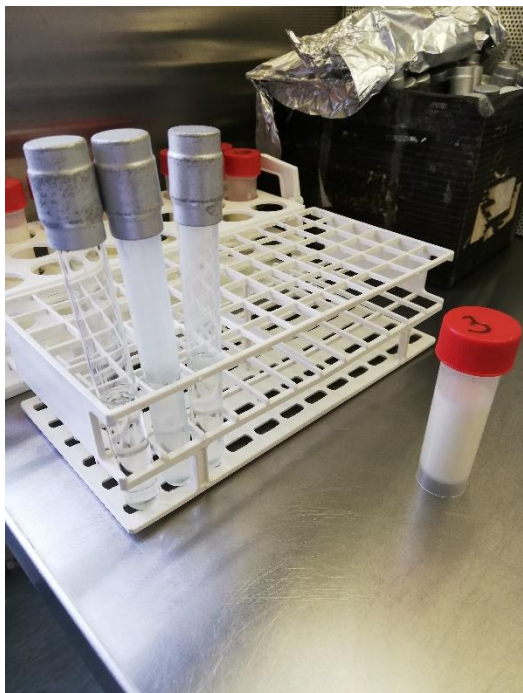
n_1 – broj izbrojanih zdjelica u prvom razrijeđenju

n_2 – broj izbrojanih zdjelica u drugom razrijeđenju

d – faktor razrijeđenja prvog razrijeđenja.

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

a)



b)

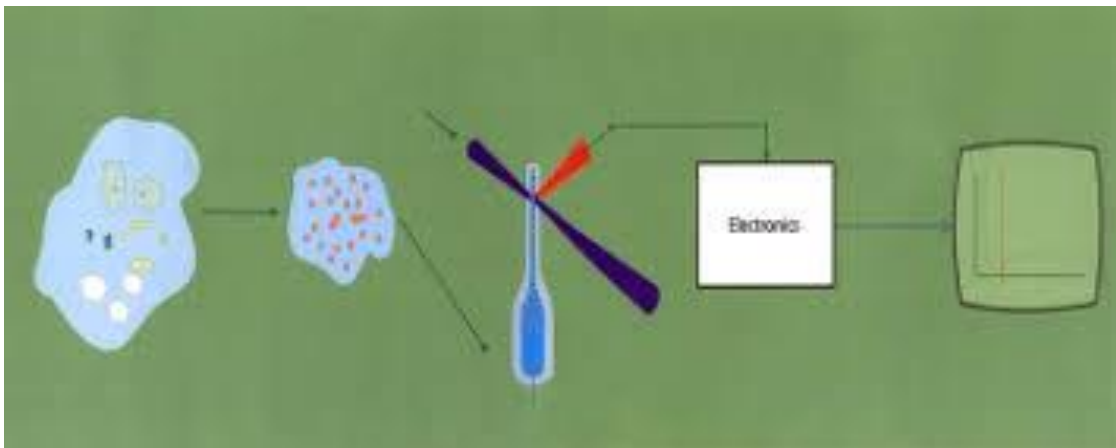


Slika 2.6.1.1. a) Prikaz otopine peptona b) Prelijevanje hranjive podloge na Petrijevu zdjelicu

2.6.2. Metoda protočne citometrije

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

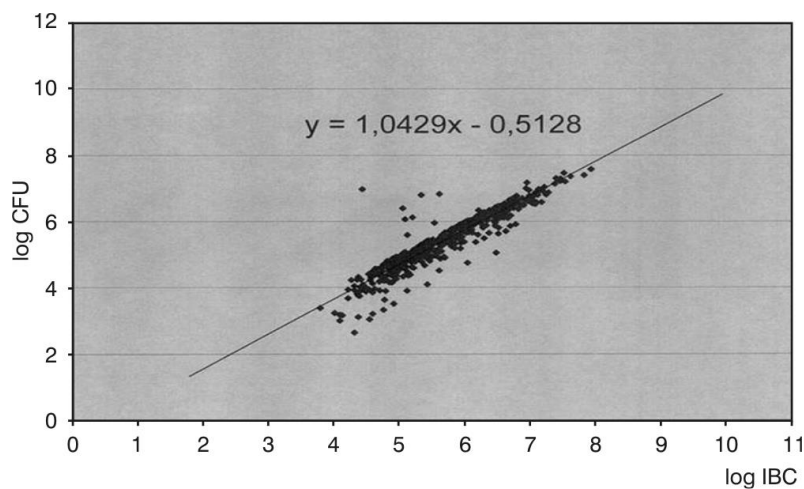
Mjerno područje instrumenta iznosi od < 10 impulsa do $> 70\ 000$ impulsa, što je izraženo u jedinici klasične metode 2 900 do 32 milijuna bakterija u 1 mL mlijeka. Obojene bakterije u analiziranom uzorku broje se kao impulsi i predstavljaju pojedinačnu bakterijsku stanicu (eng. IBC- Individual Bacterial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



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

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

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



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

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

3.1. Spektrometrija masa

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



Slika 3.1.1. Prikaz koraka u analizi spektrometrijom masa

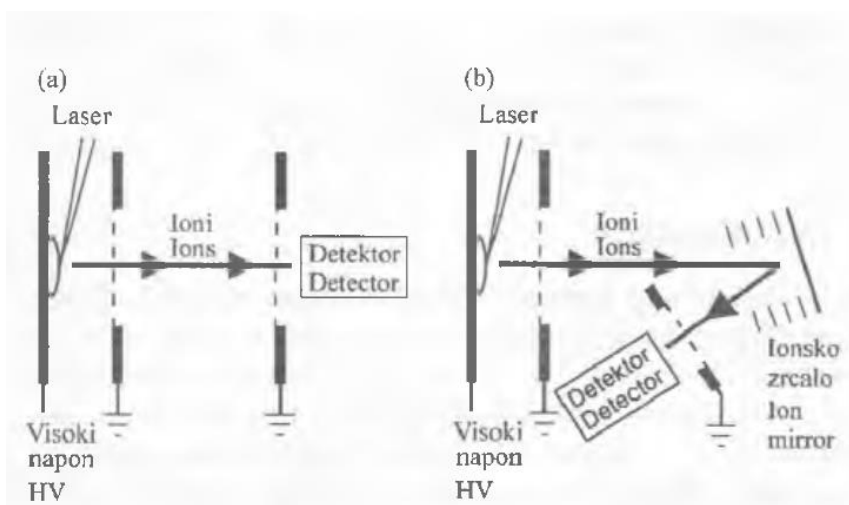
Ionizacija molekule analita provodi se primanjem ili gubitkom elektrona. Taj proces može biti započet utjecajem elektrona (Electron impact, EI), ionizacijom koja je potaknuta atomima (Fast Bombardment Ionization, FAB) ili protonima (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; MALDI; electrospray ionization,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

3.2. MALDI tehnika

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

3.3. MALDI-TOF analizator mase s vremenom leta

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



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

3.4. Postupak uzorkovanja MALDI-TOF tehnikom

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

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

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

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

4. Materijali i metode rada

4.1. Uzorkovanje i analiza mlijeka

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

4.2. Referentna metoda određivanja broja bakterija na čvrstom hranilištu

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

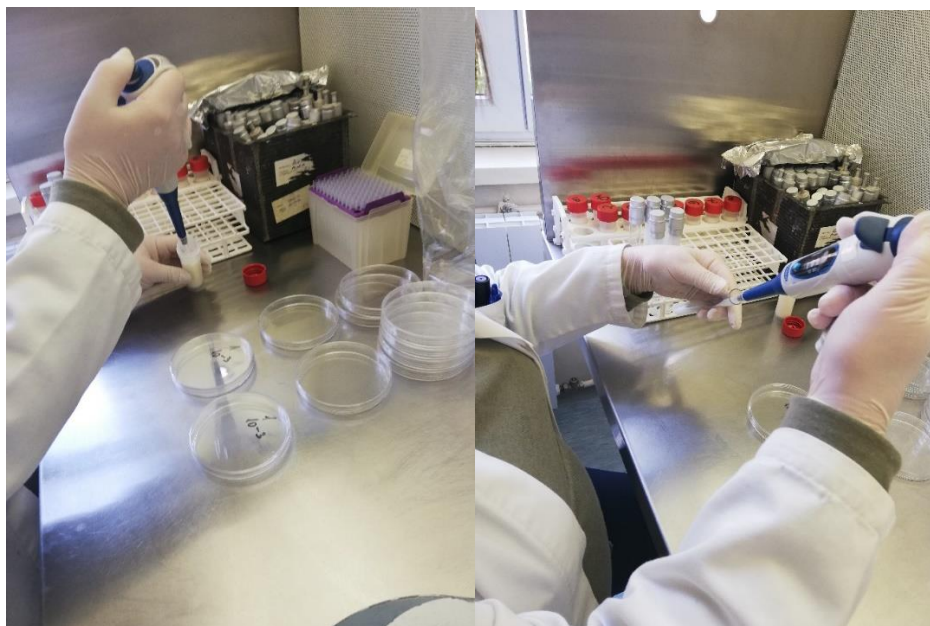


Slika 4.2.1. Materijal potreban za provođenje referentne metode na čvrstom hranilištu

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

a)

b)



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

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



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

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

4.3. MALDI-TOF tehnika identifikacije psihrotrofnih bakterija

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

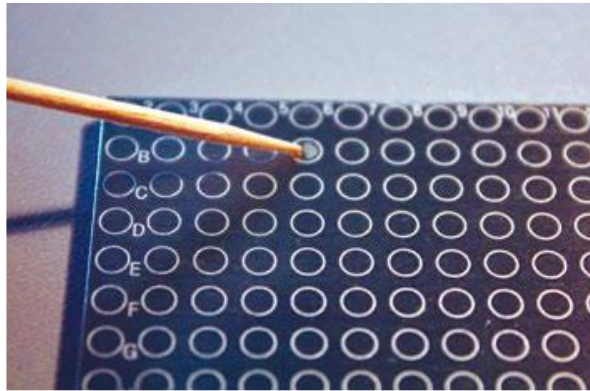
Za provođenje MALDI-TOF tehnike, osim uzorka kolonije uzgojene na Petrijevim zdjelicama, potrebno je osigurati sterilne čačkalice, automatsku pipetu do 10 µL, sterilizirane nastavke za pipete, MALDI pločicu, mravlju kiselinu, MALDI matricu (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina), instrument MALDI-TOF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



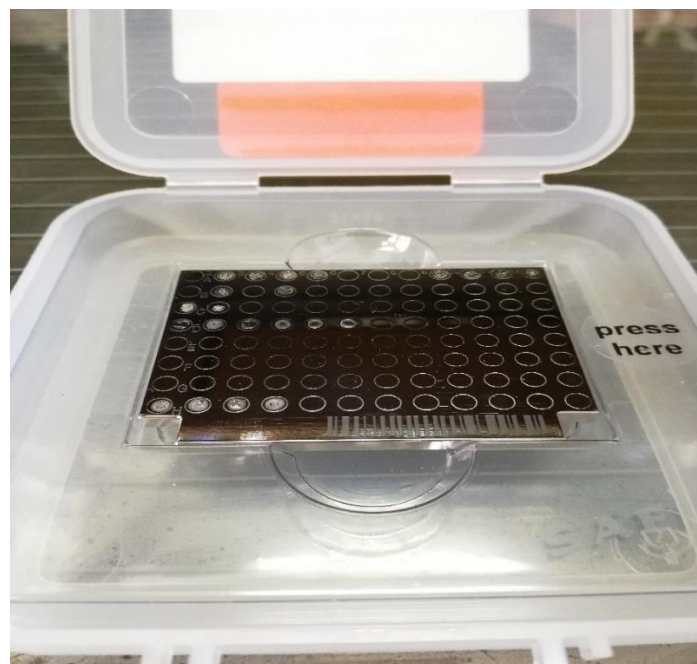
Slika 4.3.1. Prikaz MALDI-TOF spektrometra masa (microflex MALDI Biotyper Bruker)

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

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



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

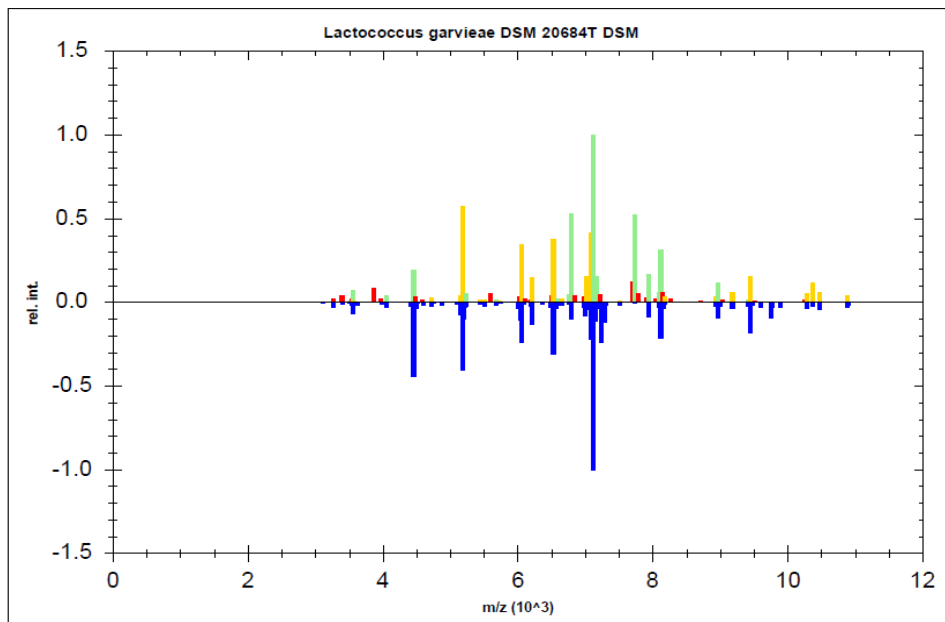
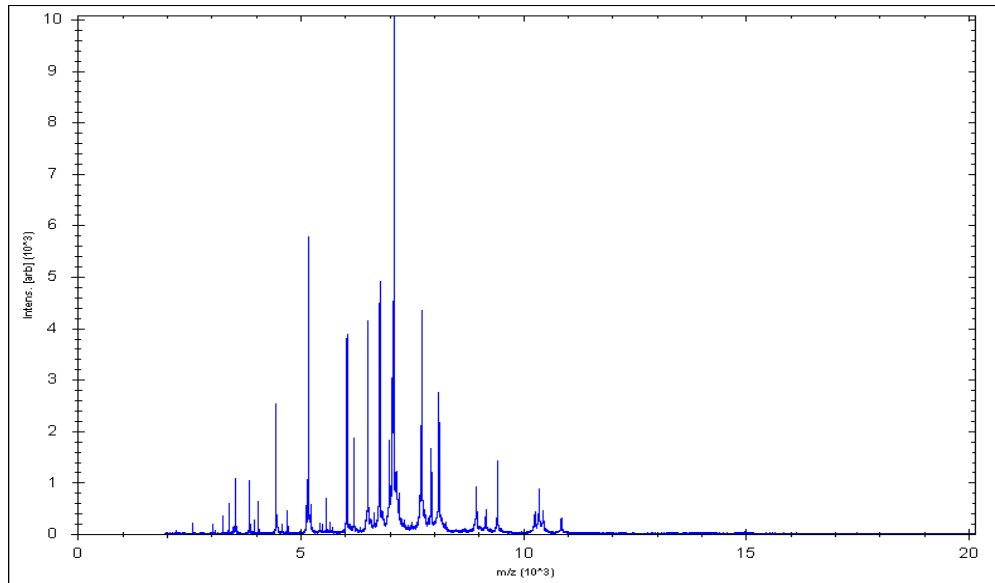


Slika 4.3.3. Priprema MALDI pločice za identifikaciju bakterija u MALDI-TOF spektrometru masa

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

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

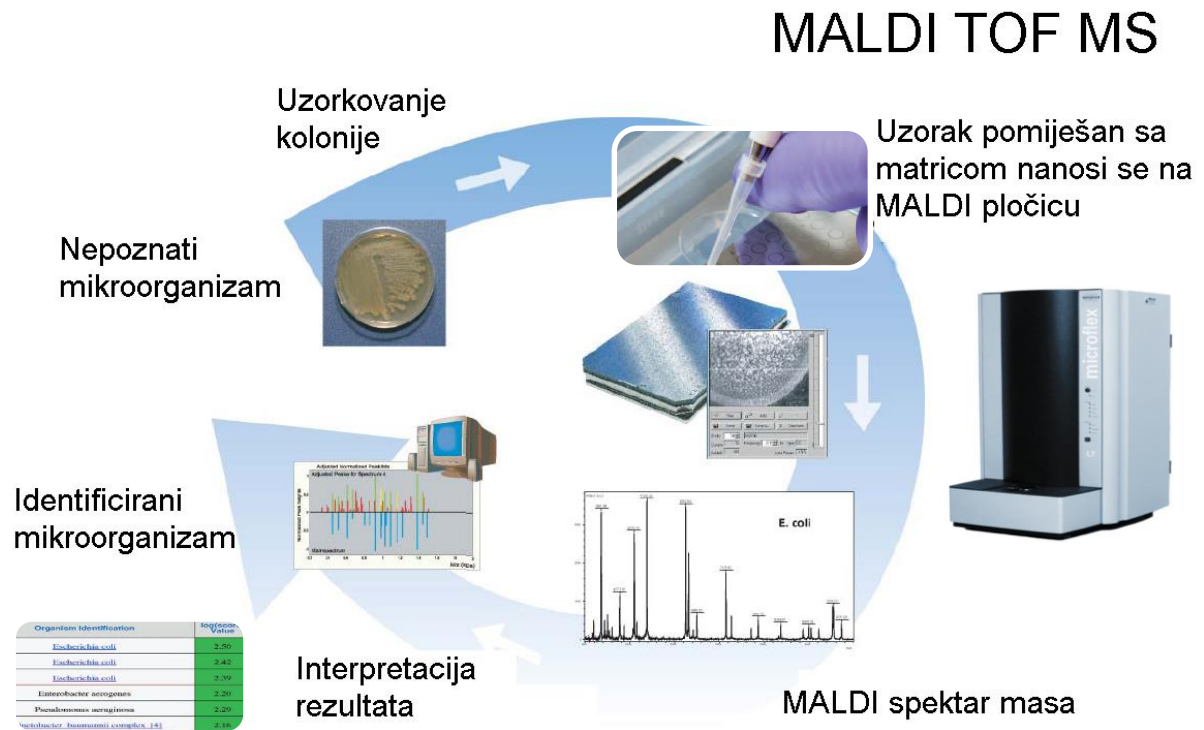
a)



b)

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

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



Slika 4.3.5. Prikaz tijeka rada MALDI-TOF Biotyper sustava

5. Rezultati i rasprava

5.1. Rezultati metode protočne citometrije

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.2. Rezultati MALDI-TOF tehnike u identifikaciji psihrotrofnih bakterija

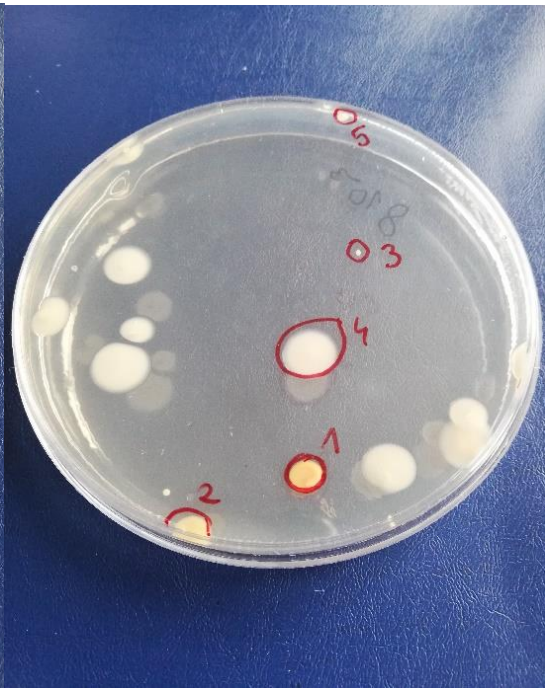
Za rezultate identifikacije izraslih kolonija na hranjivim podlogama korištena je MALDI-TOF tehnika. Prije pripreme MALDI pločice, izrasle kolonije se promotre i označe s brojevima za lakše uzorkovanje sterilnom čačkalicom. Kolonije istog morfološkog izgleda nisu uzorkovane dva puta. Pripremljene MALDI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

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

a)



b)



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

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

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

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

a)

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

b)

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

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

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

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

| Rank (Quality) | Matched Pattern | Score Value | NCBI Identifier |
|----------------|--|-------------|-----------------------|
| 1 (++) | Klebsiella oxytoca ATCC 700324 THL | 2.019 | 571 |
| 2 (+) | Klebsiella oxytoca VA31877_09 ERL | 1.943 | 571 |
| 3 (+) | Raoultella ornithinolytica MB_18887 CHB | 1.779 | 54291 |
| 4 (+) | Klebsiella oxytoca VA20876_2_09 ERL | 1.748 | 571 |
| 5 (+) | Klebsiella oxytoca ESBL_30298 PFM | 1.702 | 571 |
| 6 (-) | Raoultella ornithinolytica CCUG 52805 CCUG | 1.653 | 54291 |
| 7 (-) | Raoultella ornithinolytica DSM 7464T DSM | 1.626 | 54291 |
| 8 (-) | Klebsiella oxytoca 35130 PFM | 1.55 | 571 |
| 9 (-) | Raoultella ornithinolytica MHNC_57_7 ERL | 1.51 | 54291 |
| 10 (-) | Klebsiella oxytoca VA20879_09 ERL | 1.497 | 571 |

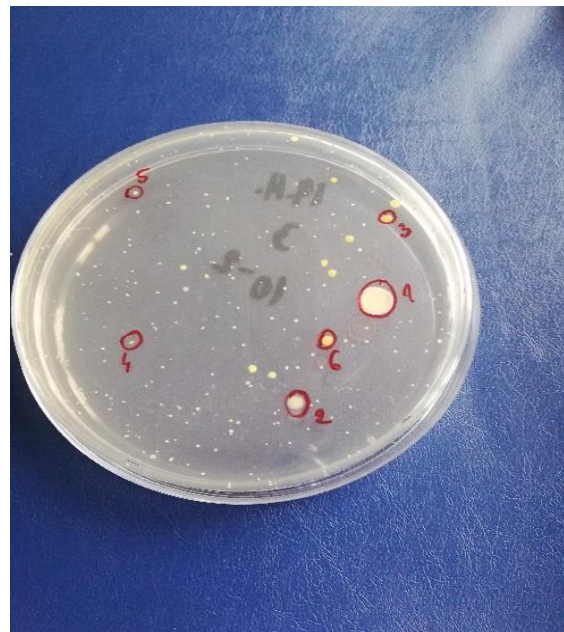
Slika 5.2.3. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za uzorak broj 8 (494/18) i koloniju označenu brojem 4

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

a)



b)



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

Na osnovi podudarnosti rezultata izrasle kolonije prikazane su sljedećim bakterijama:

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

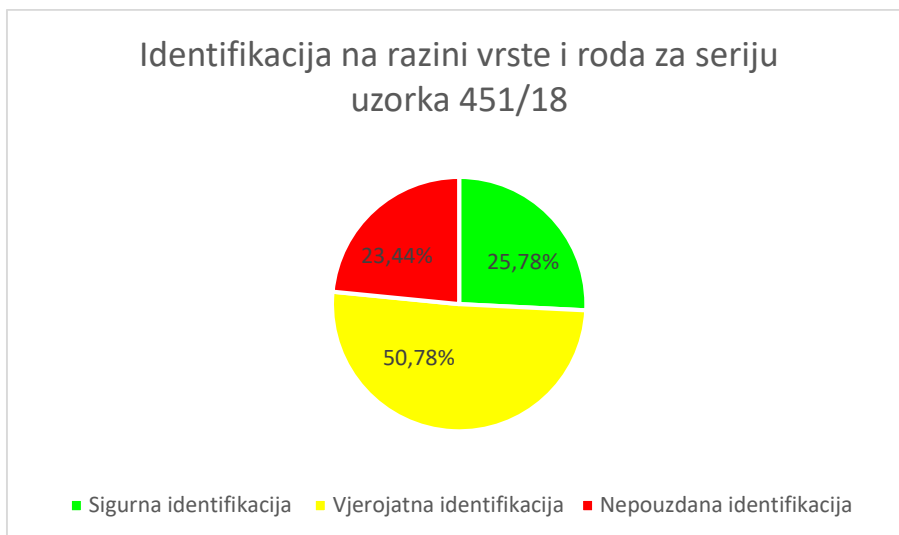
Na slici 5.2.4. zapaženo je podudaranje u izgledu i veličini izrasle kolonije pod brojem 3 i 6. Obje kolonije poprimaju okruglasti oblik i narančasto su obojene. Prema rezultatima identifikacije MALDI-TOF tehnike ustanovljeno je da se radi o istoj bakterijskoj vrsti *Microbacterium liquefaciens*. Kao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

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

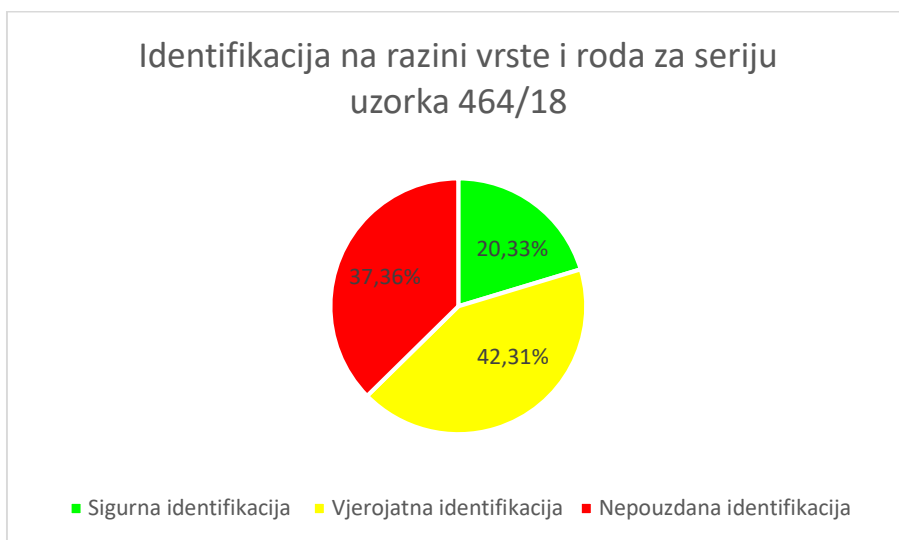
Tablica 5.2.1. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za serije uzoraka 451/18, 464/18 i 494/18

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

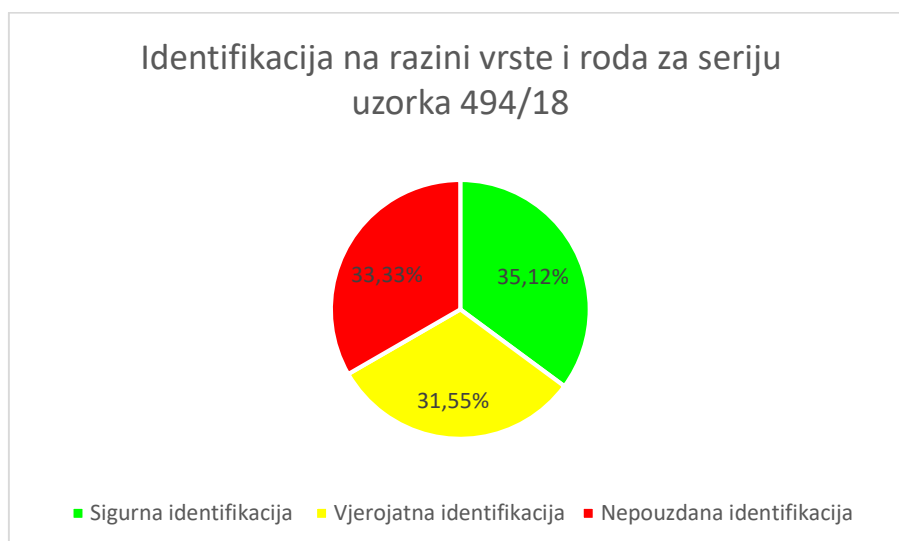
Grafikonima 5.2.5., 5.2.6. i 5.2.7. prikazani su MALDI Biotyper rezultati identifikacije bakterija na razini vrste i roda za serije 451/18, 464/18 i 494/18 izraženi u postocima (%). Upravo tim prikazom može se ukazati na raznolikost točnosti prikazanih rezultata dobivenih MALDI-TOF tehnikom za identifikaciju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



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

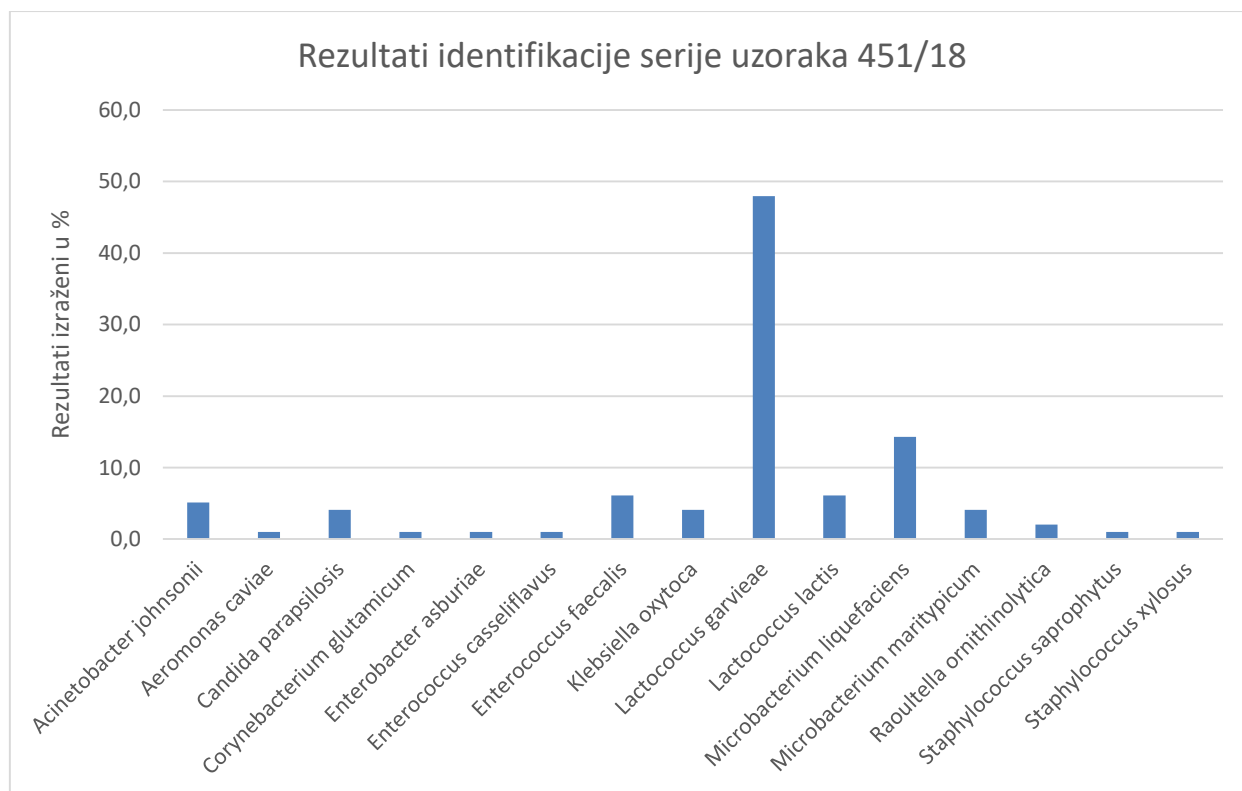


Grafikon 5.2.6. Prikaz Bruker Daltonic MALDI Biotyper rezultata za seriju 464/18 (%)



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

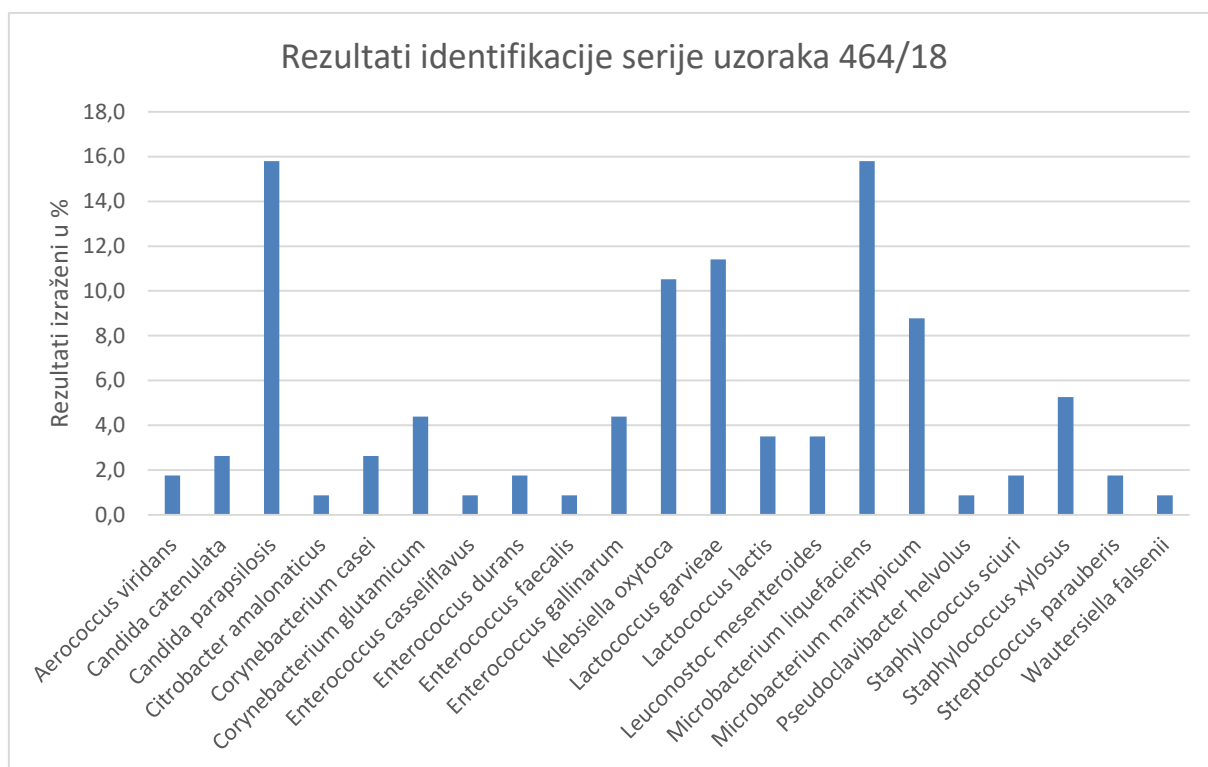
Od ukupno identificiranih 128 kolonija iz serije uzoraka 451/18, 33 rezultata je pouzdano identificirano i 65 vjerojatno identificirano (Tablica 5.2.1.) koje predstavljaju 15 bakterijskih vrsta. Grafikonom 5.2.8. prikazano je 15 bakterijskih vrsta i zastupljenost bakterija u uzorcima serije 451/18 izražena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



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

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

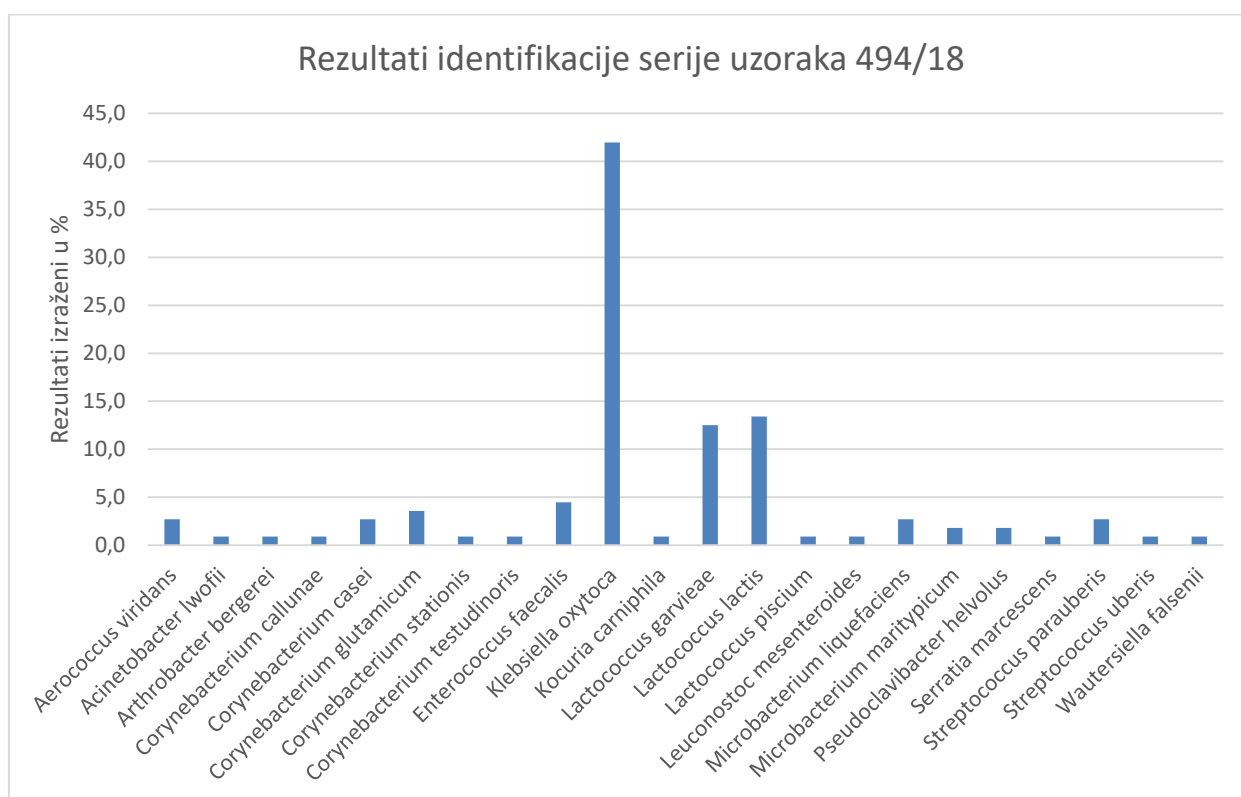
Rezultati serije 464/18 prikazani su grafikonom 5.2.9. Identificirana je 21 bakterijska vrste od 37 sigurno identificiranih i 77 vjerojatno identificiranih kolonija (Tablica 5.2.1.). Najveći udio zauzimaju *Candida parapsilosis* i *Microbacterium liquefaciens* (16%). Slijede bakterije prema raspodjeli: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



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

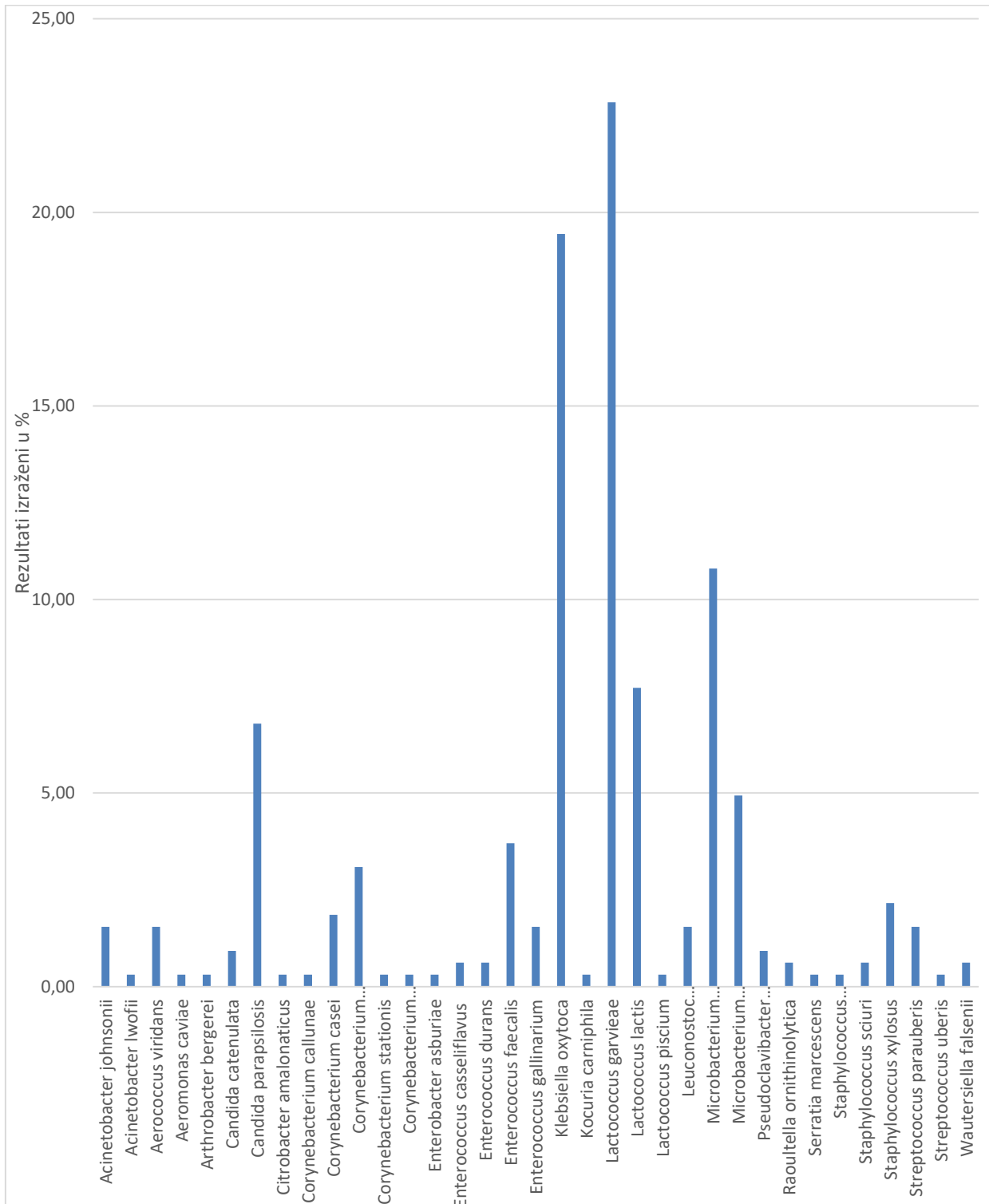
U grafikonu 5.2.10. prikazana je identifikacija 22 bakterijske vrste od 59 sigurno i 53 vjerojatno identificiranih kolonija (Tablica 5.2.1.), od kojih se najviše ističu vrijednosti bakterije *Klebsiella oxytoca* (42%) i *Lactococcus garvieae* (12%) iz serije uzoraka 494/18. Nadalje, pojavljuje se bakterija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

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



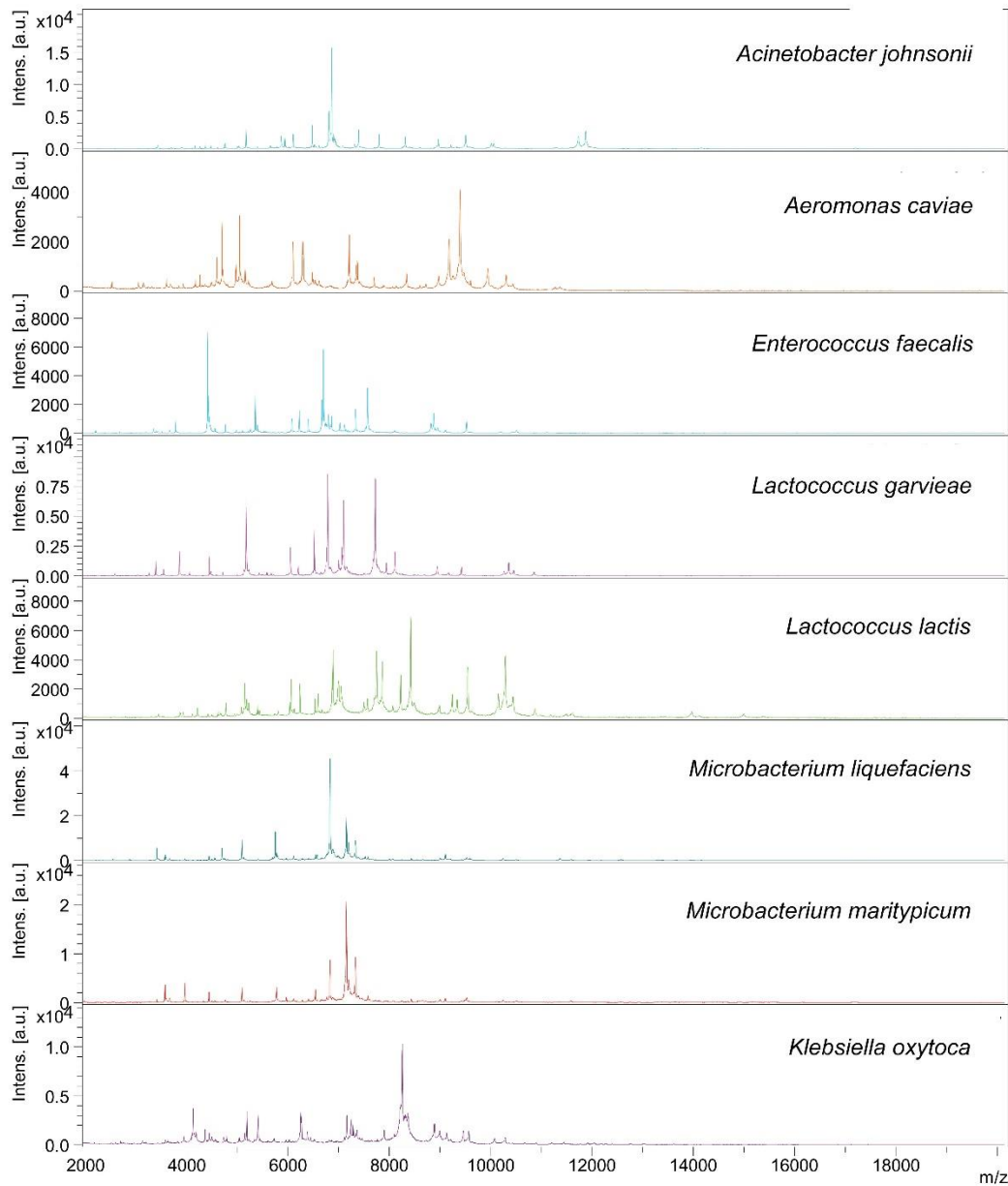
Grafikon 5.2.10. Rezultati identifikacije bakterija iz serije uzoraka 494/18 izraženi u postocima (%)

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



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

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



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

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

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

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

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

6. Zaključak

- Psihrotrofne bakterije glavni su mikrobní uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda i činjenica da se određene vrste svrstaju u patogene bakterije, kontrola prisutnosti psihrotrofnih bakterija u mljekarskoj industriji treba postati obaveznom redovitom rutinskom kontrolom.
- Prednost određivanja ukupnog broja psihrotrofnih bakterija metodom protočne citometrije je brza i automatizirana metoda koja može omogućiti mljekarskoj industriji brzi uvid u higijensku kvalitetu ohlađenog mlijeka.
- MALDI-TOF tehnika jednako se pokazala prikladnom za ocjenjivanje psihrotrofne populacije prisutne u sirovom mlijeku. Ova tehnika je jednostavna te visoko propusna u identifikaciji različitih bakterijskih vrsta.
- MALDI-TOF tehnikom u ohlađenom sirovom mlijeku identificirano je 20 rodova i 35 bakterijskih vrsta.
- Na temelju rezultata svih analiziranih serija može se zaključiti da rod *Lactococcus* spp. prevladava u ohlađenom mlijeku.
- Iako se MALDI-TOF metoda može koristiti za brzu i točnu identifikaciju psihrotrofnih bakterija uzgojenih na hranjivoj podlozi, u kombinaciji s metodom protočne citometrije dobiva se sveobuhvatniji uvid u mikrobiologiju sastava sirovog mlijeka.

7. Popis literature

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

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

8. Prilog

Tablica prikaza MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 451/18

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

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

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

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

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

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

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

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

Tablica prikaza MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 464/18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tablica prikaza MALDI Biotyper rezultata za seriju uzoraka 494/18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Životopis

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