

Une Westum Solli

Anaerobe sporer i rå melk under påvirkning av tid og temperatur

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Linda Helander, Kine Husteli Kristiansen

Juni 2020

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Une Westum Solli

Anaerobe sporer i rå melk under påvirkning av tid og temperatur

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Linda Helander, Kine Husteli Kristiansen
Juni 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Forord

Først vil jeg takke laboratorieleder ved TINE Råmelkslaboratoriet og faglig veileder, Linda Helander, for at jeg fikk skrive min bacheloroppgave hos dere. Samtidig vil jeg takke for gode råd og hjelp underveis i prosessen. Jeg vil også takke prosessveileder Kine Husteli Kristiansen for mange fine samtaler, og ikke minst all hjelp med å redigere oppgaven til slik den har blitt. Mine kollegaer ved Råmelkslaboratoriet fortjener også en takk for å ha holdt ut med meg og mine spørsmål. Det samme gjelder gjengen ved laboratoriet på TINE Meieriet Tunga og TINE Mastittlaboratoriet, Marina Aspholm ved NMBU og Inger Merethe Ødegård ved TINE. En siste takk vil jeg rette til familie og venner for oppmuntrende ord underveis i prosessen, og ikke minst hjelp med korrekturlesing av oppgaven. Jeg setter utrolig stor pris på dere alle sammen.

Trondheim, 14.06.20

Une W. Solli

Sammendrag

Oppgaven ble gitt av TINE SA Råmelkslaboratoriet. Hensikten var å finne ut hvilken påvirkning tid og temperatur har på anaerobe sporer i rå melk. Det skulle undersøkes påvirkning ved 4°C, 8°C, romtemperatur, 40°C og 50°C. Forsøkene ble utført på melkeprøver som hadde blitt oppbevart i nevnte temperaturer, og disse ble sådd ut ved bestemte tidspunkter for analysering ved bruk av en forenklet MPN-metode. Melkeprøvene var rå (upasteurisert) tankmelk som den siste tiden hadde fått 0-1 på anaerobt sporeresultat. Det ble benyttet tre paralleller for hver prøve, og tilsammen var det fem positive prøver (tilsatt ulik mengde sporekultur) og fem negative prøver. For å skape anaerobe forhold ble det benyttet glassrør med parafinpropp. I rørene ble det i tillegg til melkeprøven tilsatt buljong som inneholdt RCM (vekstmedium for clostridier) og nøytralrødt som er en redoksindikator. Gassdannelse og fargeomslag til gul ble regnet som positivt resultat.

I uke 1 av forsøkene fungerte ikke sporekulturen slik at de positive prøvene inneholdt den mengden sporer som allerede fantes i tankmelken, alle prøver fikk verdier på 0-1 gjennom hele forsøksuken, og dette inkluderte alle temperaturer. Fordi mengden sporer var lav ble det antatt at enkelte melkeprøver ikke hadde fått med noen sporer. I uke 2 og 3 av forsøkene fungerte sporekulturen godt, og alle de positive prøvene fikk 3 på anaerobt sporeresultat. Det var i utgangspunktet ønsket at de positive prøvene hadde varierende mengde sporer, som lettere kunne vist endringer, dette ble ikke oppnådd ved noen av forsøksukene. De negative prøvene i uke 2 varierte underveis i temperaturforsøkene, derfor ble korrelasjonskoeffisienten (r) vurdert på prøver med store endringer, r var $<0,975$ og viste at det ikke er noen god lineær sammenheng mellom tid ved de ulike temperaturene og anaerobt sporeresultat.

Selv om resultatene som ble oppnådd tilsier at det anaerobe sporeresultatet påvist med den forenklete MPN-metoden ikke forandres av oppbevaring i de satte temperaturene, kreves flere forsøk med andre metoder for å få mer presise resultater som kan si noe om den reelle mengden sporer i melken. Resultatene gir en indikasjon på det man kan forvente av anaerobe sporer i rå melk, men det kreves videre arbeid for å sikre at dette stemmer.

Abstract

This bachelor thesis was written in collaboration with TINE SA Råmelkslaboratoriet. The intention of this study was to examine the influence of time and temperature on anaerobic spores in raw milk. The temperatures tested were 4°C, 8°C, room temperature, 40°C and 50°C. Milk samples were stored at the aforementioned temperatures and analysed using a simplified MPN-method at specific times. The sample material was unpasteurized (raw) bulk milk with low anaerobic spore-results (0-1). For every analysis there were five positive samples (containing different volumes of spore-culture) and five negative samples, each of which were analysed using three parallels. Paraffine-containing test tubes were used to create anaerobic conditions. Every test tube was filled with bulk milk and a broth containing both RCM (reinforced clostridial medium) and a redox indicator. Positive results were indicated by gas lifting a paraffine-plug in the test tubes, together with a change in colour to yellow.

During week 1 of the study all of the positive controls got low anaerobic scores of 0-1, which indicated that the spore-culture had not worked, and that the spores which had been detected were those in the bulk milk alone. Due to the small number of spores achieved, there was an understanding that some of the milk samples did not contain any anaerobic spores. During week 2 and 3 of the study all of the positive controls got a result of 3, indicating a functioning spore-culture. The aim was to achieve positive controls with varying results to detect changes in anaerobic spores more easily. This was not achieved. The negative samples varied during week 2 of the study, but the correlation coefficient showed that there was no linear correlation between time stored at certain temperatures and anaerobic spore-results.

The results achieved during this study showed that anaerobic spore-results detected with a simplified MPN-method do not change with storage in the different temperatures tested. More studies with other, more precise methods, is needed to ensure that the real anaerobic spore number in raw milk do not change with the influence of time and temperature. An indication of what one might expect from anaerobic spores in raw milk is achieved in this study, but further work needs to be done to ensure that these results are in fact representative.

Begrepsliste

Elitemelk	Den beste melken det er mulig å oppnå. Basert på kvalitetsparametere som bakterier, celletall, frysepunkt, FAA, antibiotikaresten, sporer, lukt og smak.
Pasteurisering	Metodene for å drepe mikroorganismer i melk. Melken varmes til 72 °C i 15 sekunder. Dreper 98% av levende organismer. Gir mindre sjanse for sykdom hos mennesker og bedre holdbarhet på meieriprodukter.
Sporer	Hvilestadier som enkelte bakteriearter kan ha. De er svært motstandsdyktige, og holder bakterien i live når leveforholdene er ugunstige.
Endosporer	Sporer som dannes inni bakteriecella. Ofte har gram positive bakterier denne typen sporer.
Sporulering	Sporedannelse.
Germinering	Når en spore går ut av dvale og blir en fungerende bakteriecelle igjen. Skjer når forholdene ligger til rette for det.
Baktofuger	Fjerner bakterier og sporer (60%) i melk. Finnes kun på noen meierier.
<i>Bacillus cereus</i>	Aerobe sporedannere (omfatter 7 arter). Hovedsakelig i jord, men finnes også i tarm. Kan gi søtkeagulering av melkeprodukter, og danne biofilm. Gram positiv stavformede bakterier. Sommersporer.
PTS	Psykotrofisk termofil sporedanner. Kan vokse ved kjøleskapstemperatur.
<i>Clostridium</i>	Slekt av anaerobe sporedannere. Gram positive staver, hovedsakelige obligat anaerobe. Finnes i surfôr og jord. Kan gi ettergjæring av oster slik som Jarlsberg. Vintersporer.
Gastroenteritt	Betennelse i fordøyelseskanalen.
PCR	Amplifisering av DNA/RNA. Vil kunne gi økt effektivitet i vurdering av sporemengde.
Most probable number-metode	Kvantitativ statistisk test for å estimere bakteriekonsentrasjon.
Søtkeagulering	Koagulering av melk uten lav pH.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Begrepsliste	IV
Innholdsfortegnelse	V
1. Innledning	7
1.1 Kort om TINE og kyrne melka kommer fra.....	7
1.2 Næringsinnhold i melk og kvalitetsparametere for betaling av melka	7
1.3 Hva er pasteurisering, og hvilken betydning har prosessen?.....	9
1.4 Mikroorganismer som finnes i melk og hvorfor noen er uønsket	10
1.5 Sporedannende bakterier sin betydning i meieriindustrien	11
1.5.1 De ulike trinnene i sporulering.....	14
1.5.2 Germinering og germinanter	15
1.5.3 Aerobe sporedannere og utfordringer med disse i meieriindustrien	16
1.5.4 Anaerobe sporedannere og hvilke problemer disse forårsaker i meieriindustrien	17
1.5.5 Most Probable Number (MPN)-metode for bestemmelse av mengde anaerobe sporer i rå melk	19
1.5.6 Bruk av Polymerase Chain Reaction (PCR) til deteksjon av sporer.....	20
1.6 Råmelkslaboratoriet og andre laboratorier i TINE.....	21
1.7 Problemstilling for oppgaven	23
2. Materialer og metode	24
2.1 Utstyr brukt i laboratoriepraksis	24
2.2 Forenklet MPN-metode for bestemmelse av mengde anaerobe sporer i rå melk ved Råmelkslaboratoriet.....	25
2.3 Fremgangsmåte for forsøkene	26
2.4 Tillaging av melkeprøver.....	30
2.5 Temperaturkontroll.....	31
2.6 Sporekultur vha positive prøver funnet i daglig drift	31
2.7 Artsanalyse av ulike rør fra MPN-metoden vha Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight (MALDI-TOF).....	33
3. Resultater	35
3.1 Resultater fra Uke 1	35
3.2 Resultater fra Uke 2	36
3.3 Resultater fra Uke 3.....	38
4. Diskusjon	41
4.1 Bruk av 3-rørs MPN-metode og vurdering av egnethet	41
4.2 Vurdering av prøver til PCR.....	42
4.3 Resultater oppnådd gjennom forsøksperioden.....	43

4.4 Oppbevaring fram til ferdig analyse.....	45
4.5 Negative kontroller og blankprøver.....	46
4.6 Avlesning av resultat.....	47
4.7 Andre feilkilder	47
4.8 Utførelse av laboratorieforsøk.....	47
4.9 Bruk av sporekultur til positive prøver	48
4.10 Kvalitetssikring av analysen	48
5. Konklusjon	49
6. Referanser	50
7. Vedlegg	53
7.1 Rådata fra analysering av anaerobe sporer med forenklet MPN-metode - Uke 1	53
7.2 Rådata fra analysering av anaerobe sporer med forenklet MPN-metode - Uke 2	57
7.3 Rådata fra analysering av anaerobe sporer med forenklet MPN-metode - Uke 3	61
7.4 Heatmaps for alle temperaturer – Uke 1	65
7.5 Heatmaps for alle temperaturer – Uke 2	67
7.6 Heatmaps for alle temperaturer – Uke 3	69
7.7 Punktdiagram for P6-P10 ved 4°C, 8°C og romtemperatur uke 2.....	71

1. Innledning

1.1 Kort om TINE og kyrne melka kommer fra

Bacheloroppgaven er et samarbeid med TINE SA Råmelkslaboratoriet. TINE har siden 1881 vokst til å bli en av Norges største næringsmiddelkonsern, med over 500 ulike produkter som hovedsakelig omsettes i Norge. TINE SA er morselskapet og eies av melkeprodusentene. Hver melkebonde som leverer melk til TINE har en andel i selskapet og regnes som eier, samvirkeselskapet har på denne måten rundt 10 000 eiere. (1) I Norge er det 215 000 melkekyr (tall fra 2019) (2), og de fleste av disse er av rasen Norsk Rødt Fe (NRF). En ku går drektig i omtrent ni måneder, og kan derfor få en kalv i året. Mengde melk som produseres av en ku årlig varierer mellom 3000L og 10 000L. (3)

Årsrapport TINE 2019 viser at det ble levert 1393,8 millioner liter kumelk, og 20 millioner liter geitemelk. Det finnes 30 meierier i Norge per januar 2020, som har ansvar for å produsere varene i selskapets repertoar. Datterselskaper i TINE inkluderer blant annet DiplomIs AS og Ostekompaniet AS. TINE leverer merkevarer godt kjent for de fleste, dette innebærer produkter som Norvegia, Go'morgen, Sunniva juice og Tinemelk. Selskapet har gjennom over 100 år etablert en tillit til befolkningen ved at TINE produkter representerer trygge varer. I 2019 ble selskapet kåret til årets leverandør av REMA 1000 og flere av COOP sine kjeder. (4) Det er svært viktig at laboratoriene i TINE sjekker at melken holder den kvaliteten den skal ha, det er tross alt «*kanskje verdens fineste melk*».

1.2 Næringsinnhold i melk og kvalitetsparametere for betaling av melka

Melk produseres normalt av alle pattedyr, og fungerer som et næringsmiddel. Hoveddelen er vann, resten kalles tørrstoff og består av protein, fett, laktose og aske ([Tabell 1](#)). Kasein er det proteinet man finner mest av i melk, resten er myseprotein. 4% av melken er fett, hvor mesteparten er triglyserider. Resten av fettene er blant annet fettløselige vitaminer (A, D, E, K) og karoten som gir gul farge. Vannløselige vitaminer som B og C finnes også i melk. Laktose (i.e. melkesukker) er et disakkarid som bare finnes i melk, og omdannes til melkesyre av melkesyrebakterier. Aske er en sammensetning av ulike salter fra metaller, og det man sitter igjen med dersom tørrstoffet brennes. De viktigste metallionene i melk er kalium, kalsium og magnesium. Melkens sammensetning varierer ut ifra blant annet fôring og arv, men også mellom dyreslag. (5)

Tabell 1: Næringsinnholdet i melk delt i vann og tørrstoff med forklaring på hva de ulike delene tørrstoff består av. (5)

Vann (hovedbestanddel)	Tørrstoff	Forklaring
Vannløselige vitaminer	Protein	Kasein og myseprotein
	Fett	Triglyserider, litt fettløselige vitaminer og karoten
	Laktose	Disakkarid i melk
	Aske	Salter fra metaller (K ⁺ , Ca ²⁺ og Mg ²⁺)

Leverandørmelk er melken bøndene leverer til meieriene, og denne har bestemte kvalitetskrav (Tabell 2) som styrer hvilken betaling melkeprodusenten får. Det vurderes kjemisk innhold som innebærer fett, protein, celletall, frie fettsyrer og frysepunkt i tillegg til antall bakterier og mengde sporer. Dette gjøres for å stimulere til god melkeproduksjon, og dårlig kvalitet over lengre tid vil føre til leveransestopp. Kvaliteten på melka deles inn i fire kategorier, der elitemelk er den beste melken det er mulig å oppnå (Tabell 3). (5) Melk av 1. klasse regnes som tilfredsstillende kvalitet, melk av 2. og 3. klasse regnes som lite tilfredsstillende. Det er en basispris for både ku- og geitemelk som med ulike tillegg og trekk gir den totale melkeprisen. (6) Bøndene kan ved hjelp av foring, avl og hygiene regulere hvordan melkekvaliteten blir, i tillegg vil tidspunkt, årstid og dyrets helsetilstand være med å påvirke melkens kvalitet. (5)

Tabell 2: Kvalitetsparametere for kumelk som brukes til å vurdere hvilken betaling melkebonden skal få for melken som er levert til meieri (5)(7)

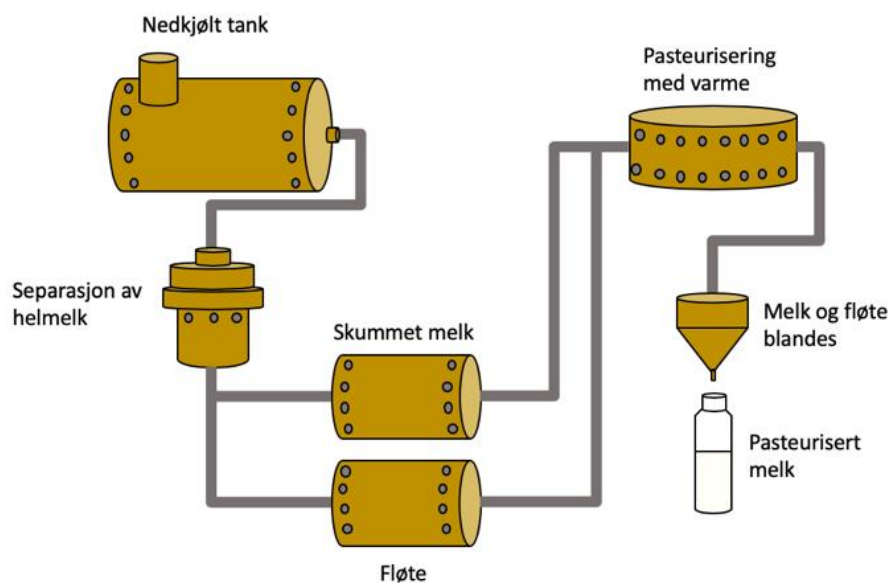
Bakterier	Mengde bakterier i melka. Krav til elitemelk er under 100 000/ml. Benytter metoden bactocount til bakterieanalyser i dag. Et vanlig bakterietall i melk er 30 000/ml, mens det normalt finnes <400/L av anaerobe sporer.
Celletall	Høye celletall er uønsket pga høyere innhold av blodprotein og salter. Det måles i hovedsak leukocytter. Celletallet er et mål på jurhelsen. Infeksjon eller skader kan gi økt celletall.
Lukt og smak	Det gis trekk i melkeprisen ved sterk lukt- og smaksfeil.
Frysepunkt	Gjennomsnittlig ligger frysepunktet på -0,525°C. Dersom frysepunktet stiger over -0,510°C vil dette føre til trekk.
Frie fettsyrer	Besk smak i melk har en direkte sammenheng med høye verdier av frie fettsyrer (FFA).
Medisinrester (antibiotika)	Ved funn av antibiotika i melka vil produsenten ikke få betalt for leveransen. Man kan ikke levere ut produkter med antibiotikarester.
Sporer	Det analyseres for aerobe og anaerobe sporedannere. Fjernes ikke ved pasteurisering (oppvarming til 72 °C). Høy sporemengde kan ødelegge produktene/gi sykdom.

Tabell 3: Fire kategorier for klassifisering av melkekvalitet ut ifra kriterier nevnt i tabell 2, hvor elitemelk er den aller beste kvaliteten. (5)(6)

Kvalitet på melka	Hva klassen innebærer
Elitemelk	Gir tillegg per L melk levert i måneden (elitetillegg).
1. klasse	Gir basispris på melka (hverken tillegg eller trekk).
2. klasse	Gir trekk i melkeprisen som øker for hver gang (dårlig kvalitet).
3. klasse	Gir trekk i melkeprisen som øker for hver gang (svært dårlig kvalitet).

1.3 Hva er pasteurisering, og hvilken betydning har prosessen?

Ordet pasteurisering kommer fra oppfinneren Louis Pasteur som på 1860-tallet oppdaget mikroorganismer i vin som årsak til at den surnet. Han fant at ved oppvarming døde disse mikrobene, og at metoden kunne benyttes på annen mat og drikke for å forlenge holdbarhet uten å endre utseende eller smak. (8) Pasteurisering (*Figur 1*) er en varmebehandling som foregår mellom 60°C og 100°C. (9) Lavpasteurisering foregår ved at f.eks. melk varmes opp til 72 °C i 15 sekunder, som dreper omtrent 98% av levende organismer slik som koliforme bakterier, gjær- og muggsopp samtidig som man ødelegger uønskede enzymer. (5) Koliforme bakterier er en del av tarmfloraen hos mennesker og dyr, funn i melk indikerer derfor svikt i hygiene. (10) Ved å utføre pasteurisering øker man trygghet og holdbarhet til ulike produkter som melk, ost og juice. (9)

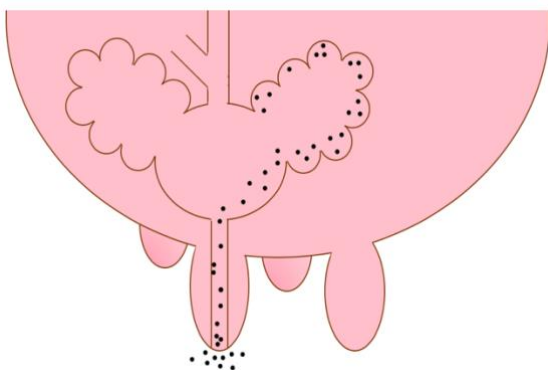


Figur 1: Viser et pasteuriseringsoppsett fra 1900-tallet. Melk blir varmet opp til 72 °C i 15 sekunder (pasteurisering) og avkjøles deretter. Figuren er laget ut ifra figur s.14 i boka "Louis Pasteur og bakteriene".

Pasteurisering har vært med på å bedre folkehelsa gjennom å hindre spredning av sykdommer som tuberkulose og tyfus. (5) Like før andre verdenskrig forårsaket melk omtrent 25% av all matbåren sykdom, tallet er i dag <1% og skyldes innføring av pasteurisering i kombinasjon med bedre rutiner på gårdene. Det er svært viktig at melken pasteuriseres for å unngå sykdom hos forbrukere som skyldes melk og meieriprodukter. Et produkt fra upasteurisert melk har 150 ganger større sjans for å gi sykdom. Spesielt viktig er pasteuriserte produkter for medlemmer av befolkningen med svekket immunforsvar. (9) For å sterilisere melk (i.e. fjerne bakterier og bakteriesporer) kreves rundt 140°C i 15 sekunder. Fordi pasteurisering ikke steriliserer melk kreves kjølig oppbevaring (kjøleskapstemperatur) av produkter for å unngå vekst av bakterier. (9) Høyere temperaturer ved pasteurisering vil kunne føre til fysiske og kjemiske endringer i meieriproduktene. (5)

1.4 Mikroorganismer som finnes i melk og hvorfor noen er uønsket

Melk er svært næringsrikt da det i utgangspunktet produseres for å fø et avkom, og gir derfor mange ulike mikroorganismer mulighet til å formere seg i væsken. (5) Når melken skilles ut i juret er den tilnærmet steril. Mikroorganismer i melk kommer derfor fra utsiden ved melking (7), de også kan komme innenfra ved mastitt (i.e. jurbetennelse, [Figur 2](#)). (3) Melka regnes som steril i juret fordi det ikke er noen mikroorganismer til stede her hos friske kyr, det finnes derimot ulike bakteriearter i spenekanalen slik som stafylokokker. Enkelte bakterier er ønsket i produksjon for å lage spesifikke produkter. (11) Det benyttes hovedsakelig melkesyrebakterier for å fermentere melk til ulike meieriprodukter som ost og yoghurt, fordi de konverterer laktose til melkesyre svært effektivt (11), f.eks. *Lactobacillus rhamnosus* GG for å lage Biola. (5)



Figur 2: Viser et jur hvor bakterier er på vei opp i spenekanalen, hvor de derifra kan etablere seg i melkegang og -blære. Slik ser det ut ved mastitt (de små prikkene indikerer bakterier). Figuren er laget ut ifra figur i «Drøvtyggerboka» s.214.

Uønskede mikroorganismer kan gjøre forbrukere syke, samtidig som de vil kunne gi produksjonsfeil og nedsatt holdbarhet av meieriprodukter. (5) Forringelse av meieriprodukter skyldes at de uønskede mikroorganismene produserer enzymer som hydrolyserer substanser i melken slik som laktose, protein og fett. (11) Patogene bakterier som vanligst forekommer i melk innebærer *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, og *Escherichia coli* ([Tabell 4](#)). De patogene bakteriene kan gi kraftige symptomer men fjernes ved pasteurisering, mens bakteriesporer ikke ødelegges da de er svært motstandsdyktige. (5) Det er sporedannende bakterier man leter etter i melk, nettopp fordi de ikke fjernes ved pasteurisering. For å holde uønskede mikroorganismer unna er det strenge hygienetiltak ved drift i tillegg til desinfeksjon, lav temperatur ved lagring og tilsats av konserveringsmiddel i enkelte produkter. (5)

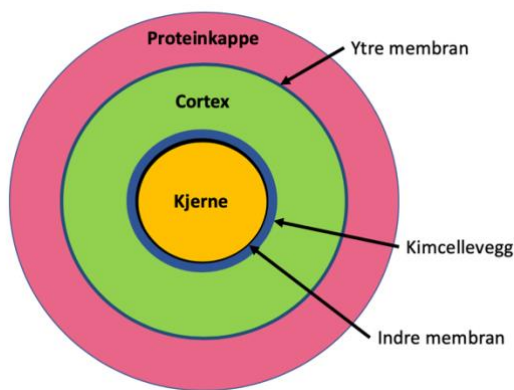
Tabell 4: Oversikt over enkelte mikroorganismer som kan finnes i melk, både patogene og uønskede i forhold til meieriproduksjon. (5)(12)

Bakterienavn	Aerob/Anaerob	Sporedannende	Ønsket/uønsket
<i>Lacotobacillus GG</i>	Anaerob	Nei	Ønsket
<i>L. monocytogenes</i>	Fakultativ anaerob	Nei	Uønsket
<i>Salmonella</i>	Fakultativ anaerob	Nei	Uønsket
<i>S. aureus</i>	Fakultativ anaerob	Nei	Uønsket
<i>E. coli</i>	Fakultativ anaerob	Nei	Uønsket

1.5 Sporedannende bakterier sin betydning i meieriindustrien

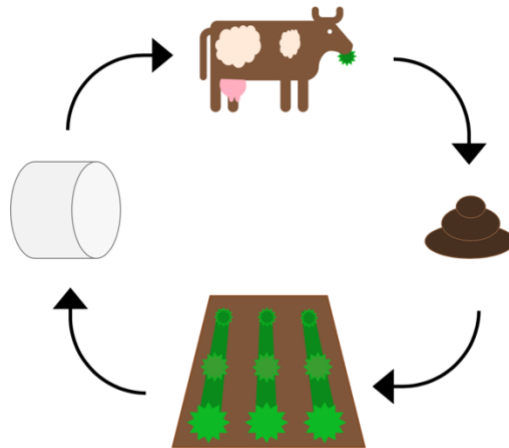
Den største kvalitetsutfordringen i rå melk hos meieriene er sporer. (13) I produksjon av meieriprodukter er de to viktigste sporedannende slektene *Bacillus* og *Clostridium*. Sporer er hvilestadier som enkelte bakteriearter kan ha, som er svært motstandsdyktige og holder bakterien i live når levetilstandene er ugunstige, f.eks. ved lite næring eller høyt stress fra omgivelsene. (7) Det finnes ulike typer sporer, f.eks. endosporer som dannes inni bakteriecella hos flere gram positive bakterier. (14) Endosporer vil omtales som sporer videre i denne oppgaven. Sporulering (i.e. sporedannelse – [kap.1.5.1](#)) tar flere timer å utføre, og skjer ved en rekke prosesser som ender i at bakteriecellen dør ved programmert celledød og sporen slippes ut i miljøet. Når miljøet rundt sporen blir mer gunstig vil den gå ut av dvale. (14) Når sporen går ut av dvale og blir en bakteriecelle igjen, har den gjennomgått germinering ([kap.1.5.2](#)). Denne prosessen starter ofte ved kontakt med næring i det ytre miljøet, og kan være næringsstoffer som aminosyrer eller sukker. (7)

Sporer tåler mange ytre påvirkninger som UV-stråling, uttørking, ekstreme temperaturer (høye og lave), desinfeksjonsmidler og enzymatisk ødeleggelse som tilsammen gjør dem vanskelig å bli kvitt. (7) (14) Forklaringen på hvorfor sporer er så hardføre finnes i oppbygningen. Det ytre sporelaget er en proteinkappe som gjør sporen motstandsdyktig mot kjemisk og enzymatisk behandling (*Figur 3*). Under kappen er det et tykt peptidoglykanlag, cortex, som hindrer påvirkning fra høye temperaturer. Kimcelleveggen under cortex består også av peptidoglykan som danner celleveggen når sporen germinerer. Den indre membranen står imot påvirkning av kjemikalier. Sentrum av sporen, kjernen, inneholder bakteriens DNA, ribosomer og dipocolinsyre som spiller en viktig rolle i å holde dvalen. Kjernen er svært dehydrert. Små syreløselige proteiner binder seg til og kondenserer DNA, dette beskytter mot UV-lys og andre kjemiske forbindelser. (14)



Figur 3: Tverrsnitt av en spore, laget ut fra figur på micro.cornell.edu. Figuren viser den ytre proteinkappen, cortex og kimcelleveggen som begge består av peptidoglykan. Den indre membranen og kjernen med innhold av bakterie-DNA.

Sporer assosieres ofte med jord, surfôr/grovfôr, fæces og dårlig jurhygiene. Surfôr er gress som konserveres ved anaerob fermentering (i.e. gjæring), og blir tettpakket i plastikk for å oppnå anaerobe forhold. (15) Oppvekst av sporer i foret kan skyldes fermentering, pH, kontaminering, og for lavt kuttet gress hvor det blir med jord med naturlig sporeinnhold. (16) (7) Kua vil kunne få i seg mange sporer gjennom fôret, få økt mengde sporer i fordøyelses-systemet og dermed økt mengde i fæces. Kontaminert fæces vil kunne feste seg til jur og spener, og uten god vask før melking vil man få høy sporemengde i den rå melken. Bønder som gjødsler med kontaminert fæces vil kunne oppleve å gå inn i en syklus med høye sporetall (*Figur 4*). Når kyr er på beite kan de også få jord på jur/spener, og her finnes det mange sporer naturlig. Andre kilder til sporer er underlag brukt i fjøs slik som sagflis, dette er som regel bare et problem om vinteren når kyrne ikke går ute. (16)



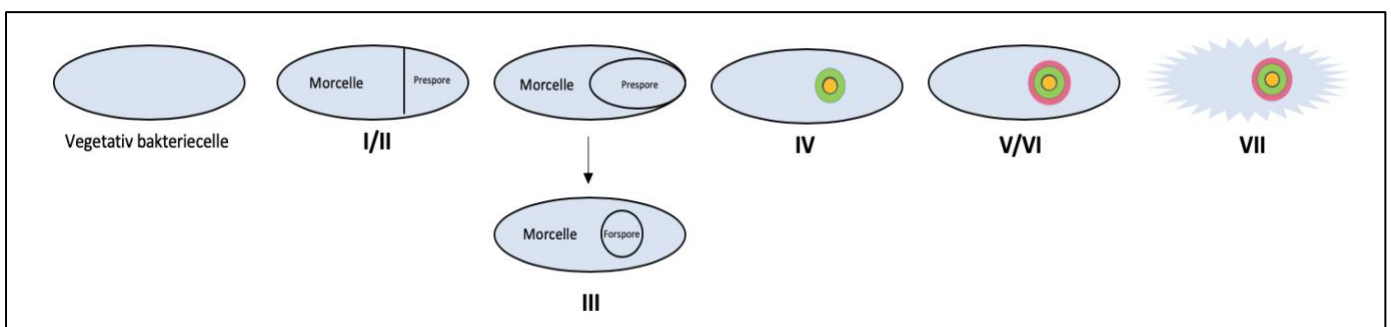
Figur 4: Sporekretsløpet, laget ut ifra figur på «Tiltak på jordet mot sporer» (17). Figuren viser hvordan sporer fra surfôr/grovfôr blir konsumert av kua. Sporene hopper opp i fordøyelseskanalen og finnes i store mengder i kuas avføring. Kontaminert fæces vil kunne feste seg til spener og kontaminere melka som tas ut. Dersom bonden gjødsler med kontaminert fæces vil neste avling surfôr/grovfôr også ha høyt sporeinnhold, og hen er i en syklus med høye sporetall.

Sporer finnes naturlig, og man kan derfor ikke fjerne risikoen for sporer i melk helt, men mye kan gjøres for å forebygge. Mange sporer i melk vil ha store betydninger for folkehelsen og kostnader i meieriindustrien som skyldes at de kan gi sykdom i form av f.eks. matforgiftning, og vil kunne ødelegge meieriprodukter. (16) Det er estimert at det koster 2-5 millioner NOK for et utbrudd med *Clostridium* ved et meieri. (18) Baktofuger kan hjelpe til med å fjerne sporer og bakterier i melk. Maskinene kan fjerne 60% av sporene, men høye kostnader gjør det umulig å drifte baktofuger ved alle meierier. (16) Årlig antatt kostnad for baktofugering i osteproduksjon hos TINE er 10 millioner NOK. (18) Mikrofiltrering er også en løsning for å minke sporemengden i melk, men metoden er begrenset til skummet melk fordi sporer har omtrent samme størrelse som fettmolekyler i helmelk, og kostnad er også her en begrensende faktor. Ved gode hygienetiltak vil man kunne minske risikoen for høye sporetall betydelig, det er vist at blant annet god jurhygiene reduserer sporemengde. (16)

1.5.1 De ulike trinnene i sporulering

Sporulering gjør at bakterier kan overleve lenger i uønskede forhold. Sporestadiet hos en bakterie har til forskjell fra den vegetative tilstanden ingen metabolsk aktivitet. *Clostridium* har en sporuleringsregulator kalt Spo0A, som også finnes i *Bacillus*. Spo0A er en av de viktigste transkripsjonsfaktorene i sporuleringen, og har som funksjon å kontrollere overgangen fra vegetativ celle til en spore. De fleste studier av sporulering er utført på *Bacillus*, men arten har flere likhetstrekk med *Clostridium*. Man tror i dag at sporedannelse trigges av næringsmangel eller nærvær av toksiske komponenter. Det er ikke helt klart hvordan sporuleringen initieres hos *Clostridium*, det man vet er at den ikke har et fosforyleringssystem som man finner hos *Bacillus*. Kinaser kan initiere sporulering ved at de mottar stimuli ekstra- og intracellulært. (19)

Sporulering deles i trinn I-VII (*Figur 5*) hvor trinn 0 er før sporedannelsen begynner, og bakteriecellen er i vegetativ tilstand. Trinn I/II: DNA frigjøres og celledelingen gir to asymmetriske rom. Det minste rommet er et prespore-rom, det største til morcellen. SpoIII_E er en DNA translokase som gjør at alt DNA-et i bakteriecellen flyttes til prespore-rommet. Trinn III: det dannes en forspore med membraner ved at morcellen konsumerer presporen. Trinn IV: kimcelleveggen og cortex syntetiseres av peptidoglykanlaget, og ender opp mellom de indre og ytre membranene til forsporen. Trinn V: proteinkappen dannes ved en sammensetning av ulike proteiner på overflaten av forsporen. Trinn VI: her dannes sporens beskyttelse mot høye temperaturer og UV-stråling. Trinn VII: siste fase av sporuleringen – her frigjøres sporen fra morcellen. (19)



Figur 5: viser alle trinnene i sporulering fra I-VII. I trinn I dannes en prespore, i trinn II dannes en forspore. I trinn IV-VI dannes en ferdig spore. I siste fase; VII frigjøres sporen fra morcellen. Tegnet av figur fra Cornell university (14).

1.5.2 Germinering og germinanter

Ved ugunstige forhold kan flere arter i både *Bacillus*- og *Clostridium*-slekten danne sporer som overlever i flere år. En spore vil konstant overvåke miljøet den befinner seg i for å se om den kan germinere, og igjen bli til en vegetativ bakteriecelle. Germinering styres av proteiner som ble syntetisert under sporulering, disse proteinene aktiverer ulike signalveier når sporen opplever gunstige forhold. (20) Når en spore germinerer vil den gi opphav til en vegetativ bakteriecelle som formerer seg og kan forårsake f.eks. matforgiftning eller forringelse av meieriprodukter. (21) Germinering trigges oftest av tilgang på næringsstoffer, som da vil fungere som såkalte «germinanter». En spore har flere germinant-reseptorer (GR) med ulik spesifisitet for germinanter som ligger i den indre membranen i sporen (*Figur 3*). Mange ulike germinanter kan derfor trigge germinering av en spore. (20) Germinering kan også skyldes fysiske forhold som høyt hydrostatisk press, varme og aldring. Prosessen er irreversibel. (21)

En aktivert spore vil oftest respondere raskere til germinanter. Sporene kan aktiveres av forlenget oppbevaring ved 4°C eller oppvarming ved en høyere temperatur som ikke dreper sporen. (22) Det er vist at en stamme av *C. perfringens* kan germinere blant annet dersom KCl og natriumfosfat er tilstede. Akkurat hva som skjer når en germinant bindes til sin korrekte GR er fremdeles ukjent, men det er underforstått at dette fører til et signal. GR initierer en rekke prosesser i sporen når tilhørende germinant fester seg i reseptoren; det vil f.eks. frigjøres kationer og dipokolinsyre som fører til hydrolyse av cortex. Når cortex degraderes pga hydrolyse av peptidoglykan vil sporen kunne ekspandere, og dermed tillate vannopptak lik en vegetativ celle. Når cellen er hydrert vil metabolismen starte, og sporen vil tilslutt bli en vegetativ celle. (20)

1.5.3 Aerobe sporedannere og utfordringer med disse i meieriindustrien

Aerobe sporedannere, i hovedsak baciller, kan skape store utfordringer for meieriindustrien. Ved dårlig jurhygiene vil man kunne få med sporer i melka og inn på meieri ved at kuas spener får jord eller gress på seg. *Bacillus*-slekten består av gram positive stavformede bakterier som kan være obligat aerobe eller fakultativt anaerobe, og de ble tidligere regnet som jordorganismer da de hovedsakelig finnes i jord, men de er også påvist i tarm hos dyr. (7) Baciller tilhører gruppen psykotrofiske termofile sporedannere (PTS) som kan vokse ved kjøleskapstemperatur. (16) *Bacillus cereus* regnes som en av de viktigste aerobe sporedannere fordi den har evne til å gi matforgiftning grunnet sin toksinproduksjon, samt produksjon av enzymer som forringer melk og melkeprodukter (*Tabell 5*). (16)

Tabell 5: Viser en oversikt over aerobe sporedannere med betydning i meieriindustrien med latinsk navn, sykdom arten kan forårsake og hvilke meieriprodukter som ødelegges ved høyt innhold av bakterien (7)(13)

Bakterie	Sykdom den forårsaker	Meieriprodukter som ødelegges
<i>B. cereus</i>	Matforgiftning (diaré, magekrampe, kvalme og oppkast)	Søtkoagulering av konsummelkprodukter. Andre berørte produkter er kremfløte og grøter. Syrnede produkter kan også forringes av <i>B. cereus</i> .

B. cereus omfatter sju ulike arter, og er en viktig undergruppe av *Bacillus*. Medlemmene i gruppen av baciller kan produsere terminale eller sentrale sporer (*Figur 6*), og den levende bakterien tilpasser seg lett temperaturer fra 4°C til 50°C. (7) Bakterien kan forårsake matforgiftning hos mennesker med symptomer som diaré, magekrampe, kvalme og oppkast, og gi problemer med søtkoagulering (i.e. koagulering av melk uten lav pH (23)) av konsummelkprodukter. *B. cereus* danner hydrofobe sporer som gjør at de lett adherer til overflater og er vanskelig å fjerne, (7) artens evne til å danne biofilm på rustfritt stål kan forårsake langvarig kontaminering på et meieranlegg eller selve gården. (16) *B. cereus* er en bakterie kyr vil kunne komme lett i kontakt med når de står på beite, og fordi de aerobe sporene utgjør et problem hovedsakelig om sommeren regnes de som sommersporer. (7)



Figur 6: Ulike typer sporer, og hvor de er lokalisert i bakteriecellen. Figur laget ut ifra figur på <https://microbeonline.com/endospore-staining-principle-procedure-results/>. Viser sporulering og hvor i bakteriecella denne foregår. Det som ligner en ring viser til en spore. *B. cereus* har terminale eller sentrale sporer

1.5.4 Anaerobe sporedannere og hvilke problemer disse forårsaker i meieriindustrien

Clostridium-slekten danner mesteparten av de anaerobe sporene som kan finnes i melk. (5) Slekten består av 200 arter hvor de fleste er ufarlige, men noen kan gi sykdom. Femten av clostridieartene som kan knyttes til sykdom hos dyr eller mennesker regnes som betydelige patogener på grunn av sin toksinproduksjon. (7) De fleste *Clostridium*-arter er obligat anaerobe (16) som betyr at de dør etter for lang tid i aerobe forhold da de ikke klarer å uskadeliggjøre oksygen (*Tabell 7*). Clostridier finnes naturlig i tarm, jord og surfôr, det er derfor naturlig å tenke at anaerobe sporer er vintersporer da mesteparten opptrer i surfôr som kyrne får i vintersesongen når de står i fjøs. (16) Dårlig smak, hullsetting og sprekkdannelse er noen konsekvenser av anaerobe sporedannere i osteproduksjonen (*Tabell 6*). (5) I forbindelse med melk og meieriprodukter er det hovedsakelig tre arter det fokuseres på; *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum* og *Clostridium tyrobutyricum*. (13)(7)

Tabell 6: Viser en oversikt over anaerobe sporedannere med betydning i meieriindustrien med latinsk navn, sykdom arten kan forårsake og hvilke meieriprodukter som ødelegges ved høyt innhold av bakterien (5)(7)(13)

Bakterie	Sykdom den forårsaker	Meieriprodukter som ødelegges
<i>C. perfringens</i>	Matforgiftning	Biola
<i>C. tyrobutyricum</i>	Vanligvis apatogen	Dårlig smak, hullsetting og sprekkdannelse i faste oster som Gouda og Jarlsberg
<i>C. butyricum</i>	Vanligvis apatogen	Dårlig smak og lukt i konsummelk

C. perfringens er en ubevegelig gram positiv stav som danner terminale sporer (*Figur 6*) og produserer opptil 15 ulike toksiner. Bakterien kan påvises i surfôr og finnes i alle typer jord. *C. perfringens* klassifiseres ut ifra hvilke hovedtoksiner arten produserer, noen av toksinene gir tarminfeksjon, andre kan gi gassgangren (i.e. vevsnekrose). (7) Matforgiftning med *C. perfringens* vil kunne gi symptomer på gastroenteritt (i.e. betennelse i fordøyelseskanalen) 8 til 22 timer etter å ha fått i seg kontaminert mat; vandig diare og sterke magesmerter er vanlige symptomer. (24) Et annet problem med bakteriearten i meieriindustrien er at noen stammer av *C. perfringens* har en desimal reduksjonsverdi på 11 dager ved 4°C (kjøleskapstemperatur), som betyr at man har oppnådd en 9% reduksjon av levende bakterieceller. (16) Dette innebærer at noen stammer av *C. perfringens* kan overleve lenge selv i kjøleskapstemperatur.

C. butyricum finnes normalt i tarm hos mennesker og dyr, men vil kunne ødelegge melkeprodukter på grunn av sin evne til å bryte ned proteiner og aminosyrer under produksjon av smørtsyre og proteinderivater. Smørtsyre er et produkt av metabolismen hvor laktose eller laktat (i.e. melkesyre) er substratet. (7) Smørtsyrebakterier slik som *C. butyricum* og *C. tyrobutyricum* assosieres med ødeleggelse av faste oster som Jarlsberg, som skjer ved gassdannelse (H₂) når bakterien gjennom sin metabolisme fermenterer laktat/laktose til acetat, butyrat (i.e. smørtsyre) og hydrogengass. Sporer fra disse artene knyttes ofte opp mot dårlig surfôr med høyt innhold av sporer. (16) *C. tyrobutyricum* dominerer i både surfôr og melk, og er den viktigste anaerobe sporedanneren. (7) Arten er vanligvis apatogen og tåler lav pH. *C. tyrobutyricum* ligner *C. butyricum*, og er også en smørtsyrebakterie (i.e. fermenterer laktat/laktose, såkalt smørtsyregjæring). (7) *C. perfringens* er også en smørtsyrebakterie da den produserer butyrat, (25) men nevnes sjelden i forbindelse med ødeleggelse av faste oster.

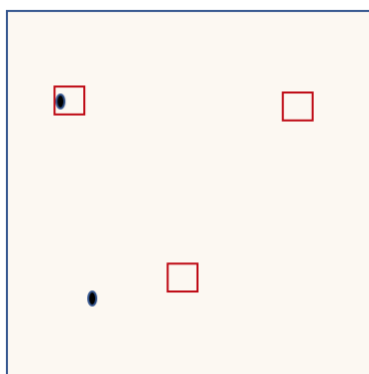
De to artene *C. butyricum* og *C. tyrobutyricum* ligner mye på hverandre, men skilles på bakgrunn av at førstnevnte fermenterer laktose, mens sistnevnte fermenterer laktat. *C. tyrobutyricum* er den eneste av de to som kan ødelegge osteproduksjonen fordi laktose omgjøres til laktat i ost etter et par døgn, men arten vokser ikke i melk slik som *C. butyricum* fordi den ikke forgjærer laktose. Ost ødelegges grunnet CO₂ og H₂ i smørtsyregjæringen man finner hos disse artene ved å gi ettergjæring og forandring i lukt/smak. Kun sporer vil overleve pasteurisering, mens de vegetative cellene blir drept. Når sporene germinerer vil de kunne sprengte osten i stykker grunnet H₂ dannelse. (26) Clostridier krever ofte flere ulike nærings-germinanter for å kunne germinere, og det er viktig å merke seg at de kun kan germinere under anaerobe forhold fordi de er obligat anaerobe bakterier. (21) (22)

Tabell 7: vekstbetingelser for anaerobe sporedannende bakterier som er viktige i meieriindustrien fordi de kan gi sykdom og eller ødelegge meieriprodukter. Tabellen er hentet fra «Utfordringer for mjølke kvalitet, fôrkvalitet og dyrehelse». Strekene i tabellen (-) indikerer manglende informasjon.

Art	Veksthastighet	O ₂	Temperatur	pH	Gassproduksjon
<i>C. perfringens</i>	Vokser raskt	Aerotolerant	15-50 °C	5,5-8,0	-
<i>C. tyrobutyricum</i>	-	-	12-43 °C	5,0-7,5	H ₂
<i>C. butyricum</i>	-	-	10-37 °C	4,2-7,0	H ₂

1.5.5 Most Probable Number (MPN)-metode for bestemmelse av mengde anaerobe sporer i rå melk

Den kvantitative (7), statistiske metoden MPN benyttes for å estimere antall bakterier. For å kunne bruke metoden kreves en prøve der bakteriepopulasjonene er tilfeldig fordelt ([Figur 7](#)), hvor flere paralleller gir bedre presisjon. I metoden fortynnes prøven til det ikke er noen levedyktige bakterier igjen, deretter vil paralleller av flere fortynninger inkuberes på et passende medium avhengig av type bakterie som skal påvises. (27) En fargeendring eller gassdannelse i parallellene viser til tilstedeværelse av bakterier (28), og gir et estimat på antall bakterier i prøven (dermed kan også antall sporer bestemmes, siden én spore svarer til én bakterie). Ved bestemmelse av bakterietallet benyttes en tabell laget for metoden som inneholder konfidensintervallet i tillegg til estimatet av antall. MPN-metoden er vanlig for å vurdere mengde mikroorganismer i mat og vann, da metoden kan si noe om kontaminering med blant annet koliforme bakterier. (27) Det finnes flere måter å benytte seg av MPN-metoden; 3-rørs (TINE), 9-rørs (TINE/Eurofins) og 12-rørs (Arla Foods) er de vanligst forekommende. (7)



Figur 7: Det store kvadratet indikerer en bestemt mengde melk. Hvert av de små kvadratene indikerer alikvoter som tas ut til analyse. De sorte prikkene er sporer/bakterier som er tilfeldig plassert i melka. Kan se at antall paralleller som tas ut kan øke sikkerheten til analysen.

Ved bruk av MPN-metoden til vurdering av mengde anaerobe sporer vil melkeprøven fordeles på flere paralleller i reagensrør, og hvert rør vurderes som positivt eller negativt for vekst. Det benyttes et vekstmedium som favoriserer clostridier. For å skape et anaerobt miljø og kunne lese av resultat benyttes parafinpropper som tetter rørene, og som ved positivt resultat presses opp grunnet gass produsert i metabolismen hos anaerobe sporedannere. Prøvene varmebehandles før inkubasjon for å inaktivere vegetative bakterier, og gjøre parafinen flytende slik at det skapes et anaerobt miljø. Variasjoner ved bruk av MPN-metoden til anaerobe sporedannere i rå melk er oftest knyttet til antall rør og fortynninger. (7)

1.5.6 Bruk av Polymerase Chain Reaction (PCR) til deteksjon av sporer

PCR kan brukes til identifikasjon og kvantitering av blant annet bakteriesporer. Metoden krever DNA eller RNA, som vil bli amplifisert gjennom reaksjonen ved innhold av bestemte basesekvenser. Ved bruk av primere (i.e. bestemte sekvenser av DNA), DNA polymerase som kopierer DNA og nukleotider (i.e. byggesteiner) vil man kopiere DNA-et i prøven. Dette gjøres gjennom bestemte temperatursykluser, DNA-et kan etterpå detekteres med andre metoder slik som bruk av gelelektroforese. Ved bruk av Real time PCR vil man kunne kvantifisere disse DNA-sekvensene for å kunne si noe om antall bakterier, eller her; sporer. Hos sporer er ikke DNA tilgjengelig uten å ødelegge sporeveggen, men det finnes flere ulike måter å gjøre dette på. (7)

1.6 Råmelkslaboratoriet og andre laboratorier i TINE

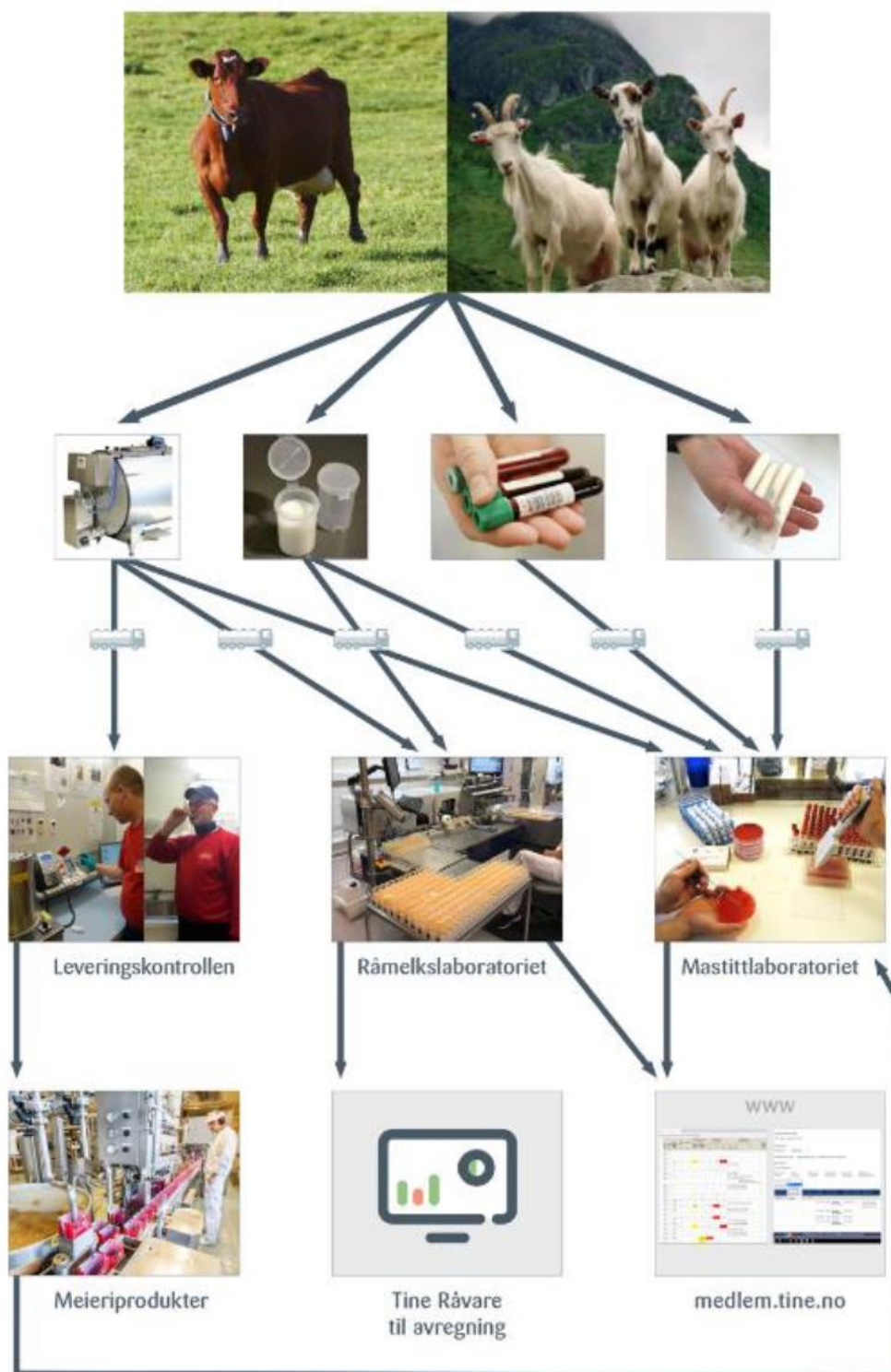
TINE Råvare har oppgaver som inkluderer all håndtering av melk fra gårdstank til meieri, kvalitetskontroll som skjer ved laboratoriene og betaling for melk. Råmelkslaboratoriet har fått sin oppgave fra TINE Råvare, og resultatene som produseres her går rett ut til melkeprodusenter for å brukes som grunnlag for melkeprisen. «Hovedoppgaven til Råmelkslaboratoriet er å dokumentere kvaliteten på råvaren til alle TINE-produkter og gi bonden svar på gårdens melkekvalitet slik at hen kan optimalisere drifta si». (29) Det er mange kvalitetskontroller ([Tabell 2](#)) fra kua til melken står i butikk, disse innebærer tankbilsjåfører med ansvar for lukt/temperatur, visuell vurdering, analysering av bakterietall og antibiotikatester på meieriene før melka pumpes inn i anlegget. Det er et driftslaboratorium på hvert meieranlegg. Det sendes også inn prøver av kyr og geiter til Mastittlaboratoriet i Molde, et akkreditert veterinært diagnoselaboratorium, hvor de utfører flere mikrobiologiske undersøkelser av dyr, TINE-produkter og miljøprøver. (30) [Figur 8](#) viser en oversikt over laboratoriene.

Råmelkslaboratoriet i Trondheim er det eneste av sitt slag i TINE, og har ansvar for å analysere rå melk fra alle melkeprodusenter i hele Norge. Laboratoriet benytter Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) for analysering av kjemisk innhold, flowcytometri til celletall/bakterier, og det dyrkes sporedannende bakterier etter aktivering. (31) Det analyseres tre typer melkeprøver ved Råmelkslaboratoriet; leverandør-, lass- og husdyrprøver ([Tabell 8](#)). Resultatene brukes for oppfølging av drift og som grunnlag for rådgivning/avl i tillegg til avregning på melka. (30) På Råmelkslaboratoriet ble det i 2018 analysert 1,8 millioner prøver på kjemisk analyse (1,32 mill. av disse var husdyrprøver), over 400 000 på bakteriologisk analyse og 87 000 anaerobe + 34 000 aerobe sporeanalyser. (30) Det går omtrent 10.000 melkeprøver gjennom laboratoriet for analyse på en vanlig dag. (31)

Tabell 8: En oversikt over de ulike type melkeprøvene som analyseres ved Råmelkslaboratoriet, og hva resultatene benyttes til

Leverandørprøver	Lassprøver	Husdyrprøver
Brukes til avregning av melk (sjekker kvalitetsparametere). Kommer fra hver enkelt gård (leverandør).	Lassprøvene tas ved at melk fra hvert skott (avdeling) i tankbilen samles i like store mengder. Benyttes til lukt og smak, og antibiotikatester. Sier derfor noe om hver enkelt rute. (32)	Kommer fra hver enkelt ku, og kan si noe om helsetilstand og foring. Konserverte prøver tilsatt bronopol som kun analyseres kjemisk. Brukes ikke til avregning.

Laboratoriene



Figur 8: Oversikt over melkens reise til de ulike laboratoriene. Hentet fra PP av Linda Helander (30). Viser at både ku- og geitemelk hentes av tankbiler og at det tas ut prøver som går til meierier og Råmelkslaboratoriet. Ender opp som meieriprodukter og som underlag for avregning av melka. Ser også at melka, blodprøver og mastittprøver sendes inn til mastittlaboratoriet. Resultatet fra undersøkelser vil legges ut, tilgjengelig for melkebonden.

1.7 Problemstilling for oppgaven

Formålet med oppgaven er å finne ut hvilken påvirkning tid og temperatur har på anaerobe sporer i rå melk. Det skal undersøkes hvordan mengde anaerobe sporer påvirkes ved 4°C, 8°C, romtemperatur (20-22°C), 40°C og 50°C ved bruk av en forenklet MPN-metode ([Kapittel 2.2](#)) ved bestemte tidspunkt når melkeprøver skal sås ut ([Tabell 11](#)). Resultatene fra denne oppgaven vil være nyttige for å bestemme holdbarhet av prøver for anaerob sporeanalyse, de vil også kunne si noe om bruk av PCR etter at melka har gjennomgått høye temperaturer. Forsøkene vil kunne gi bakgrunn for implementering av nye rutiner ved laboratoriet for å unngå preanalytiske feilkilder knyttet til oppbevaring av melkeprøver.

Problemstillingen for forsøket er hvordan tid og temperatur påvirker anaerobe sporer i rå melk, og eventuelt i hvilken grad?

2. Materialer og metode

2.1 Utstyr brukt i laboratoriepraksis

Til denne oppgaven ble det laget en egen stasjon på Råmelkslaboratoriet. Dette var for å sørge for nødvendig tilgang til alt av utstyr, samtidig unngå å være i veien for vanlig drift på laboratoriet. Når det ble beregnet mengde utstyr ble alle tall rundet opp for å sikre at ingen ting skulle gå tomt. For hele prosjektet var det utstyr i [Tabell 9](#) som var nødvendig for å utføre en forenklet MPN-metode for deteksjon av anaerobe sporer i rå melk.

Tabell 9: Utstyr som kreves for å gjennomføre forsøket. Innebærer metoder for å få fram ønsket temperatur.

Metallskinner med plass til 30 rør
Glassrør med parafinvoks
Rå melk (5 L)
Buljong (modifisert RCM = MRCM)
Pipetter (100-1000 μ L, 500-5000 μ L)
Reoler for skinner
Vannbad som kan holde 40°C og 50°C
Inkubasjonsrom 37°C
Vannbad som kan holde 82°C
Kjøleskap 8°C
Kjølerom 0-4°C

Buljong til anaerob sporeanalyse ble levert ferdig til Råmelkslaboratoriet. Innholdet i buljongen er nøytralrødt (C₁₅H₁₇CIN₄) og reinforced clostridial medium (RCM). Innholdet i RCM er kjøttekstrakt, peptoner (i.e. protein som er delvis hydrolysert (33)), gjærekstrakt, glukose, stivelse, natriumklorid, natriumacetat, L-cysteiniumklorid og agar-agar (i.e. gelatinsubstitusjon (34)). RCM prepareres ved å løse 38,0 g tørrstoff i 1L i kokende, rensset vann og som røres til alt er løst opp, før det autoklaveres (i.e. sterilisere vha høy temperatur og trykk (35)) på 121°C i 15 minutter. pH i RCM er 6,8 +/- 0,2 ved 25°C (romtemperatur). Modifisert RCM (MRCM) er ferdig buljong hvor RCM er tilsatt nøytralrødt, og har en pH på 5,9 ([Tabell 10](#)). (36) (37)

Tabell 10: viser innholdet i buljong til anaerob sporeanalyse (MRCM), med medium til clostridiene (RCM) og nøytralrødt som er en redoksindikator (36)

Buljong til anaerob sporeanalyse (MRCM)	
RCM (reinforced clostridial medium);	Nøytralrødt (C ₁₅ H ₁₇ CIN ₄)
- Kjøtttekstrakt	
- Peptoner	
- Gjærekstrakt	
- Glukose	
- Stivelse	
- Natriumklorid	
- Natriumacetat	
- L-cysteiniumklorid	
- Agar-agar	

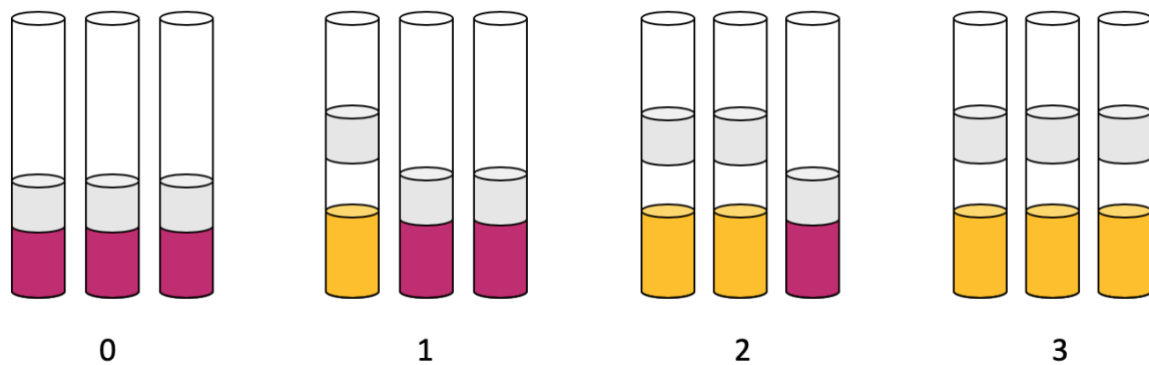
Til forsøket ble det benyttet 5L rå (upasteurisert) melk fra en tankbil hvor lassprøvene den siste tiden hadde oppnådd 0-1 på anaerobt sporeresultat. Pasteurisering vil ikke påvirke sporemengden i rå melk, fordi sporer er svært motstandsdyktige.

2.2 Forenklet MPN-metode for bestemmelse av mengde anaerobe sporer i rå melk ved Råmelkslaboratoriet

For å skille prøver med lavt og høyt sporenivå benytter Råmelkslaboratoriet seg av en 3-rørs MPN-metode. Metoden gir tilfredsstillende presisjon, og man sparer kostnader/arbeid ved å ikke ha så mange paralleller. Hvert rør fylles med lik mengde upasteurisert (rå) melk, og resultatet angis som lavt innhold (gassutvikling i 0 eller 1 rør) eller høyt innhold (gassutvikling i 3 rør) ([Figur 9](#)). Lavt innhold indikerer svak vekst (få sporer), høyt innhold svarer til rikelig vekst. (7) Rørene fylles med MRCM buljong som består av en redoksindikator (nøytralrødt) som skiller ut syredannende clostridier ved fargeomslag til gul (7), og RCM, et medium som favoriserer clostridier. (36) Ingen gassutvikling regnes som negativ uansett om man har fargeomslag. Metoden benyttes på lass- og leverandørprøver, og gir grunnlag for betaling. Som sagt i Bioforsk sin rapport om sporedannende bakterier er 3-rørsmetoden «utvikla av Svensk Mjølkk». (7)

Avlesning av antall rør med løftet parafinpropp og fargeomslag (*Figur 9*) (38):

- 0 = ingen vekst
- 1 = lav vekst
- 2 = middels vekst
- 3 = høy vekst



Figur 9: avlesning av anaerobe sporer utført med forenklet MPN-metode. Viser reagensrør med buljong med redoksindikator som blir gul ved syreproduksjon. I tillegg ser man parafinproppen som har forflyttet seg grunnet gassdannelse. Tallene er antall positive rør.

2.3 Fremgangsmåte for forsøkene

Det skulle testes hvilken effekt temperaturene; 4°C, 8°C, romtemperatur, 40 °C og 50°C hadde på anaerob sporedannelse i rå melk fordi det mangler dokumentert kontroll på hvor lenge prøvene oppbevares ved de ulike temperaturene utenfor kjølerom (0-4°C) ved Råmelkslaboratoriet. Det ble benyttet en forenklet MPN-metode; 3-rørsmetoden, som er en del av daglig drift i forbindelse med vurdering av anaerob sporemengde i melkeprøver. Prøvene skulle sås ut ved bestemte tidsintervaller, og på bestemte dager (*Tabell 11*). *Figur 10* viser en mer detaljert oversikt for når de ulike prøvene skulle analyseres. Det ble planlagt å utføre forsøket 3 ganger for å sikre at resultatene var representative. Ikke alle temperaturer ble analysert for anaerobe sporer alle dager, dette skyldtes interessen i effekten 4°C har på anaerob sporemengde i rå melk, da dette hovedsakelig er temperaturen prøvene blir utsatt for. Temperaturer hvor man forventet forandring i sporemengden hadde hyppigere avlesning slik som f.eks. romtemperatur.

Tabell 11: Oversikt over temperaturer, avlesninger og tidsbruk for forsøket. I tillegg sier dag noe om når i uka de ulike temperaturene/tidene hvor melkeprøvene skal sås ut.

Temperatur	4°C	8°C	Romtemperatur	40°C	50°C
Antall avlesninger	2x pr døgn	Hver time	2x pr time	Hvert 15. min	Hvert 15. min
Tidsbruk	1 uke	2 døgn	1 døgn	2 timer	2 timer
Dag	1 til 7	1 og 2	3	4	4

4°C er den høyeste temperaturen melken oppbevares på i gårdstank (5). Melk og leverandørprøver holdes også kjølig under transport på tankbil, og settes direkte på kjølerom som holder 0-4°C når de ankommer laboratoriet. Kjølig oppbevaring av melkeprøver skyldes innholdet av levende bakterier da melka er upasteurisert, det er uønsket at bakterietallet endres etter henting fra gårdstank da det er en av kvalitetsparameterne som avgjør melkepris og -kvalitet. I dette forsøket ønsker man å finne ut om mengden anaerobe sporer i den rå melka påvirkes positivt eller negativt av 4°C. Kravet for at melk som sendes inn til Råmelkslaboratoriet skal få sporeanalyse er at temperaturen ikke overstiger 8°C. Ved å teste hvordan sporer påvirkes av 8°C, kan man få en indikasjon på om dette kravet er for høyt eller ikke.

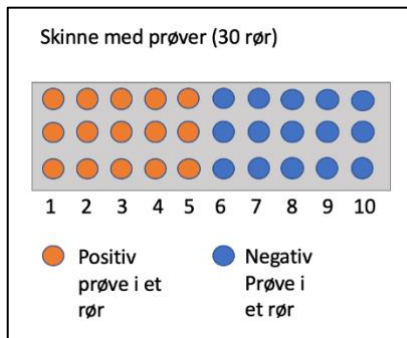
Melkeprøver utsettes for romtemperatur når de tas ut fra kjølerom for å registreres for analyser. Prøvene står også i romtemperatur en stund før de settes på instrument for bakterietall-analyser (Bactocount). Bactocount har ingen kjøling for prøvene, slik at de vil oppbevares i romtemperatur under analysering. Ferdig analyserte prøver for bakterietall står i romtemperatur til resultatene på prøver og kvalitetskontroller er godkjent, deretter settes de på kjølerom eller i kammer med kjøling på sporeinstrumentet hvor melk pipetteres i rør til forenklet MPN-metode. 40°C og 50°C skal undersøkes fordi dette er temperaturen på de to oppvarmingskamrene (kamre hvor prøvene varmes opp for analysering) før kjemisk analyse. Skal finne ut om 40°C og 50°C påvirker sporene i nevneverdig grad, da det kan bli aktuelt å bruke PCR etter kjemisk analyse for å bestemme antall sporer. Eventuelt vil det kunne si om PCR bør utføres før kjemisk-analyser, metoden vil da erstatte dagens MPN-metode for deteksjon av anaerobe sporer.

DAG 1 - 4°C	DAG 2 - 4°C	DAG 3 - 4°C	DAG 4 - 4°C	DAG 5 - 4°C	DAG 6 - 4°C	DAG 7 - 4°C
07.30	07.30	07.30	07.30	07.30	07.30	07.30
19.30	19.30	19.30	19.30	19.30	19.30	19.30
DAG 1 - 8°C	DAG 2 - 8°C	DAG 3 - Romtemp.	DAG 4 - 40°C			
08.00	08.00	07.45	08.00			
09.00	09.00	08.15	08.15			
10.00	10.00	08.45	08.30			
11.00	11.00	09.15	08.45			
12.00	12.00	09.45	09.00			
13.00	13.00	10.15	09.15			
14.00	14.00	10.45	09.30			
15.00	15.00	11.15	09.45			
16.00	16.00	11.45	10.00			
17.00	17.00	12.15	DAG 4 - 50°C			
18.00	18.00	12.45	12.00			
19.00	19.00	13.15	12.15			
20.00	20.00	13.45	12.30			
		13.15	12.45			
		13.45	13.00			
		14.15	13.15			
		14.45	13.30			
		15.15	13.45			
		15.45	14.00			
		16.15				
		16.45				
		17.15				
		17.45				
		18.15				
		18.45				
		19.15				
		19.45				

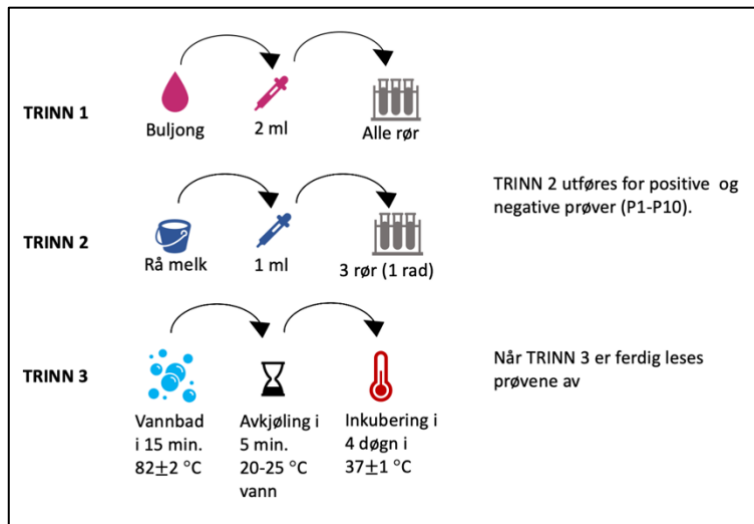
Figur 10: viser en detaljert oversikt over når melkeprøver oppbevart ved de ulike temperaturene skulle leses av (dag og tidspunkt). Hver farge viser til en temperatur, slik at f.eks. alle ruter med grønn vil være de ulike klokkeslettene ved 4°C.

Det ble benyttet en metallskinne med plass til tretti rør, på forhånd fylt med parafin-inneholdende glassrør. Først ble det tilsatt buljong (2mL) oppi hvert rør. Deretter ble det pipettert fem rader med tre paralleller hver av positiv prøve (1000µL i hvert rør), og fem rader av negativ prøve (1000µL i hvert rør) (Figur 11), hvor det ble byttet pipettespiss mellom hver prøve. Melk ble hentet ut fra beger (P1-P10) oppbevart ved de ulike temperaturene. Prosessen (Figur 12) ga tilsammen en metallskinne hvor alle tretti rør var fylt med melkeprøver og buljong, deretter ble toppen av rørene dekket med et flak av aluminiumsfolie. Skinnen med rør ble plassert i et 82°C vannbad i 15 minutter, deretter satt til avkjøling i romtemperert vann i 5 minutter og tilslutt satt til inkubasjon i 37°C i 4 døgn. Etter at inkubasjonstiden var ferdig ble skinnen lest av (Figur 9).

Som negativ kontroll ble det benyttet en blankprøve (vannprøve) med tre paralleller for hver temperatur som ble analysert hver dag. Blankprøvene ble behandlet på lik måte som melkeprøvene. På dag 1 ble det f.eks. benyttet 2 blankprøver for hver av temperaturene som skulle testes denne dagen; 4°C og 8°C. Blankprøvene fungerte som en kontroll på buljongen, og at laboratorieutstyr som pipetter ikke var forurenset med anaerobe sporer.



Figur 11: Denne figuren viser hvordan en skinne med prøver i ser ut ovenfra. Viser hvor de positive og negative prøvene er plassert i forhold til hverandre. P1 ble pipettert i rad 1, P2 i rad 2 osv.



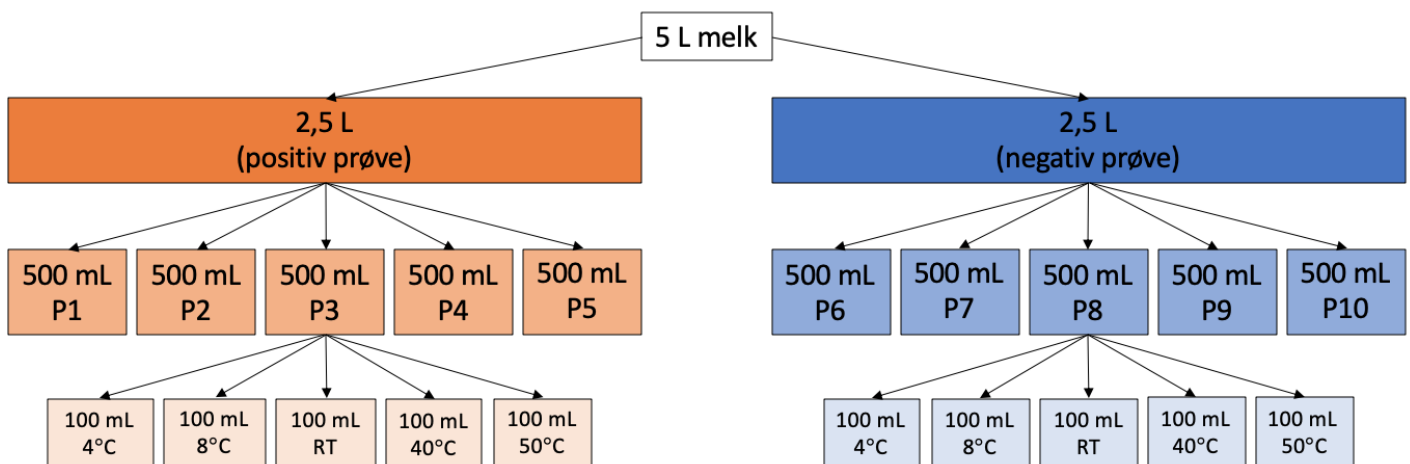
Figur 12: Viser fremgangsmåte for utsåing av anaerobe sporer fra rå melk vha modifisert MPN-metode. Tre trinn kreves fra rå melk til man kan lese av prøvene for mengde anaerobe sporer.

2.4 Tillaging av melkeprøver

For å lage de ulike melkeprøvene ble melken som ble levert (5 L) fordelt på to beholdere; 2,5 L ble benyttet til å lage positiv prøve, resten til negativ prøve (*Figur 13*). I praksis ble prøvene fordelt direkte på 500 mL beger fra totalvolumet på 5L ved bruk av et toliters målebeger. I uke 3 ble målebegeret skylt med Virkon og destillert vann for å unngå eventuell kontaminering. For å lage en positiv prøve ble hver 500 mL flaske (P1-P5) tilsatt ulik mengde anaerob sporekultur (*kap. 2.6*), før melken ble fordelt på 5 beger med 100 mL som skulle benyttes til de ulike temperaturene. Den negative prøven ble fordelt på samme måte som den positive, men ble ikke tilsatt anaerob sporekultur (*Tabell 12*). Fordeling av melken skjedde om ettermiddagen dagen før forsøket skulle starte. Alle melkeprøver ble oppbevart ved 4°C fram til dagen de skulle testes for andre temperaturer, dette skyldtes at man forventet at sporerresultatene ble upåvirket når prøvene ble oppbevart ved kjøleskapstemperatur.

Tabell 12: oversikt over hvor stor mengde sporekultur som ble tilsatt i hver av de positive prøvene (500 mL melk i hver prøve). Volum på dråpen varierte ved de ulike forsøkene.

Prøve	P1	P2	P3	P4	P5	P6 - P10
Mengde anaerob sporekultur	1 dråpe	3 dråper	9 dråper	15 dråper	20 dråper	-



Figur 13: Viser hvordan 5 L rå (upasteurisert) tankmelk ble fordelt på positiv og negativ prøve, som videre ble delt i fem beholdere og deretter tilsatt en bestemt mengde sporekultur (positive prøver) eller ikke tilsatt sporekultur (negative prøver). Hver prøve (P1-P10) ble fordelt på fem beholdere for å kunne sette melka ved de bestemte temperaturene.

2.5 Temperaturkontroll

Det ble på forhånd testet hvor lang tid 100 mL melk trengte for å oppnå riktig temperatur etter å ha blitt oppbevart ved 0-4°C. Ferdig analyserte leverandørprøver var melken som ble benyttet til å teste dette, og funnene ses i [Tabell 13](#). Tiden fortalte hvor lenge prøvene måtte stå for å endre temperatur fra 4°C (kjøleskapstemperatur) til 8°C, romtemperatur, 40°C og 50°C. På bakgrunn av denne testen kunne man samme dag som prøvene skulle analyseres sette de ved bestemte temperaturer i korrekt tid før forsøksstart som var satt til bestemte tidspunkter ([Figur 10](#)). Tidene oppgitt i tabellen var veiledende pga kjøleromstemperaturen ikke var 4°C hele tiden men varierte fra 0-4°C.



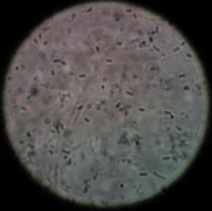

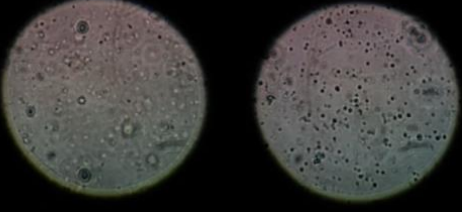
Tabell 13: viser hvor lang tid en 100 mL prøve trengte for å oppnå temperaturene i tabellen etter å ha blitt oppbevart ved 0-4°C. Testet med 10 beger m/100 mL vann eller melk.

Temperatur	Tid for å oppnå riktig temperatur fra 4°C
8°C +/- 1°C	45-60 minutter
20-22°C (romtemperatur) +/- 2°C	2,5 time (20-30 minutter ved bruk av romtemperert vann)
40°C +/- 2°C	15-30 minutter
50°C +/- 2°C	20-40 minutter

2.6 Sporekultur vha positive prøver funnet i daglig drift

Sporekulturen var positive prøver funnet ved MPN-metoden i daglig drift, og det ble benyttet leverandørmelk hvor sporeresultatet var 3 som indikerer et rikelig antall sporer i melka. Prøvene ble satt i 0-4°C (kjølerom). Det ble antatt at det skulle ta en uke før det ble så mange clostridier at forholdene i rørene ble ugunstige og førte til sporulering. Det ble tatt ut en dråpe av et positivt rør nesten hver dag i en uke for å sjekke når sporuleringen skjedde; dråpen ble plassert på et objektglass, fikk dekkglass og deretter ble den mikroskopert ([Tabell 14](#)). I mikroskopet så man stavbakterier som kunne være clostridier eller fakultativt anaerobe baciller, men clostridier har mer uregelmessig form og størrelse enn bacillene. Ofte vil man kunne se sentrale sporer hos baciller, mens det er terminale sporer i clostridier. I mikroskop vil sporene være runde i formen og ha en størrelse som er ¼ av den vegetative cellen, og se «lysende» ut avhengig av hvilken kontrast som benyttes. (39)

Tabell 14: viser hvordan positive prøver utviklet seg over en uke ved 4°C i mikroskop. 1000x forstørrelse. Alle mikroskopibilder er stilt inn ved Ph1 bortsett fra det første (dag 3), på et mikroskop som ble Köhler-innstilt før bruk. Dag angir tid fra avlesning (hvor lenge prøven har stått på kjølerom). Hvert bilde er fra et rør som betyr at de vil ha ulike utgangspunkt i forhold til bakteriemengde (sporer fordeles tilfeldig i en prøve). Bildene er tatt med mobil.

Dag	Funn i mikroskop	Mikroskopibilde
Dag 3	Ser hvite, tykke staver. Her ble det benyttet annen kontrast enn på de andre dagene, derfor er bakteriestavene hvite.	
Dag 4	Her ble kontrasten endret slik at stavene ser sorte ut. Det er tydelig at det er svært mange bakterier her, flere enn ved dag 3.	
Dag 5	Ser stavbakterier, men det er ikke så mange av dem som på dag 4, dette skyldes nok at det er fra et annet rør (annen melkeprøve).	
Dag 6	Det er tydelig at noe har endret seg, ser ikke lenger så mange staver. Ser tydelig en terminal spore i mikroskopet (markert stav med lysere område mot enden av cellen).	
Dag 7	Her vises det veldig godt at clostridiene har sporulert. Sporene ses som «lysende kuler», mindre enn stavene som sett tidligere. Begge bildene er fra samme synsfelt, med ulik avstand fra objektivet.	


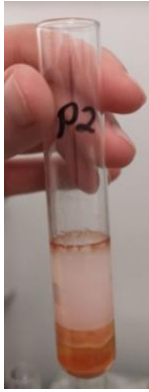
2.7 Artsanalyse av ulike rør fra MPN-metoden vha Matrix Assisted Laser




Desorption/Ionization – Time Of Flight (MALDI-TOF)

Prøver lest av 19.05.20 ble sendt inn til Mastittlaboratoriet i Molde den 20.05.20 for artsanalyse på MALDI-TOF. MALDI-TOF er en metode hvor det dannes ioner ved bruk av en laser, og disse analyseres ved å bruke massespektroskopi. (40) Prøvene hadde blitt sådd ut den 15.05.20 og analysert ved bruk av en 3-rørs MPN-metode. De ble oppbevart en ekstra dag ved inkubasjon (37°C) før innsending til Molde da de krever levende kultur for analyse.

Tabell 15 viser resultater fra artsanalysen, og inkluderer en beskrivelse av hvilke prøver som ble plukket ut til innsending, i tillegg til bilder av rørene og analyseresultatet.

Tabell 15: viser prøver som ble sendt inn til Mastittlaboratoriet i Molde for artsanalyse ved bruk av MALDI-TOF. I tabellen ligger det også ved bilder som viser hvordan prøvene så ut, og informasjon om når de ble sådd ut og lest av.

ID	Avlesning	Utseende	Analyseresultat
P1	Prøve sådd ut fra 8°C klokka 15.15 den 15/5. Avlest som positiv		<i>Clostridium sporogenes</i>
P2	Prøve sådd ut fra 8°C klokka 15.15 den 15/5. Avlest som negativ		<i>Clostridium sporogenes</i>

<p>P3</p>	<p>Prøve sådd ut fra 8°C klokka 19.15 den 15/5.</p> <p>Avlest som negativ</p>		<p><i>Clostridium sporogenes</i></p>
<p>P4</p>	<p>Prøve sådd ut fra 4°C klokka 20.30 den 15/5 (blankprøve).</p> <p>Avlest som negativ</p>		<p><i>Bacillus licheniformis</i></p>
<p>P5</p>	<p>Prøve sådd ut fra 4°C klokka 20.30 den 15/5.</p> <p>Avlest som negativ</p>		<p><i>Clostridium tyrobutyricum</i></p>

3. Resultater

For å finne ut hvilken påvirkning tid og temperatur (4°C, 8°C, romtemperatur, 40 °C og 50°C) har på anaerob sporedannelse i rå melk ble det utført forsøk som ville gi en indikasjon på holdbarheten av denne type analyse ved Råmelkslaboratoriet. Det ble benyttet en forenklet MPN-metode hvor det ble pipettert fem ulike positive prøver; P1-P5 (tankmelk tilsatt ulik mengde sporekultur - [Tabell 12](#)), og fem negative prøver; P6-P10 som var tankmelk uten tilsats av sporekultur. Prøvene ble sådd ut ved tidspunktene vist i [Figur 10](#), og lest av etter fire døgn ([Figur 9](#)).

3.1 Resultater fra Uke 1

Melken ble hentet fra Tunga meieri og fraktet til Råmelkslaboratoriet med buss, dette ga en temperatur ved innkomst til laboratoriet på 8,5°C. Bøtten med melk ble satt direkte på kjølerom som holdt 0-4°C på laboratoriet, og fordelt ved hjelp av et litermål ([Figur 13](#)). Det var ikke levert nok melk (<5L) slik at det ble prioritert å fylle 500 mL i P1-P5 som skulle tilsettes sporekultur, og mindre volum i P6-P10 som var negative prøver uten tilsats av sporekultur. Det ble pipettert direkte fra et sporerør med 3 på anaerobt sporeresultat (sporekultur), og over i tankmelken som var hentet ut og fordelt på flasker. Parafinproppen var presset helt opp i toppen av røret slik at man kunne plukke den ut. Alle melkeprøver (P1-P10) ble oppbevart (0-4°C) fram til dagen de skulle testes, og da ble de satt i andre temperaturer som vist i [Figur 10](#).

Som en kontroll på en eventuell forurensing av utstyr og buljong ble det benyttet vannprøver (blankprøver) som ikke inneholdt sporer, alle blankprøver var negative og indikerer at benyttet laboratorieutstyr ikke var forurenset. Det var ingen betydelige endringer i sporemengde ved noen av temperaturene; 0-1 indikerer lav sporemengde i melken ved temperaturene som ble testet i forsøket. [Figur 14](#) viser resultater fra 4°C ved de ulike tidspunktene, og at det var lite endring i sporemengden for P1-P10, som også gjaldt de andre temperaturene (8°C, romtemperatur, 40°C og 50°C). [Vedlegg 1](#) viser resultater oppnådd alle sju dager på alle temperaturer som ble testet den første uken av prosjektet.

P1-P5 ble tilsatt sporekultur (sporerør med 3 på resultat), og av tabellene i forsøket ([Vedlegg 1](#)) kan det se ut til at dette ikke har fungert grunnet uventet lave sporenivåer. For å kunne vurdere nedgang eller økning i sporeresultat ble nullprøvene vurdert. Nullprøvene er de første

utsåingene for P1-P10 (resultat ved 0 timer), og ved å vurdere nullprøver for P1-P5 ble det konkludert med at sporekulturen ikke hadde fungert. Grunnen til at sporekulturen ikke fungerte denne gangen kan skyldes at clostridiene ikke hadde sporulert ved tilsats da det ble pipettert direkte fra et sporerør (MPN-metode) uten å ha oppbevart det ved 4°C ([kap. 2.6](#)), slik at de kunne dødd på grunn av de aerobe forholdene i melken.

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0										
12										
24										
36										
48										
60										
72										
84										
96										
108										
120										
132										
144										
156										

0	
1	
2	
3	

Figur 14: viser anaerobe sporerresultater for alle prøver P1-P10 når melken ble oppbevart ved 4°C. De ulike fargene indikerer de ulike sporerresultatene som kan oppnås, f.eks. er lyseblå forenlig med 0 på sporeresultat, og rød med 3 (3 positive rør).

3.2 Resultater fra Uke 2

Melken ble hentet i to bøtter fra Tunga meieri og fraktet til Råmelkslaboratoriet, hvor de hadde en temperatur på 4,2°C og 4,3°C ved innkomst. De to bøttene med melk ble blandet i like store mengder ved fordeling; 1L fra hver bøtte i et toliters målebeger. I motsetning til forsøk i uke 1 ble det denne uken benyttet to sporekulturer som hadde stått ved 4°C i over en uke. For å unngå å aktivere germinering av sporene ble rørene knekt, i stedet for å smelte parafinen i vannbad for å få tilgang til væsken. Sporekulturen ble mikroskopert på forhånd for å sikre at den inneholdt sporer ([Tabell 14](#)), og deretter ble det pipettert ulike volum ([Tabell 12](#)) hvor en dråpe svarte til 50 mikroliter. Alle melkeprøver (P1-P10) ble oppbevart på kjølerom (0-4°C) fram til dagen de skulle testes, og de ble da satt i andre temperaturer som angitt i [Figur 10](#).

Det var tydelig at sporekulturen som ble tilsatt i P1-P5 hadde fungert; alle anaerobe sporeresultater på de positive prøvene var 3 bortsett fra én prøve som fikk 2. [Figur 15](#) viser resultatene som ble oppnådd ved 4°C. Mengden anaerobe sporer har holdt seg stabilt høyt i alle positive prøver ved de ulike temperaturene som ble testet i forsøket. Målet med de positive prøvene var å lage ulike sporeresultater; 1-3 i P1-P5, av resultatene ser man at sporeresultatet er høyt (resultat på 3) for alle positive prøver, slik at dette ikke ble oppnådd. [Vedlegg 2](#) viser alle resultater oppnådd i uke 2. Ved å undersøke resultatene på de negative prøvene P6-P10 kunne det se ut som at tankmelken hadde høyt sporeinnhold pga usystematiske endringer. Det ble derfor undersøkt hvilket sporeresultat tankmelken hadde oppnådd ved analyse på Råmelkslaboratoriet. Det var sendt inn to prøver av tankmelken, anaerobt sporeresultat for disse prøvene var 1 og 3, og mest sannsynlig har dette hatt innvirkning på mengde sporer i de positive prøvene (P1-P5) også.

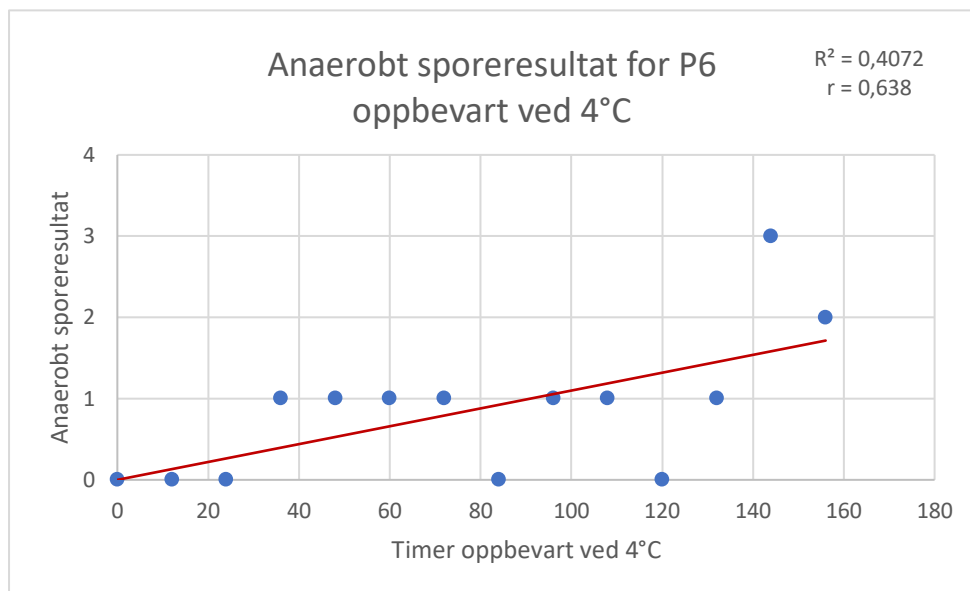
Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
12	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
24	3	3	3	3	3	0	1	0	0	0
36	3	3	3	3	3	1	2	1	0	0
48	3	3	3	3	3	1	1	1	0	0
60	3	3	3	3	3	1	2	1	0	0
72	3	3	3	3	3	1	1	0	0	1
84	3	3	3	3	3	0	0	0	0	1
96	3	3	3	3	3	1	1	0	0	0
108	3	3	3	3	3	1	0	0	0	1
120	3	3	3	3	3	0	3	2	0	0
132	3	3	3	3	3	1	0	0	1	0
144	3	3	3	3	3	3	2	1	1	1
156	3	3	3	3	3	2	1	1	2	1

0	Lyseblå
1	Blå
2	Oransje
3	Rød

Figur 15: viser anaerobe sporeresultater for alle prøver P1-P10 når melken ble oppbevart ved 4°C. De ulike fargene indikerer de ulike sporeresultatene som kan oppnås, f.eks. er lyseblå forenlig med 0 på sporeresultat, og rød med 3 (3 positive rør).

Ved 4°C kunne man se at resultatene på P6-P10 varierte i løpet av forsøktiden, de samme prøvene varierte også i anaerobt sporeresultat ved 8°C og romtemperatur. Et eksempel på variasjonen i anaerobt sporeresultat er vist i [Figur 16](#) som er et punktdiagram for P6

oppbevart ved 4°C i 7 døgn. Punktdiagrammer for de andre prøvene og temperaturene med betydelige endringer i anaerobt sporeresultat er i [vedlegg 7](#), og viser korrelasjonen mellom anaerobt sporeresultat og tid ved de ulike temperaturene. For temperaturene 4°C, 8°C og romtemperatur viste korrelasjonskoeffisienten (r) at det ikke var noen god lineær sammenheng mellom anaerobt sporeresultat og tid oppbevart ved temperaturene. Det var heller ingen betydelig variasjon i resultatet hos P6-P10 ved 40°C og 50°C; 0-1 indikerer lav sporemengde, og de positive prøvene (P1-P5) hadde alle høye sporeresultater som ikke minket ved oppbevaring i de bestemte temperaturene (40°C og 50°C). Alle blankprøver var negative (0 på sporeresultat) som indikerte at det ikke ble benyttet forurenset utstyr i forsøkene.



Figur 16: viser et punktdiagram for P6 oppbevart ved 4°C. Punktene indikerer anaerobt sporeresultat etter ulikt antall timer ved den satte temperaturen. Diagrammet inneholder også en trendlinje og inkluderer R² og r-verdien til trendlinjen.

3.3 Resultater fra Uke 3

Melken ble hentet fra Tunga meieri, og var 5,8°C ved innkomst til Råmelkslaboratoriet. For å prøve å få mindre sporemengde i de positive prøvene, P1-P5, ble tilsatt volum sporekultur endret fra 50 til 30 mikroliter dråper. Det ble fremdeles benyttet to sporekulturer som hadde blitt oppbevart ved 4°C i over en uke, dette skyldtes at tankmelken som ble benyttet til uke 2 av forsøket hadde høyere anaerobt sporeinnhold enn forventet (>0-1). Det ble antatt at ved bruk av tankmelk med lavere sporeresultater (0-1) ville man kunne oppnå variasjoner i anaerobt sporeresultat uten å endre mengden sporekultur betydelig. Sporekulturen ble

mikroskopert på forhånd for å sikre at den inneholdt sporer, og deretter ble det pipetert ulike volum ([Tabell 12](#)). Alle melkeprøver (P1-P10) ble oppbevart på kjølerom (0-4°C) fram til dagen de skulle testes, og de ble da satt i andre temperaturer som angitt i [Figur 10](#).

Denne forsøksrunden ble det benyttet en vannprøve med tilsats av sporer (90 mikroliter), positiv blankprøve, i tillegg til en vannprøve uten tilsats av anaerobe sporer. Den positive blankprøven fungerte som en kontroll på tankmelken som feilkilde, da vannet er sporefritt og dermed viste resultatet for den tilsatte mengden sporekultur. Flasken med positiv blankprøve ble oppbevart ved 0-4°C under forsøks tiden, og var kun i romtemperatur rett før - og etter utsåing av blankprøvene. De positive prøvene P2-P5 viste ingen betydelige endringer i anaerobt sporeresultat ved noen av temperaturene, resultater for 4°C vises i [Figur 17](#). P2-P5 hadde 3 på sporeresultat ved alle temperaturer. P1 var den eneste av de positive prøvene som endret sporeresultat mellom 2-3 gjennom forsøkene. Endringen i sporeresultat for P1 var tydelig da nullprøven (første utsåing) var 3. De negative prøvene P6-P10 viste ingen betydelige endringer i mengden anaerobe sporer ved noen temperaturer. [Vedlegg 6](#) viser heatmaps for resten av temperaturene som ble undersøkt.

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
12	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
24	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
36	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
48	2	3	3	3	3	1	0	0	0	0
60	2	3	3	3	3	0	0	1	0	0
72	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
84	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
96	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
108	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
120	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
132	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
144	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
156	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0

0	Lyseblå
1	Blå
2	Oransje
3	Rød

Figur 17: viser anaerobe sporeresultater for alle prøver P1-P10 når melken ble oppbevart ved 4°C. De ulike fargene indikerer de ulike sporeresultatene som kan oppnås, f.eks. er lyseblå forenlig med 0 på sporeresultat, og rød med 3 (3 positive rør).

Tankmelken som ble benyttet denne uken ser ikke ut til å ha påvirket de positive prøvene (P1-P5) med tanke på kamuflering av en eventuell endring av sporerresultat. Feilkilden i dette forsøket er derfor trolig for høy konsentrasjon av tilsatt sporekultur som ga resultater på 3. Det hadde vært ønskelig med et sporerresultat som varierte mellom de positive prøvene. Et middels innhold av sporer (2 på resultat) ville lettere kunne vist endringer i sporerresultat ved påvirkning av tid og temperatur. Alle positive blankprøver fikk et sporerresultat på 2-3 bortsett fra prøven på dag 3 (4°C) som fikk 0 på sporerresultat. Fordi alle andre positive blankprøver hadde høyt sporerresultat, også i etterkant av dag 3, kan man anta at det ble glemt å pipettere prøve i disse rørene eller at man ikke fikk med noen sporer. Alle de negative blankprøvene fikk 0 på resultat for alle temperaturer, som indikerer at det ikke var noen forurensing fra buljongen og laboratoriestyret som ble benyttet.

4. Diskusjon

Clostridier er en bakterieslekt som ikke klarer å vokse i melk fordi melken lagres ved lav temperatur (0-4°C), og inneholder for mye oksygen i tillegg til andre bakterier. Clostridiene vil ikke formere seg ved de aerobe forholdene i melken, men det er vanskelig å si om sporer kan germinere og dermed bli vegetative celler. Som skrevet tidligere krever clostridier spesifikke germinanter for å kunne germinere. Enkelte clostridiearter krever organiske syrer slik som acetat eller butyrat for å kunne germinere, og disse vil kunne oppstå først etter at andre bakterier har vært tilstede. I forsøkene utført i forbindelse med bacheloroppgaven var melken upasteurisert slik at ved høyt bakterieinnhold kan det tenkes at det etter hvert ble dannet mer anaerobe forhold i melken (41) ved at andre bakterier forbrukte oksygeninnholdet. Clostridiesporer krever anaerobe forhold for å germinere (22) og det ble forventet at den anaerobe sporemengden i rå melk ikke ville påvirkes av temperaturendringer fordi melken inneholder mye oksygen. For å kvalitetssikre rutinene ved Råmelkslaboratoriet måtte påvirkningen av tid og temperatur på clostridiesporer kontrolleres fordi det finnes lite litteratur omkring dette.

4.1 Bruk av 3-rørs MPN-metode og vurdering av egnethet

Det er 95% sannsynlighet for et sporeresultat på 3 ved sporeinnhold på 4,1 sporer/mL melk (4100/L) ved forenklet MPN-metode. (7) Sannsynligheten er 25% for å få 3 på sporeresultat ved middels sporeinnhold (2 i sporeresultat). Det er 5% sannsynlighet for 3 på sporeresultat på en prøve med lavt sporeinnhold (0-1 på resultat). Grunnet analysefrekvens og rutiner knyttet til oppfølging, er det liten sannsynlighet for å bli feilaktig trukket i pris grunnet anaerobt sporeinnhold (0,0006%). (7) Selv om det er liten sannsynlighet for feilbetaling, er det en større sannsynlighet for at resultatet produsert på Råmelkslaboratoriet ikke speiler sporeinnholdet i melken. Feil i resultat kan skyldes at sporer er tilfeldig fordelt og ikke nødvendigvis påvises med den forenklete MPN-metoden. Flere paralleller vil føre til økte kostnader, og ha lite å si for sikkerheten til anaerobe sporeresultat. I alt er den forenklete MPN-metoden egnet til sin bruk i kvalitetssikringen av melk da den gir liten sannsynlighet for feilaktig trekk, og man sparer tid og kostnader ved å benytte færre paralleller samtidig som metoden har god nok presisjon. Det er likevel rom for forbedring med tanke på påvisning av anaerobe sporer ved laboratoriet.

Ved å utføre analysene under bachelorforsøkene slik de gjøres i daglig drift ved Råmelkslaboratoriet fikk man en indikasjon på hvordan den forenklete MPN-metoden fungerer på melkeprøver, og etter de tre forsøksukene ble det tydelig at sporer er tilfeldig fordelt og ikke alltid påvises med bruk av 3-rørsmetoden. Selv om den forenklete MPN-metoden er egnet for bruk til kvalitetssikring av melk i vanlig drift ved Råmelkslaboratoriet, ville det ha vært nyttig å ha flere paralleller når holdbarhetsforsøkene for bacheloroppgaven ble utført. Økt antall paralleller øker presisjonen til metoden, og ville gitt et mer nøyaktig resultat da holdbarhetsforsøkene kun ble utført i tre uker. Flere paralleller ville ført til en større arbeidsmengde, slik at PCR-analyse trolig hadde vært en bedre måte å utføre forsøkene på. Begrensningene i denne bacheloroppgaven var at Råmelkslaboratoriet per dags dato ikke har utstyret til å utføre hverken en 9-rørs (eventuelt 12-rørs) MPN-metode, eller PCR.

4.2 Vurdering av prøver til PCR

For å vurdere om PCR kunne benyttes etter at melkeprøvene hadde blitt analysert kjemisk ble påvirkningen 40°C og 50°C har på den anaerobe sporemengden i rå melk testet. Melkeprøver varmes opp til en temperatur på 40°C og 50°C før kjemisk analyse på Råmelkslaboratoriet. Bruk av PCR vil kunne føre til økt effektivitet, da opprinnelig inkubering er 4 døgn på anaerobe sporer, og en PCR-analyse tar vanligvis opptil et par timer. PCR vil også være en mer nøyaktig metode, da den vil gi et semikvantitativt resultat, i motsetning til MPN-metoden som kun gir en indikasjon på mengde sporer. PCR vil kunne gi informasjon om hvilke clostridiearter som befinner seg i melken, en MPN-metode skiller ikke på dette. Informasjon om type art vil kunne være nyttig da det spesielt er tre clostridiearter som forringer meieriprodukter. Det kan tenkes at kvalitetskravene for melk som stilles i forbindelse med anaerobe sporer kan endres når man tar i bruk PCR, ved at sannsynligheten for å gi ut korrekte resultater øker.

Det er viktig å finne ut hvordan høye temperaturer påvirker anaerob sporemengde i forhold til bruk av PCR. Sporerresultatene funnet ved den forenklete MPN-metoden i de tre forsøksukene så ikke ut til å påvirkes av forhøyede temperaturer (40°C og 50°C), ved at resultatene hverken økte eller minket. Det kan derimot ikke konkluderes med at sporemengden i melk ikke påvirkes av de forhøyede temperaturene da den forenklete MPN metoden ikke sier noe om antall sporer, kun gir en indikasjon på mengde. Ved å benytte PCR kunne man ha satt mer eksakte verdier (semikvantitative) for sporeinnhold, dette gjelder både

i daglig drift og for dette forsøket. Etersom resultatene funnet ved MPN-metoden ikke så ut til å påvirkes nevneverdig av 40°C og 50°C, kan man anta at sporeanalyse vha PCR etter kjemisk analyse vil kunne gi korrekte resultat. Dette må bekreftes ved bruk av en annen analysemetode for å sikre at laboratoriet ikke gir ut feil resultater.

4.3 Resultater oppnådd gjennom forsøks tiden

Det var ingen betydelige endringer i den anaerobe sporemengden som ble påvist ved noen av forsøksukene. Resultatene var vanskelige å vurdere da den forenklete MPN-metoden kun gir en indikasjon på mengde sporer, og ikke nøyaktig antall. Det er en begrensning for forsøkene at angivelsen av mengde sporer er 0-3 da dette gir lite rom for vurdering av eksakt mengde sporer til enhver tid. Metoden mangler informasjon om hvor mange sporer som må være tilstede for å oppnå de ulike nivåene av sporer i melken (0-3). Resultatet 3 er et stort område fordi det kan være akkurat nok sporer til at det ikke gir et resultat på 2. Et resultat på 3 er det høyeste som er mulig å oppnå, og derfor vil prøver med 3 på resultat ikke kunne vurderes i forhold til økning av sporer, og heller ikke om antallet minker fordi antallet sporer som kreves for å oppnå et resultat på 3 er ukjent.

For tillaging av positiv kontroll (P1-P5) ble det valgt en anaerob sporekultur med sporerresultat på 3, fordi det ved å bruke et høyt innhold sporer ville være sikkert at de kunne påvises (gi et resultat på 1-3). Det betyr ikke nødvendigvis at melken er sporefri ved et resultat på 0, men at nivået er så lavt at de ikke ble påvist, derfor vil både 0 og 1 på sporerresultat indikere lavt innhold sporer i melken. Høye anaerobe sporetall ville gi større sannsynlighet for å få med sporer ved analyse, og derfor vise tydeligere hvilken mengde sporer som befant seg i melka til enhver tid, ikke basert på tilfeldigheter. Det hadde vært ønskelig at noen av de positive kontrollene hadde hatt et sporerresultat på 2, som lettere ville vist tendenser til at mengde sporer øker eller minker. Dette ble ikke oppnådd gjennom forsøks tiden.

Uke 1 av forsøkene var i utgangspunktet mislykket fordi de positive prøvene P1-P5 ikke ga mer utslag enn tankmelken (P6-P10) på sporerresultatet da tilsatt sporekultur ikke hadde fungert. Det er likevel mulig å benytte resultatene som ble oppnådd til å vurdere påvirkningen tid og temperatur har på rå melk som analyseres ved Råmelkslaboratoriet. Enkelte prøver fikk 0-1 på resultater, som betyr at melkeprøvene (P1-P10) inneholdt sporer som potensielt kunne økt i antall ved de ulike temperaturene. For å kunne si om mengden sporer i melken ble

redusert, var det for lave sporeresultat, da både et resultat på 0 og 1 indikerer et lavt sporeinnhold i melken. Resultatene fra 4°C, 40°C og 50°C var de eneste som kunne benyttes for å vurdere påvirkningen av tid og temperatur på mengde sporer, fordi det ikke var nok melk til å teste alle tidspunkter ved 8°C og romtemperatur.

I uke 2 hadde de positive kontrollene P1-P5 et stabilt høyt sporeresultat på 3 ved alle temperaturene som ble testet. Resultater fra de positive kontrollene viste at ikke alle sporer ødelegges ved de ulike temperaturene fordi sporeresultatene var 3 gjennom hele forsøks tiden. Det er vanskelig å si om den reelle mengden sporer minker da 3 er høyeste resultat, utgangspunktet er ukjent. De negative kontrollene, P6-P10, varierte denne uken fra 0-3 på sporeresultat. For å undersøke om denne variasjonen skyldtes tid og temperatur ble det vurdert om det var en lineær sammenheng mellom mengden sporer påvist, og tid ved de ulike temperaturene. Det ble funnet at det ikke var noen korrelasjon mellom de to faktorene fordi r var $<0,975$. En korrelasjonskoeffisient (r) på $<0,975$ indikerer at det ikke er noen god lineær sammenheng. Forklaringen på de varierende resultatene for de negative kontrollene kan derfor være f.eks. forurensing fra hansker benyttet ved utsåing som ikke ble testet ved bruk av blankprøvene, eller at tankmelken hadde høyere sporeresultater enn 0-1.

I uke 3 var P1 den eneste av de positive prøvene som endret verdi mellom 2 og 3 gjennom forsøks tiden på de ulike temperaturene, og dette kan skyldes et lavere innhold sporer som utgangspunkt enn de andre positive prøvene, eller en tilfeldig endring. For 40°C var det en tydelig endring på P9 ved siste utsåing da sporeresultatene gikk fra 0 til 3. Det er vanskelig å si om endringen skyldes forhøyet mengde sporer grunnet f.eks. temperatur eller om det allerede var mange sporer i tankmelka. Ved å utføre flere utsåinger av P9 etter den siste parallellen som fikk høyt resultat, kunne det ha blitt vurdert om det var en tilfeldig hendelse eller en reell påvirkning av tid og temperatur. Det er 5% sjans for høyt resultat på en prøve med lavt sporeinnhold utført med en forenklet MPN-metode, dette skyldes at sporer er tilfeldig fordelt, slik at dette kan være en mulig forklaring. (7) Heatmap for 40°C ([Vedlegg 6](#)) viser at det er lite endringer i sporetall for de andre negative prøvene (P6-P10).

4.4 Oppbevaring fram til ferdig analyse

Analysen som ikke foregikk på dag 1 i forsøksukene måtte vurderes opp mot 4°C fordi melkeprøvene ble oppbevart ved denne temperaturen, og det var ikke sikkert at 4°C ikke påvirket mengde sporer. Forlenget oppbevaring ved kjøleskapstemperatur (4°C) kan aktivere germinering (22). Alle forsøk viste at sju dager ved 4°C ikke var lang nok tid til å aktivere germinering hos clostridiene i melk, da det ikke var betydelige endringer i prøvene (P1-P10). Med tanke på at sporene er tilfeldig fordelt i melk vil et sporeresultat på 0-1 øke risikoen for at man ikke får med sporer i melkeprøvene og parallellene som sås ut, og dermed er det vanskelig å få påvist om sporemengde endres. En stor mengde sporer vil kun si noe om mengde sporer minker.

Temperatur på melkeprøvene P1-P10 kan være en feilkilde for forsøkene fordi måling av alle de ulike temperaturene ble utført på en vannprøve med et termometer kalibrert for 0-4°C. Termometeret vil kunne vise feil ved temperaturer >4°C, slik at utsåing ikke nødvendigvis ble startet ved korrekt temperatur. Temperaturen på kjølerommet hvor prøvene ble oppbevart før analyse varierer mellom 0-4°C, derfor vil tid til oppnådd temperatur (8°C, romtemperatur, 40°C og 50°C) variere slik at det var vanskelig å starte utsåing til korrekt tid. Det ble benyttet et referansetermometer i kjøleskapet som ble satt til å holde 8°C, dette viste at temperaturen varierte fra 6-9°C gjennom de to forsøksdagene for temperaturen.

Det varierte hvor lenge de ferdig utsådde parallellene sto i romtemperatur før koking i vannbad, som potensielt kan påvirke resultatene med tanke på andre bakterier i melka som vil kunne produsere germinanter og anaerobe forhold gunstig for clostridiene, og gjøre at sporene germinerer. Dersom clostridiene er vegetative før eller under koking i vannbad vil de dø da vannbadet holder en temperatur på 82,7°C som er høyere enn vekstbetingelsene for de tre viktigste clostridiene i melk ([Tabell 7](#)). Hvis clostridiene er vegetative før koking vil dette føre til lavere sporeresultater. Under forsøks tiden ble det forsøkt å sette ferdig utsådde paralleller i vannbad så fort som mulig, men noen morgener ble skinnene stående i opptil 50 minutter før koking fordi vannbadene ikke var varme nok. Ved å se på resultatene for uke 1-3 ser det ikke ut til at dette har påvirket sporemengden, da resultatene ikke var forskjellige fra de som ble oppnådd etter den første utsåingen om morgenen.

4.5 Negative kontroller og blankprøver

Alle resultater ble påvirket av hvilken tankmelk som ble benyttet til forsøkene. Tankmelken fra de ulike rutene varierte i mengde sporer, og dermed ble sporeinnholdet i de positive - og negative kontrollene påvirket. Ruter er ulike runder tankbilene kjører for å hente melk hos leverandører (melkeprodusenter). Sporer er tilfeldig fordelt og det er derfor alltid en sannsynlighet for at de ikke oppdages ved analysering i vanlig drift med en gang, slik at mengden sporer i tankmelken ikke nødvendigvis var 0-1 under forsøkene. Likevel vil høye nivåer sporer ofte påvises tidlig da det er større sannsynlighet (95%) for å påvise sporene i melken hvis det er minst 4,1 sporer/mL melk som er en stor mengde sporer. (7) Ved sporerresultat på 2-3 i tankmelken vil man kunne få plutselig forhøyede sporerresultater i forsøkene som påvirkes av hvilket område man henter ut prøvene fra ([Figur 7](#)) og ikke endringer i forbindelse med temperatur, dette skyldes at sporer er tilfeldig fordelt i melken.

Det ble valgt å bruke tankmelk som negativ kontroll, og det er stor sannsynlighet for at melken inneholder sporer fordi de finnes naturlig og derfor er vanskelig å unngå i melk. Det ble derfor valgt ut tankmelk som hadde fått 0-1 på sporerresultat i 2020. Den negative kontrollen ville derfor kunne gi positive resultater (resultater over 0). Sporenivåene i melken kan variere gjennom året grunnet ulike forhold slik som surfôr og jurhygiene, slik at det alltid er en risiko for at neste prøve har sporerresultat på 3. Under bachelorprosjektet ble samme melk (batch) analysert flere ganger i løpet av en uke, hvor tankmelk fra samme rute normalt testes 11 ganger i året for anaerobe sporer. (5) Ved å analysere samme melk flere ganger øker sannsynligheten for å få med sporer som er tilfeldig fordelt i melken. Grunnen til at det ble valgt tankmelk som negativ kontroll skyldtes et ønske om å skape en naturlig situasjon som etterlignet vanlig drift. Tankmelken kunne hentes uten å måtte involvere melkeprodusenter, og samtidig sørget man for at forsøket benyttet prøver med samme biologisk sammensetning som melkeprøvene laboratoriet analyserer.

For å kunne utelukke forurensing fra f.eks. utstyr benyttet i forsøkene ble det benyttet en vannprøve som blankprøve. Grunnen til at det ble benyttet blankprøver var at det var ønskelig med prøver som ikke inneholdt noen anaerobe sporer. Det ble tappet filtrert og deionisert vann til blankprøvene for å teste for eventuell forurensing. For å eliminere forurensing fra prøvebeholder ble det benyttet samme type beger for blankprøvene som til melkeprøvene. Blankprøvene fulgte ikke forsøksprosessen da de ble tappet rett før de skulle sås ut, og dermed ikke viste forurensinger som kunne oppstå i melkeprøvene grunnet håndtering da

vannet ikke fikk stå lenge nok. Blankprøvene var derimot gode på å vise eventuelle forurensinger på laboratoriestyr.

4.6 Avlesning av resultat

Det var vanskelig å lese av prøvene på grunn av manglende erfaring, og dette representerte derfor en menneskelig feil i forsøkene. Etter avlesning i uke 2 ble det sendt inn ulike prøver til TINE Mastittlaboratoriet for artsbestemmelse ([Tabell 15](#)), som viste at en prøve med *C. tyrobutyricum* hadde blitt lest av som negativ. *C. tyrobutyricum* er en av de viktigste anaerobe sporedannere i meieriindustrien fordi den kan gi blant annet ettergjæring i oster slik som Jarlsberg. Feil avlesning i dette tilfellet skyldtes også feil i prosedyren som beskriver positivt resultat som gassdannelse og fargeomslag til gul (prøven var i dette tilfellet oransjefarget). I uke 3 av forsøket var det lettere å lese av resultater på grunn av mer erfaring og med informasjonen fra Mastittlaboratoriet, i tillegg til bruk av andre glassrør med mindre parafinpropp som ble løftet høyere opp.

4.7 Andre feilkilder

I uke 1 og 2 av forsøkene ble det grunnet mangel på utsyr benyttet selvlagde parafinrør ved å tilsette en omtrentlig mengde parafin til reagensrør av glass før rørene ble kokt i vannbad og avkjølt. Denne metoden å lage rør på var testet på forhånd i driften ved Råmelkslaboratoriet. Det kan tenkes at selvlagde rør fører til økt forurensing da det ble påvist *Bacillus licheniformis* ([Tabell 15](#)) i en blankprøve som hadde fått fargeomslag, men dette kan også skyldes annen forurensing slik som fra pipettene. Selvlagde parafinrør fører til flere feilkilder i forbindelse med både forurensing og selve avlesningen. Fordi parafinmengden varierer kan den påvirke tyngden på proppen slik at den ikke løftes ved gassdannelse, og dermed påvirke sporeresultatet ved at det blir falskt for lavt. I uke 3 av forsøkene ble det benyttet ferdiglagde rør med parafin i fra fabrikk som normalt benyttes i drift, disse rørene inneholder mindre parafin enn de selvlagde rørene, noe som også gjorde det lettere å lese av resultater.

4.8 Utførelse av laboratorieforsøk

Alle laboratorieanalyser ble utført av samme person, og er derfor standardisert. Prøvene ble utsatt for samme betingelser (sett bort i fra tid ved ulike temperaturer) slik at påvirkning fra andre forhold ville være minimal, dette var for å sikre at det som kunne affisere sporemengden i den rå melken var tid ved de ulike temperaturene. Én person utførte alle laboratorieforsøkene, og dette vil kunne påvirke resultatene ved at det er en risiko for at

resultatene går i en bestemt retning (bias). Ved å ha flere laboranter til å utføre forsøkene vil riktigheten til analysen øke. En annen måte å sikre bedre analyseresultater på ville vært å benytte termometer kalibrert for temperaturområdene som skulle undersøkes, eventuelt benyttet andre metoder slik som inkubasjonsskap som holder temperaturen de er stilt inn på for å unngå avvik i temperatur under utførelsen av laboratorieforsøkene.

4.9 Bruk av sporekultur til positive prøver

For å ha bedre kontroll på mengden anaerobe sporer som ble tilsatt i de positive prøvene (P1-P5) kunne det ha blitt benyttet en kommersiell anaerob sporekultur med kjent antall sporer. En annen måte å få lavere sporeresultater enn 3, og dermed positive prøver med ulike sporenivåer, ville ha vært å benytte kun ett positivt sporerør i stedet for to til sporekulturen. Det var ønskelig at de positive kontrollene (P1-P5) hadde sporeresultater som var ulike, eks. at P1 hadde fått resultat på 1 og P2 et resultat på 2. Det som burde ha vært utført på forhånd, før laboratoriearbeidet begynte, er en test med vannprøver (i stedet for melk) tilsatt ulik mengde sporeforynningsfaktorer i vann. En slik test kunne ha sagt noe om hvilken mengde sporer som kreves for å oppnå ulike resultater, hvilken fortynningsfaktor som kreves, ved at vannet ikke inneholder sporer som ikke vil kunne gi falskt forhøyede resultater. Mengde sporer i de positive kontrollene P1-P5 vil i tillegg til den fortynnede sporekulturen påvirkes av antallet sporer i tankmelken.

4.10 Kvalitetssikring av analysen

Forsøkene har fungert som en kvalitetssikring for Råmelkslaboratoriet ved at det er kontrollert rutiner i forbindelse med oppbevaring av melkeprøver fram til analysering av anaerobe sporer i melk. Det er viktig for laboratoriet å finne ut hvilken påvirkning de ulike temperaturene og tid har på den anaerobe sporemengden i rå melk, fordi det per dags dato mangler dokumentert kontroll på hvor lenge prøvene oppbevares ved de ulike temperaturene utenfor kjølerom (0-4°C). Holdbarheten på rå melkeprøver til anaerob sporeanalyse er nyttig informasjon da resultatene Råmelkslaboratoriet produserer i forbindelse med analysering av anaerobe sporer påvirker meieriprodukter, forbrukere og melkeprodusentene. Resultatene er nyttige for å si noe om eventuell implementering av nye rutiner i forbindelse med oppbevaring av melkeprøver til anaerob sporeanalyse for å sikre at korrekte resultater gis ut.

5. Konklusjon

Hypotesen for forsøket var at den anaerobe sporemengden i rå melk ikke påvirkes av temperaturene som skulle testes. Etersom den forenklete MPN-metoden kun gir en indikasjon på mengden sporer er det vanskelig å konkludere med om mengde anaerobe sporer minker eller øker. Sporekulturen fungerte i uke 2 og 3 slik at alle de positive prøvene fikk et sporeresultat på 3 som holdt seg stabilt ved alle temperaturer. Resultatene på P1-P5 var stabilt høye, og derfor kan det tyde på at mengden sporer ikke minker nok til å gi et lavere sporeresultat med MPN-metoden, og at Råmelkslaboratoriet ikke gir ut falskt for lave anaerobe sporeresultater.

Ingen av resultatene oppnådd i de tre forsøksukene viste til at ulike temperaturer (4°C, 8°C, romtemperatur, 40 °C og 50°C) hadde noen innvirkning på anaerobt sporeresultat i rå melk ved bruk av den forenklete MPN-metoden. Det så ut til at mengden anaerobe sporer i melkeprøvene (P1-P10) hverken minket eller økte nok til at sporeresultatet endret «score» ved noen av temperaturforsøkene. Forsøkene viser til at praksisen ved Råmelkslaboratoriet slik den er i dag mest sannsynlig ikke har påvirket den anaerobe sporemengden, slik at det ikke har blitt gitt ut feil resultater på bakgrunn av holdbarheten til melkeprøvene. Resultatene oppnådd i forsøkene sier ikke noe om det reelle antallet anaerobe sporer i melken påvirkes av tid og temperatur. Dette skyldes at resultatangivelsen i MPN-metoden ikke inneholder informasjon om mengden sporer som kreves for å oppnå de ulike resultatene 0-3. Selv om resultatene indikerer at hypotesen stemte, må dette bekreftes med en annen metode slik som PCR for å sikre at det reelle antallet sporer i melken ikke påvirkes av tid og temperatur.

Konklusjonen er at selv om resultatene som ble oppnådd med MPN-metoden tilsier at mengden anaerobe sporer i rå melk ikke forandres av oppbevaring i de satte temperaturene, kreves flere forsøk med andre metoder for å få mer presise resultater som sier noe om den reelle sporemengden påvirkes. Resultatene gir en indikasjon på det man kan forvente av anaerobe sporer i rå melk, men det kreves videre arbeid for å sikre at dette stemmer.

Råmelkslaboratoriet kan benytte PCR til anaerob sporeanalyse etter oppvarming av melkeprøvene, og da kan man anta at effektivitet og nøyaktighet på sporeanalysen øker. Alt i alt er det store kunnskapshull i forbindelse med clostridier i rå melk, og forhåpentligvis har oppgaven bidratt til å fylle noen av disse, men det er fremdeles en lang vei å gå. (41)

6. Referanser

1. Dette er TINE [Internett]. Om TINE. [sitert 16. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.tine.no/om-tine/organisasjonen/dette-er-tine>
2. 2019-05-14 [Internett]. ssb.no. [sitert 17. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/jordhus/aar/2019-05-14>
3. Jørgensen M. Drøvtyggerboka [Internett]. Norbok. Oslo: Landbruksforl.; 1999 [sitert 20. mars 2020]. 366 s. Tilgjengelig på: https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2009100100120
4. Årsrapport TINE 2019 [Internett]. [sitert 17. mars 2020]. Tilgjengelig på: https://medlem.tine.no/aktuelt/nyheter/nyheter/_attachment/498861?_ts=17042effb6a
5. Hagenes, Kirsti. Produksjon av meieriprodukter. 2. utgave. Støren: Baneforlaget; 2010.
6. Regelverk for melke kvalitet.pdf [Internett]. [sitert 1. april 2020]. Tilgjengelig på: https://medlem.tine.no/praktisk-informasjon/tines-regelverk/_attachment/427567?_ts=1617578e13f
7. Johansen A, Stokstad M, Randby ÅT, Lindbäck T. utfordringer for mjølkekvalitet, førkvalitet og dyrehelse.
8. Parker S, Bull P, Smith T. Louis Pasteur og bakteriene [Internett]. Cooke R, Duff J, redaktører. Norbok. Oslo: Bonnier Carlsen; 1994 [sitert 20. mars 2020]. 32 s. (Parker S. Vitenskapens oppdagelser). Tilgjengelig på: https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2015050648074
9. MacDonald R, Reitmeier C. Chapter 6 - Food Processing. I: MacDonald R, Reitmeier C, redaktører. Understanding Food Systems [Internett]. Academic Press; 2017 [sitert 20. mars 2020]. s. 179–225. Tilgjengelig på: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128044452000065>
10. Jakobsen AN, Frøyen OJ, Mehli L, Strand Å, Karlsen H. Utprøving og vurdering av metoder for påvisning av patogene bakterier i melk og ost fra gårdsystemer i Midt-Norge [Internett]. NTNU; 2016 [sitert 6. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/2426988>
11. Niamsiri N, Batt CA. Dairy Products. I: Schaechter M, redaktør. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition) [Internett]. Oxford: Academic Press; 2009 [sitert 1. april 2020]. s. 34–44. Tilgjengelig på: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739445001206>
12. Mikroorganismer - Helsedirektoratet [Internett]. [sitert 1. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/antibiotika-i-sykehus/diagnostikk-mikrobiologi-og-inflammasjonsmarkorer/mikroorganismer>
13. Eivind Kjuus, Morten Årset, Oddbjørn Fjørtoft. TINE Rådgivning FagNytt fredag 13. mars 2020. 2020 mar 13.
14. Bacterial Endospores | Department of Microbiology [Internett]. [sitert 16. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores/>
15. Manley W, Foot K, Davis A. Silage. I: A Dictionary of Agriculture and Land Management [Internett]. Oxford University Press; 2019 [sitert 23. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780199654406.001.0001/acref-9780199654406-e-2039>
16. Doyle CJ, Gleeson D, Jordan K, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, mfl. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *Int J Food Microbiol.* 16. mars 2015;197:77–87.
17. Tiltak på jordet mot sporer [Internett]. Topp Team Fôring. 2011 [sitert 17. mars 2020]. Tilgjengelig på: <https://kuforing.wordpress.com/2011/05/16/tiltak-pa-jordet-mot-sporer/>
18. NMBU. Clostridia and other microbiota in raw milk and milk products: importance for

product quality and food safety (CLOBIO).

19. Talukdar PK, Olguín-Araneda V, Alnoman M, Paredes-Sabja D, Sarker MR. Updates on the sporulation process in Clostridium species. *Res Microbiol.* 1. mai 2015;166(4):225–35.
20. Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker MR. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol.* 1. februar 2011;19(2):85–94.
21. Xiao Y, Francke C, Abee T, Wells-Bennik MHJ. Clostridial spore germination versus bacilli: Genome mining and current insights. *Food Microbiol.* 1. april 2011;28(2):266–74.
22. Driks A. *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems.* Washington, DC: ASM Press; 2016.
23. Gopal N, Hill C, Ross PR, Beresford TP, Fenelon MA, Cotter PD. The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Front Microbiol* [Internett]. 2015 [sitert 27. mars 2020];6. Tilgjengelig på: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.01418/full>
24. Sheff B. Clostridium perfringens. *Nurs Phila.* 2004;34(8):31.
25. Bard RC, Gunsalus IC. GLUCOSE METABOLISM OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS: EXISTENCE OF A METALLO-ALDOLASE. *J Bacteriol.* mars 1950;59(3):387–400.
26. Brenden A. Mikrobiologi, produktkjemi og ernæring [Internett]. Bokmål/nynorsk[utg. Norbok. Oslo: Yrkesopplæring; 1998 [sitert 29. april 2020]. 224 s. Tilgjengelig på: https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2009121104004
27. Jha SN. Chapter 4 - Basic Detection Techniques. I: Jha SN, redaktør. *Rapid Detection of Food Adulterants and Contaminants* [Internett]. San Diego: Academic Press; 2016 [sitert 18. mars 2020]. s. 107–23. Tilgjengelig på: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124200845000044>
28. *Environmental Microbiology : A Laboratory Manual. I* [sitert 2. april 2020]. Tilgjengelig på: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/ebookviewer/ebook/ZTIzMHh3d19fMTg3MTk4X19BTg2?sid=2618a92f-b623-40e5-a97f-b5606451bbb5@sessionmgr4008&vid=0&format=EB&rid=1>
29. Helander L. TINE Råmelklaboratoriet.
30. TINE Råmelklaboratoriets rolle.
31. Helander L. Bacheloroppgave.
32. Jønvik S. Kort spørsmål om lassprøver.
33. Allaby M. peptone. I: *A Dictionary of Plant Sciences* [Internett]. Oxford University Press; 2013 [sitert 27. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780199600571.001.0001/acref-9780199600571-e-5006>
34. AGAR-AGAR. *The Lancet.* 1. desember 1923;202(5231):1200–1.
35. Netgen. Autoklav - autoklavere - Meierileksikon hos Melk.no [Internett]. Melk. [sitert 6. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.melk.no/Meierileksikon/Produksjonsprosesser2/Autoklav-autoklavere>
36. Elin Fløttum. Tillaging av buljong, tilsendte bilder av reagensflasker.
37. Anders Christiansson, Inger Andersson, Jessica Flodin, Lena Tryggvason. Utveckling och standardisering av metodik for analys av klostridiesporer i track.
38. Inger Merethe Ødegård. Anaerobe sporer i leverandørmelk og lassprøve fra gårdstankbilen. Forenklet MPN-metode.
39. Inger Merethe Ødegård. Anaerobe sporer bachelorprosjekt. 2020.
40. Lackie J, Nation BN. MALDI-TOF. I: Nation B, redaktør. *A Dictionary of Biomedicine* [Internett]. Oxford University Press; 2019 [sitert 27. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780191829116.001.0001/acref->

9780191829116-e-5706

41. Marina Aspholm. Bachelor TINE Råmelkslaboratoriet.

7. Vedlegg

7.1 Rådata fra analysering av anaerobe sporer med forenklet MPN-metode - Uke 1

Prøver hvor det ble tomt for melk er indikert med «-».

DAG 1 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLANK	0									

DAG 2 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
BLANK	0									

DAG 1 8°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.25	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
09.25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
10.25	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
11.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
13.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
14.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19.25	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
20.25	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
BLANK	0									

DAG 2 8°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.25	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0
14.25	-	0	0	0	0	0	-	0	-	-
15.25	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-
16.25	-	0	1	0	0	-	-	-	-	-
17.25	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-
18.25	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-
19.25	-	0	0	0	0	-	-	-	-	-
20.25	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-
BLANK	0									

DAG 3 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLANK	0									

DAG 3 RT	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09.15	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
09.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
10.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.15	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
13.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.45	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
15.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
16.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17.15	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
17.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18.45	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-
19.15	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-
19.45	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
20.15	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
20.45	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
BLANK	0									

DAG 4 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLANK	0									

DAG 4 40°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
08.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09.35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
09.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.35	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
BLANK	0									

DAG 4 50°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
12.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.00	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
13.15	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
13.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
14.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLANK	0									

DAG 5 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
20.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLANK	0									

DAG 6 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLANK	0									

DAG 7 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BLANK	0									

7.2 Rådata fra analysering av anaerobe sporer med forenklet MPN-metode - Uke 2

«-» indikerer prøver hvor skinnen hadde falt i gulvet og noen rør var knust

DAG 1 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANJ	0									

DAG 2 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	1	0	0	0
20.30	3	3	3	3	3	1	2	1	0	0
BLANK	0									

DAG 1 8°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
09.15	3	3	3	3	3	0	0	1	0	0
10.15	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
11.15	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
12.15	3	3	3	3	3	1	2	0	0	3
13.15	3	3	3	3	3	1	1	0	1	0
14.15	3	3	3	3	3	1	0	0	0	1
15.15	3	3	3	3	3	1	2	0	1	0
16.15	3	3	3	3	3	2	3	0	0	0
17.15	3	3	3	3	3	2	3	2	1	0
18.15	3	3	3	3	2	3	0	2	2	1
19.15	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
20.15	3	3	3	3	3	1	3	1	0	1
21.15	3	3	3	3	3	3	3	2	1	1
BLANK	0									

DAG 2 8°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
09.15	3	3	3	3	3	3	2	2	1	3
10.15	3	3	3	3	3	2	2	2	0	0
11.15	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
12.15	3	3	3	3	3	2	2	3	1	2
13.15	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
14.15	3	3	3	3	3	3	2	2	3	1
15.15	3	3	3	3	3	3	3	0	2	3
16.15	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1
17.15	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2
18.15	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
19.15	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
20.15	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
21.15	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2
BLANK	0									

DAG 3 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	1	1	1	0	0
20.30	3	3	3	3	3	1	2	1	0	0
BLANK	0									

DAG 3 RT	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
07.45	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
08.15	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
08.45	3	3	3	3	3	0	1	0	0	0
09.15	3	3	3	3	3	0	1	1	0	0
09.45	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
10.15	3	3	3	3	3	0	2	0	0	1
10.45	3	3	3	3	3	3	0	1	0	0
11.15	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
11.45	3	3	3	3	3	1	1	0	1	1
12.15	3	3	3	3	3	1	0	1	0	0
12.45	3	3	3	3	3	0	1	0	0	0
13.15	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
13.45	3	3	3	3	3	1	2	0	0	0
14.15	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
14.45	3	3	3	3	3	1	0	1	1	0
15.15	3	3	3	3	3	2	0	1	0	0
15.45	3	3	3	3	3	1	0	1	1	1
16.15	3	3	3	3	3	2	2	0	1	1
16.45	3	3	3	3	3	0	1	1	0	0
17.15	3	3	3	3	3	1	1	0	1	2
17.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18.15	3	3	3	3	3	3	2	0	1	0
18.45	3	3	3	3	3	0	2	0	0	1
19.15	3	3	3	3	3	2	2	0	1	1
19.45	3	3	3	3	3	0	2	3	1	1
BLANK	0									

DAG 4 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	1	1	0	0	1
20.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	1
BLANK	0									

DAG 4 40°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.40	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
08.55	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
09.10	3	3	3	3	3	1	1	0	0	1
09.25	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
09.40	3	3	3	3	3	0	0	0	1	0
09.55	3	3	3	3	3	0	1	0	0	0
10.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10.25	3	3	3	3	3	0	0	0	1	0
10.40	3	3	3	3	3	0	0	0	1	1
BLANK	0									

DAG 4 50°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
12.20	3	3	3	3	3	0	0	1	0	0
12.35	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
12.50	3	3	3	3	3	0	0	0	1	0
13.05	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
13.20	3	3	3	3	3	0	0	1	0	1
13.35	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
13.50	3	3	3	3	3	1	0	0	0	1
14.05	3	3	3	3	3	0	1	0	1	3
14.20	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	0									

DAG 5 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	1	1	0	0	0
20.30	3	3	3	3	3	1	0	0	0	1
BLANK	0									

DAG 6 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	3	2	0	0
20.30	3	3	3	3	3	1	0	0	1	0
BLANK	0									

DAG 7 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	3	2	1	1	1
20.30	3	3	3	3	3	2	1	1	2	1
BLANK	0									

7.3 Rådata fra analysering av anaerobe sporer med forenklet MPN-metode - Uke 3

DAG 1 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	2 (pos)					0 (neg)				

DAG 2 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 1 8°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.10	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
09.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10.10	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
11.10	2	3	3	3	3	0	0	1	0	0
12.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
13.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
14.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
15.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
16.10	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
17.10	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
18.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
19.10	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.10	2	3	3	3	3	0	1	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 2 8°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
09.10	3	3	3	3	3	0	0	0	1	0
10.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
11.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
12.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
13.10	3	3	3	3	3	1	1	0	1	0
14.10	3	3	3	3	3	0	0	1	0	0
15.10	3	3	3	3	3	0	1	0	0	0
16.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
17.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
18.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
19.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	1
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 3 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	2	3	3	3	3	1	0	0	0	0
20.30	2	3	3	3	3	0	0	1	0	0
BLANK	0 (pos)					0 (neg)				

DAG 3 RT	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
07.30	1	3	3	3	3	0	1	0	0	0
08.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
08.30	2	3	3	3	3	0	0	0	1	0
09.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
09.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
11.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
11.30	2	3	3	3	3	0	0	1	0	1
12.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
12.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
13.00	2	3	3	3	3	0	0	0	0	1
13.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
14.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
14.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
15.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
15.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
16.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
16.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
17.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
17.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
18.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
18.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
19.00	2	3	3	3	3	0	0	0	0	1
19.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 4 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.30	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 4 40°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.50	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
09.05	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
09.20	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
09.35	2	3	3	3	3	0	0	0	0	1
09.50	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10.05	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10.20	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10.35	3	3	3	3	3	0	0	1	0	0
10.50	2	3	3	3	3	1	0	0	3	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 4 50°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
13.15	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
13.30	3	3	3	3	3	0	0	0	1	0
13.45	3	3	3	3	3	0	0	0	1	0
14.00	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
14.15	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
14.30	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
14.45	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
15.00	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
15.15	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 5 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.30	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 6 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

DAG 7 4°C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
08.30	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
20.30	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
BLANK	3 (pos)					0 (neg)				

7.4 Heatmaps for alle temperaturer – Uke 1

Hvite ruter viser til når det ble tomt for melk

4°C Uke 1

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0										
12										
24										
36										
48										
60										
72										
84										
96										
108										
120										
132										
144										
156										

0	
1	
2	
3	

8°C Uke 1

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0										
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										

Romtemperatur Uke 1

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0										
0,5			1							
1									1	
1,5										
2										
2,5										
3										
3,5										
4										
4,5					1					
5										
5,5										
6					1					
6,5										
7										
7,5				1						
8										
8,5			1	1						
9										
9,5										
10										
10,5										
11										
11,5										
12										

40°C Uke 1

Min.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0										
15										
30										
45										
60										
75										
90										
105										
120								1		

50°C Uke 1

Min.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0										
15										
30				1						
45					1					
60										
75										
90										
105						1				
120										

0	
1	1
2	2
3	3

7.5 Heatmaps for alle temperaturer – Uke 2

Hvite ruter indikerer hvor det mangler resultater

4°C Uke 2

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	Red	Red	Red	Red	Red	White	White	White	White	White
12	Red	Red	Red	Red	Red	White	White	White	White	White
24	Red	Red	Red	Red	Red	White	Blue	White	White	White
36	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Orange	Blue	White	White
48	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	White	Blue	White	White
60	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Orange	Blue	White	White
72	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	White	White	Blue
84	Red	Red	Red	Red	Red	White	White	White	White	Blue
96	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	White	White	White
108	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	White	White	White	Blue
120	Red	Red	Red	Red	Red	White	Red	Orange	White	White
132	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	White	White	Blue	White
144	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Blue	Blue	Blue
156	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Blue	Blue	Orange	Blue

0	White
1	Blue
2	Orange
3	Red

8°C Uke 2

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	Red	Red	Red	Red	Red	White	White	Blue	White	White
1	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	White	White	White	White
2	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	White	White	White	White
3	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Orange	White	White	Red
4	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	White	Blue	White
5	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	White	White	White	Blue
6	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Orange	White	Blue	White
7	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Red	White	White	White
8	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Red	Orange	Blue	White
9	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	Orange	Orange	Blue
10	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Blue	Blue	Blue	Blue
11	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Blue	White	Blue
12	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Blue	Blue
13	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Blue	Red
14	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Orange	White	White
15	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Orange
16	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Red	Blue	Orange
17	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Orange
18	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Red	Blue
19	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	White	Orange	Red
20	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Orange	Orange	Blue
21	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Orange
22	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange
23	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
24	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Orange
25	Red	Red	Red	Red	Red	Orange	Red	Red	Red	Orange

Romtemperatur Uke 2

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
0,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
1	3	3	3	3	3	1	2	1	1	1
1,5	3	3	3	3	3	1	2	2	1	1
2	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
2,5	3	3	3	3	3	1	3	1	1	2
3	3	3	3	3	3	3	1	2	1	1
3,5	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
4	3	3	3	3	3	2	2	1	2	2
4,5	3	3	3	3	3	2	1	2	1	1
5	3	3	3	3	3	1	2	1	1	1
5,5	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
6	3	3	3	3	3	2	3	1	1	1
6,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
7	3	3	3	3	3	2	1	2	2	1
7,5	3	3	3	3	3	3	1	2	1	1
8	3	3	3	3	3	2	1	2	2	2
8,5	3	3	3	3	3	3	3	1	2	2
9	3	3	3	3	3	1	2	2	1	1
9,5	3	3	3	3	3	2	2	1	2	3
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10,5	3	3	3	3	3	3	3	1	2	1
11	3	3	3	3	3	1	3	1	1	2
11,5	3	3	3	3	3	3	3	1	2	2
12	3	3	3	3	3	1	3	3	2	2

0	1
1	2
2	3
3	4

40°C Uke 2

Min.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
15	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
30	3	3	3	3	3	2	2	1	1	2
45	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
60	3	3	3	3	3	1	1	1	2	1
75	3	3	3	3	3	1	2	1	1	1
90	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
105	3	3	3	3	3	1	1	1	2	1
120	3	3	3	3	3	1	1	1	2	2

50°C Uke 2

Min.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	1	1	2	1	1
15	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
30	3	3	3	3	3	1	1	1	2	1
45	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
60	3	3	3	3	3	1	1	2	1	2
75	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
90	3	3	3	3	3	2	1	1	1	2
105	3	3	3	3	3	1	2	1	2	3
120	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1

7.6 Heatmaps for alle temperaturer – Uke 3

4°C Uke 3

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
12	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
24	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
36	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
48	2	3	3	3	3	1	0	0	0	0
60	2	3	3	3	3	0	0	1	0	0
72	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
84	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
96	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
108	3	3	3	3	3	1	0	0	0	0
120	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
132	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
144	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
156	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0

0	0
1	1
2	2
3	3

8°C Uke 3

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
1	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
2	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
3	2	3	3	3	3	0	0	1	0	0
4	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
5	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
6	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
7	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
8	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
9	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
10	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
11	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0
12	2	3	3	3	3	0	1	0	0	0
13	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
14	3	3	3	3	3	0	0	0	1	0
15	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
16	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
17	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
18	3	3	3	3	3	1	1	0	1	0
19	3	3	3	3	3	0	0	1	0	0
20	3	3	3	3	3	0	1	0	0	0
21	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
22	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
23	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
24	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0
25	3	3	3	3	3	0	0	0	0	1

Romtemperatur Uke 3

Timer	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	1	2	1	1	1
0,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
1	2	3	3	3	3	1	1	1	2	1
1,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
2	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
2,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
3,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
4	2	3	3	3	3	1	1	2	1	2
4,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
5,5	2	3	3	3	3	1	1	1	1	2
6	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
6,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
7	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
7,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
8	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
8,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
9	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
9,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
10	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
10,5	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
11	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
11,5	2	3	3	3	3	1	1	1	1	2
12	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1

40°C Uke 3

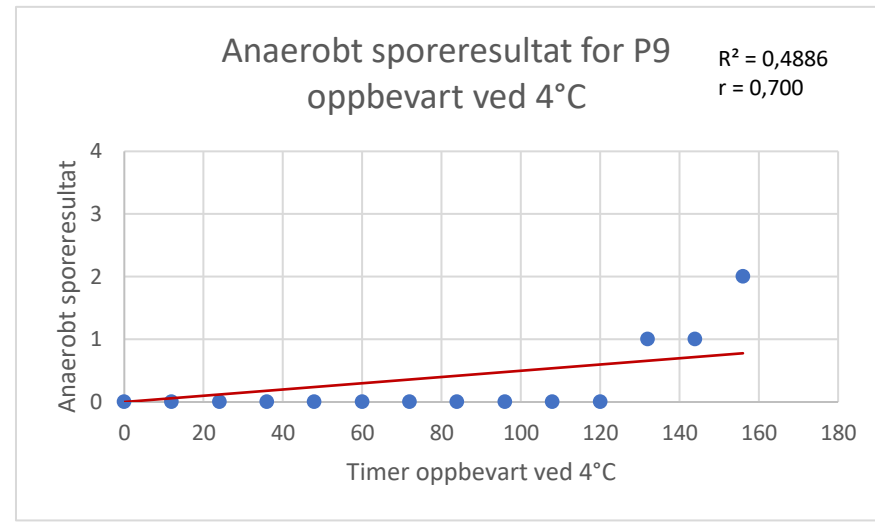
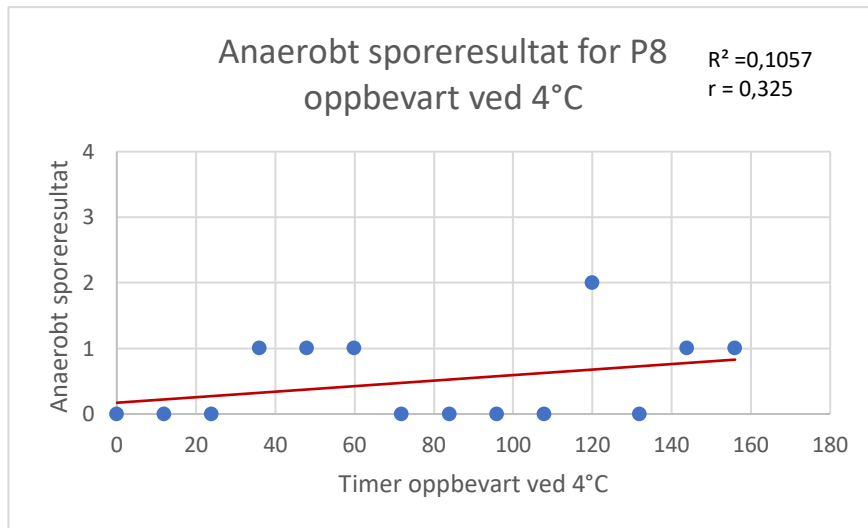
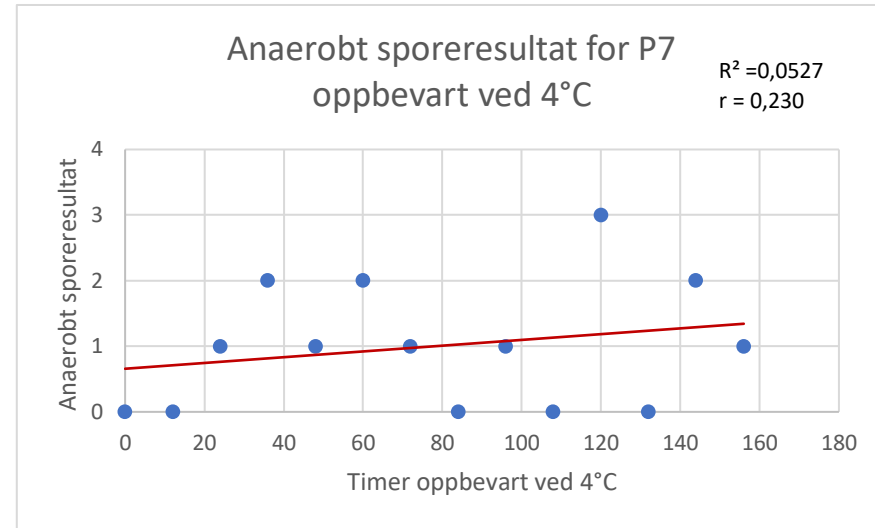
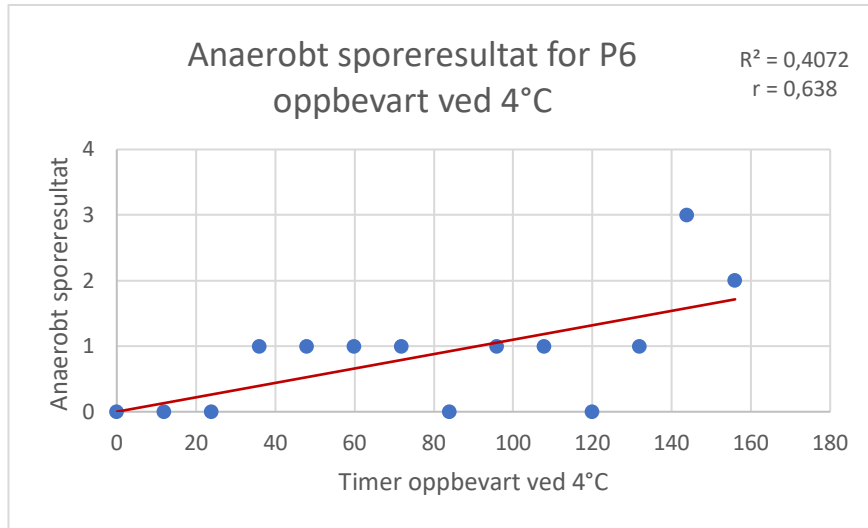
Min.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
15	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
30	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
45	2	3	3	3	3	1	1	1	1	2
60	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
75	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
90	2	3	3	3	3	1	1	1	1	1
105	3	3	3	3	3	1	1	2	1	1
120	2	3	3	3	3	2	1	1	3	1

50°C Uke 3

Min.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
0	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1
15	3	3	3	3	3	1	1	1	2	1
30	3	3	3	3	3	1	1	1	2	1
45	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
60	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1
75	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1

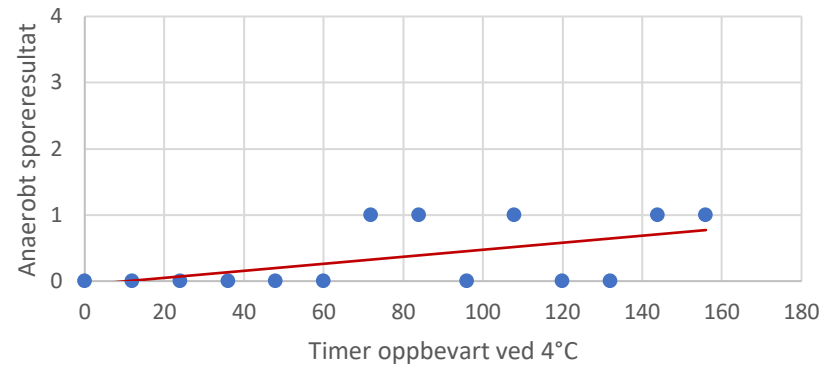
0	1
1	2
2	3
3	4

7.7 Punktdiagram for P6-P10 ved 4°C, 8°C og romtemperatur uke 2

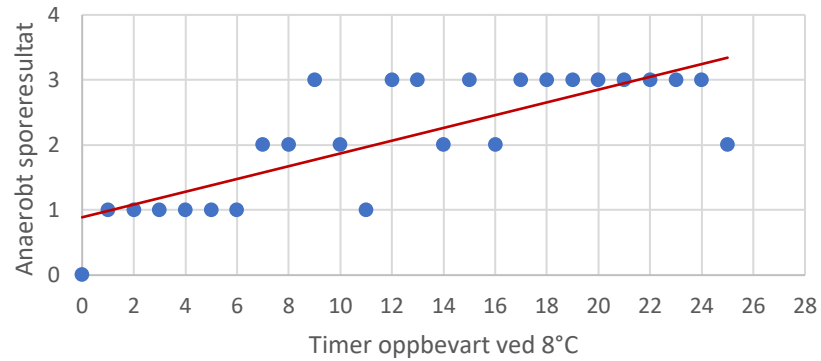


Anaerobt sporerresultat for P10
oppbevart ved 4°C

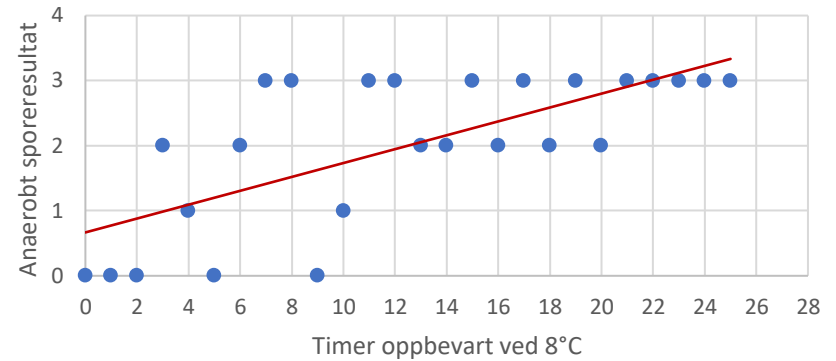
$R^2 = 0,2875$
 $r = 0,536$



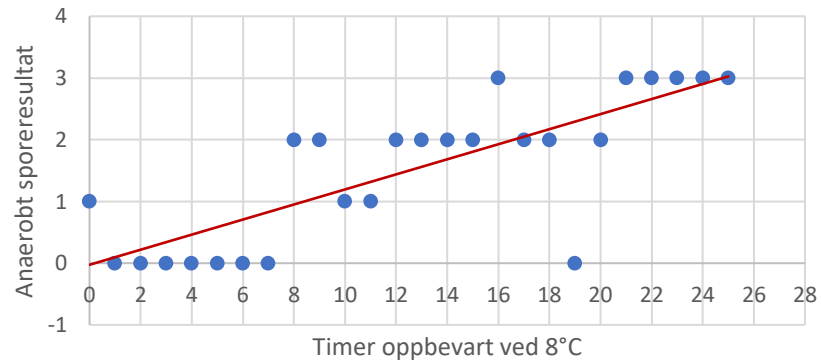
Anaerobt sporeresultat for P6
oppbevart ved 8°C $R^2 = 0,6215$
 $r = 0,788$



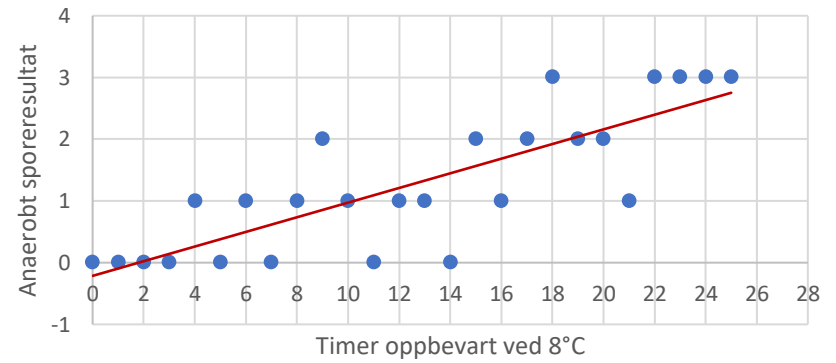
Anaerobt sporeresultat for P7
oppbevart ved 8°C $R^2 = 0,4894$
 $r = 0,700$

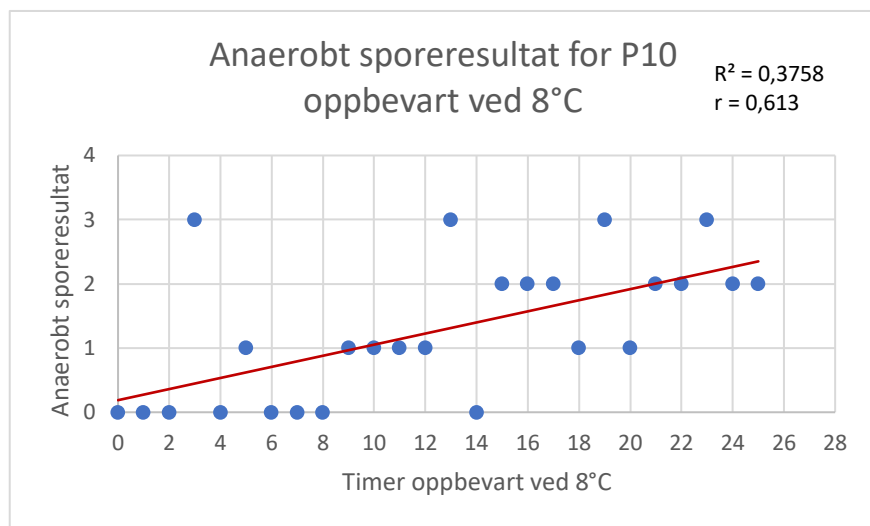


Anaerobt sporeresultat for P8
oppbevart ved 8°C $R^2 = 0,6315$
 $r = 0,795$



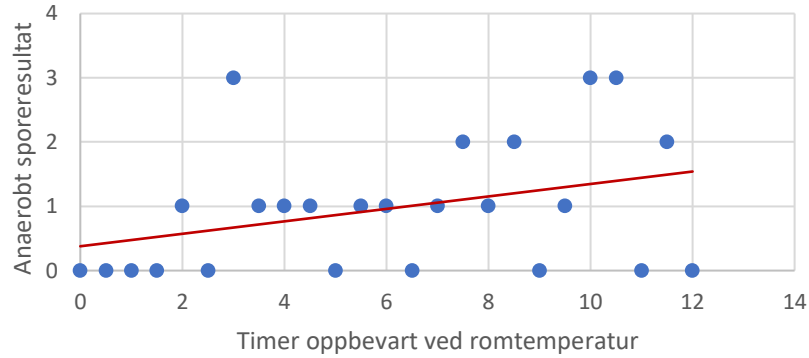
Anaerobt sporeresultat for P9
oppbevart ved 8°C $R^2 = 0,6615$
 $r = 0,813$





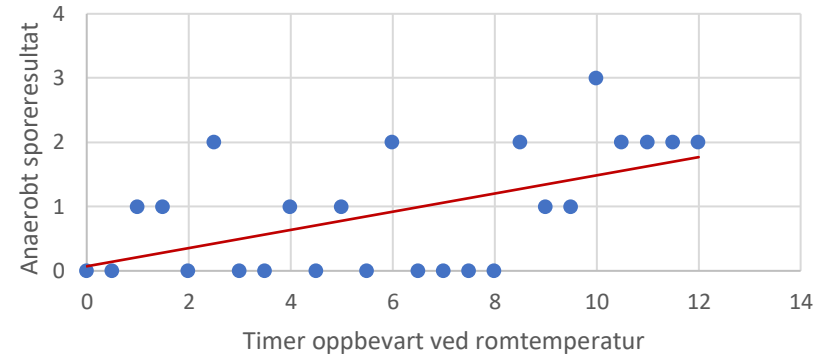
Anaerobt sporeresultat for P6
oppbevart ved romtemperatur

$R^2 = 0,1223$
 $r = 0,350$



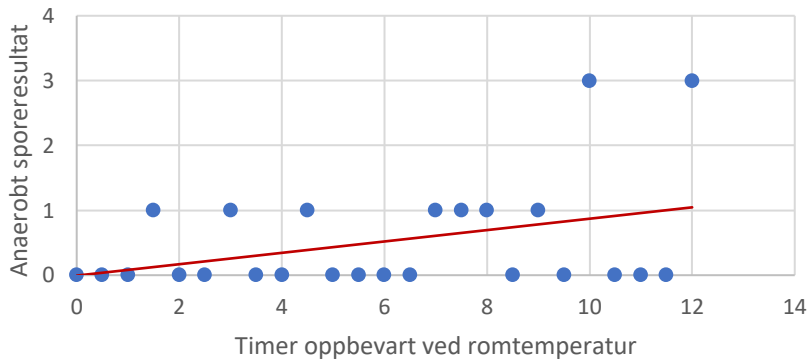
Anaerobt sporeresultat for P7
oppbevart ved romtemperatur

$R^2 = 0,2981$
 $r = 0,546$



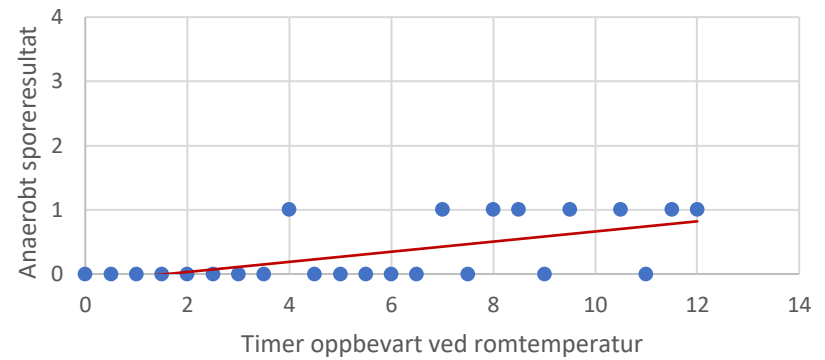
Anaerobt sporeresultat for P8
oppbevart ved romtemperatur

$R^2 = 0,137$
 $r = 0,370$



Anaerobt sporeresultat for P9
oppbevart ved romtemperatur

$R^2 = 0,3601$
 $r = 0,600$



Anaerobt sporerresultat for P10
oppbevart ved romtemperatur $R^2 = 0,2701$
 $r = 0,520$

