

# KINETIKA RASTA BAKTERIJE STAPHYLOCOCCUS AUREUS U PROTEINSKIM DODACIMA PREHRANI NA BAZI SIRUTKE

---

**Giroto, Anamaria**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:350525>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Anamaria Girotto

KINETIKA RASTA BAKTERIJE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* U PROTEINSKIM  
DODACIMA PREHRANI NA BAZI SIRUTKE

Završni rad

Rijeka, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Anamaria Girotto

KINETIKA RASTA BAKTERIJE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* U PROTEINSKIM  
DODACIMA PREHRANI NA BAZI SIRUTKE

Završni rad

Rijeka, 2021. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing

Završni rad obranjen je dana 22. rujna 2021. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing
2. izv. prof. dr. sc. Marin Tota, mr. ph.
3. doc. dr. sc. Morana Tomljenović, dr. med.

Rad ima 34 stranica, 31 slika, 7 tablica, 10 literaturna navoda.

## **ZAHVALA**

*U prvome redu, jedno veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Mateji Ožanič, dipl. sanit. ing. i komentorici Valentini Marečić dipl. sanit. ing. na uloženom trudu, vremenu i podršci koju su mi pružale tokom cijelog istraživanja. Hvala Vam na strpljenju, pristupačnosti i svesrdnoj pomoći kao i na prenesenom znanju i korisnim savjetima za moj daljnji rad i obrazovanje.*

*Zahvaljujem se osoblju zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci na omogućenim materijalima i pristupu laboratoriju za eksperimentalni dio završnoga rada.*

*Ponajviše hvala mojoj obitelji i prijateljima na pruženoj potpori i razumijevanju tokom cijeloga obrazovanja.*

## SAŽETAK

Bakterija *Staphylococcus aureus* je patogen karakterističan po svome staništu i antimikrobnoj rezistenciji koji uzrokuje kliničke infekcije na globalnoj razini. Kliničke infekcije poput bakterijemije i endokarditisa klasičan su primjer prodiranja ove bakterije u čovjekov organizam. Bakterijska sposobnost stvaranja enterotoksina u hrani, dodatan je faktor koji doprinosi patogenosti *S. aureus*. Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti namirnica, hrana kontaminirana ovom bakterijom u koncentraciji većoj od dozvoljene, smatra se zdravstveno neispravnom te može biti uzrok alimentarne intoksikacije. Infekcije uzrokovane bakterijom *S. aureus* kod imunokompromitiranih skupina ljudi mogu dovesti i do smrtnog ishoda. U ovom istraživanju ispitana je sposobnost razmnožavanja bakterije *S. aureus* u proteinskim dodacima prehrani pri temperaturi hladnjaka, sobnoj temperaturi i temperaturi ljudskog organizma unutar 15 dana. Tri vrste proteinskih dodataka prehrani na bazi sirutke korištene u radu su: koncentrat, izolat i hidrolizat. Za praćenje kinetike rasta, proteinski pripravci s dodatkom bakterije *S. aureus* nasadivani su na selektivnu Baird-Parkerovu podlogu na kojoj rastu karakteristične crno-sive kolonije sa halo zonom.

Ključne riječi: *Staphylococcus aureus*, proteinski dodaci prehrani, koncentrat, izolat, hidrolizat

## SUMMARY

Bacteria *Staphylococcus aureus* is a pathogen characterized by its habitat and antimicrobial resistance that causes clinical infections globally. Clinical infections such as bacteremia and endocarditis are classic examples of bacterial penetration into the human body. An additional factor that contributes to the pathogenicity of *S. aureus* is the bacterial ability to produce enterotoxins in food. According to the Ordinance on the health safety of food, food contaminated with this bacterium higher than allowable is considered unhealthy and may cause food intoxication. Infections caused by *S. aureus* in immunocompromised groups of people might be fatal. This study examined the ability of *S. aureus* to multiply in protein supplements at refrigerator temperature, room temperature, and human body temperature within 15 days. The three types of whey-based protein supplements used in the paper are: concentrate, isolate, and hydrolysate. To monitor bacterial growth kinetics, protein preparations supplemented with *S. aureus* were cultivated on a selective Baird-Parker agar on which grow characteristic black-gray colonies with a halo zone.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, protein supplements, concentrate, isolate, hydrolysate

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. Uvod i područje istraživanja .....  | 1  |
| 1.1. Protein .....   | 1  |
| 1.2. Proteini kao makronutrijenti.....   | 1  |
| 1.3. Proteinski dodaci prehrani na bazi sirutke .....                            | 1  |
| 1.4. Dobivanje proteinskih koncentrata, izolata i hidrolizata.....               | 2  |
| 1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 2  |
| 1.5.1. Fiziologija, stanište i struktura.....                                    | 2  |
| 1.5.2. Činitelji virulencije i patogenost.....                                   | 3  |
| 1.5.3. Epidemiologija.....   | 3  |
| 1.5.4. Laboratorijski uzgoj.....   | 4  |
| 1.5.4.1. Baird-Parker podloga.....   | 4  |
| 1.5.4.2. Krvni agar .....  | 4  |
| 1.5.4.3. Određivanje osjetljivosti <i>S. aureus</i> na podloge .....             | 4  |
| 1.5.4.3.1. Difuzijska metoda.....  | 4  |
| 1.5.4.3.2. E-test.....   | 4  |
| 2. Cilj i hipoteze istraživanja.....   | 5  |
| 3. Materijali i postupci .....   | 6  |
| 3.1. Materijali .....  | 6  |
| 3.1.1. Bakterijski soj .....   | 6  |
| 3.1.2. Proteinski prah.....  | 6  |
| 3.2. Postupci .....  | 8  |
| 3.2.1. Uzimanje uzoraka .....  | 8  |
| 3.2.2. Dokazivanje prisustva <i>S. aureus</i> .....                              | 8  |
| 3.2.3. Priprema otopine proteinskog praha.....                                   | 9  |
| 3.2.4. Priprema hranjive podloge za dokazivanje prisustva <i>S. aureus</i> ..... | 11 |
| 3.2.5. Primjena uzoraka na hranjive podloge .....                                | 11 |



|                     |    |
|---------------------|----|
| 4. REZULTATI.....   | 12 |
| 5. RASPRAVA .....   | 29 |
| 6. ZAKLJUČAK.....   | 31 |
| 7. LITERATURA ..... | 32 |
| 8. ŽIVOTOPIS.....   | 33 |

## 1. Uvod i područje istraživanja

### 1.1. Protein

Protein dolazi od grčke riječi *proteos* što u prijevodu znači primaran ili najbitniji. Prema kemijskom sastavu, proteini su organski spojevi građeni od aminokiselina koji u svojoj strukturi sadrže bazičnu amino-skupinu i kiselu karboksilnu skupinu. Svaki stanični genom kodira za specifične proteine koji sudjeluju u regulaciji, građi i komunikaciji između čestica neophodnih za preživljavanje organizma. U našem organizmu razlikujemo nekoliko vrsta proteina od kojih strukturni čine temelj za izgradnju strukture ljudskog tijela.

### 1.2. Proteini kao makronutrijenti

Izuzev proteina koje organizam sam proizvodi, od velike je važnosti unositi proteine putem hrane. Potreba za proteinima kao makronutrijentima, javlja se radi esencijalnih aminokiselina koje organizam sam ne može proizvoditi. Esencijalne aminokiseline imaju značajnu ulogu u sintezi bjelančevina te su potrebne za generiranje neesencijalnih aminokiselina (1/2). Znatno povećana upotreba namirnica bogatih proteinima potrebna je kod sportske prehrane. Sportska prehrana zahtjeva prilagođeno i precizno propisan plan unosa namirnica kako bi se zadovoljio potrebni dnevni unos makronutrijenata i dodataka prehrani u svrhu osiguravanja energije i ostalih hranjivih komponenti koje sportaši troše prilikom treninga (3). Za regeneraciju mišića nakon stresnih i iscrpnih treninga, neke od namirnica koje sportaši koriste kao dobar izvor bjelančevina su termički obrađena kokošja jaja, meso peradi, riba i morski plodovi.

### 1.3. Proteinski dodaci prehrani na bazi sirutke

Uz namirnice, sportska prehrana uključuje i proteinske dodatke prehrani na bazi slatke sirutke. Sirutka je u osnovi nusproizvod koji nastaje prilikom kiselinskih, enzimskih ili kombiniranih koagulacija kazeinskih mlijeka kod proizvodnje sira ili drugih mliječnih proizvoda. Prisutnost kazeina i proteina sirutke u mlijeku je u omjeru 80:20. Ovisno o vrsti koagulacije, sirutka može sadržavati laktozu u većim ili manjim količinama, dok proteina sirutke ima manje od 1%. Među proteinima sirutke prevladavaju  $\beta$ -laktoglobulini kao glavni alergeni u kravljem mlijeku (4). Glavninu sastava sirutke čini voda koja u postotku doseže i do čak 93%. Visoki udio vode čini sirutku idealnim medijem za rast i razvoj mikroorganizama što ujedno postaje ograničavajući

faktor u prehrambenoj industriji za preradu sirutke u razne proizvode.

#### 1.4. Dobivanje proteinskih koncentrata, izolata i hidrolizata

Suvremeni način dobivanja sirutkinih proteinskih koncentrata, izolata i hidrolizata je obrada mlijeka membranskim filtracijama. Proteinski hidrolizati zahtijevaju složeniju obradu pri kojoj se koristi mnoštvo različitih enzima za dobivanje komprimiranoga praha s udjelom proteina od 98-99% i minimalnim sadržajem ugljikohidrata i masti. Metodom ultrafiltracije dobivaju se sirutkini proteinski izolati koji imaju znatno manje šećera, tj. laktoze, u odnosu na proteinske koncentrate. Razlog tomu je što se ultrafiltracijom na membrani zadržavaju samo makromolekule poput bjelančevina i masti. Za dobivanje sirutkinih proteinskih koncentrata provodi se metoda nanofiltracije prilikom koje se na membrani, osim makromolekula, zadržavaju i manje molekule kao što su alkoholi, organske kiseline, mineralne tvari i šećeri. Osnovnu razliku navedenih sirutkinih proteinskih prahova čini udio proteina koji je u sirutkinim hidrolizatima najveći a u koncentratima najmanji.

Nakon membranskih filtracija, tvari zadržane na membrani suše se do sadržaja vode od svega 6% (5).

Osim bogatoga sastava aminokiselina, proteini seruma mlijeka poznati su po svojim preradbeno-funkcionalnim svojstvima pa se iz tog razloga dodaju u prehrambene proizvode u kojima treba postići gustoću otopine, stabilizirati emulziju, zadržati vodu, stvoriti pjenu ili gel te pojačati okus (6).

#### 1.5. *Staphylococcus aureus*

##### 1.5.1. Fiziologija, stanište i struktura

*Staphylococcus aureus* je nepokretna gram pozitivna bakterija svrstana u rod *Staphylococcus*. Bakterija kolonizira površinu kože i izaziva bolesti u ljudi. Osim kože, nalazi se i u nosnom vestibulu te je sastavni dio normalne flore probavnoga sustava. Okruglog je oblika i često formira nakupine u obliku grozdova, iako se može naći i u kraćim lancima. Njezina stanična stijenka sastoji se od debeloga sloja peptidoglikana koju čine umreženi lanci N-acetilglikozamina i N-acetilmuramične kiseline te velikih količina teikoične i lipoteikoične kiseline karakteristične za gram pozitivne bakterije. Specifičnost *S. aureus* je da se na površini njegove stijenke nalazi protein A koji omogućuje vezanje na Fc-fragment imunoglobulina G,

pri čemu ga imunski sustav ne prepoznaje kao patogena. Katalaza i oksidaza je pozitivan i ne stvara spore. Fakultativni je anaerob premda najbolje raste u aerobnim uvjetima.

#### 1.5.2. Činitelji virulencije i patogenost

*S. aureus* proizvodi nekoliko toksina.  $\alpha$ -toksin je protein koji insercijom u lipidni dvosloj stvara transmembranske pore čime lizira membranu citoplazma stanica domaćina i proizvode ga gotovo svi sojevi *S. aureus*.

Razaranjem međustaničnih veza, toksin eksfolijatin dovodi do razdvajanja epidermisa na području stratum spinosum i stratum granulosum, što uzrokuje nastajanje mjehura u području kože.

Jedan od najvažnijih uzroka stafilokoknog toksičnoga šoka je toksin sindroma toksičnoga šoka koji se izlučuje tijekom razvoja infekcije i ima izravan toksični učinak na endotelne stanice te dovodi do hipotenzije i šoka. Uz navedeno može uzrokovati deskvamaciju kože pri pojavi osipa i teška oštećenja jetre i bubrega.

Kod trovanja hranom vrlo su česta stafilokokna trovanja prouzročena njegovim termostabilnim enterotoksinima koji izazivaju gastrointestinalne simptome. Prvi znakovi takvog trovanja započinju već unutar nekoliko sati, dok je za oporavak potrebno manje od 24 sata. Izuzetak od navedenog su kronični bolesnici kod kojih je oporavak nakon stafilokoknog trovanja dugotrajniji.

*S. aureus* uzrokuje i sustavne infekcije poput bakterijemije, artritisa, endokarditisa, infekcija kirurških rana, dubokih tkiva i organa te pneumonija.

#### 1.5.3. Epidemiologija

Put prijenosa bakterije *S. aureus* može biti izravnim ili neizravnim kontaktom. Širenje bakterije moguće je s čovjeka na čovjeka kapljičnim putem ili preko raznih predmeta. Jedna od značajnijih epidemija, koja je obilježila svijet 80-ih godina prošlog stoljeća, je epidemija MRSA sojem. MRSA ili meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* uzročnik je bolničkih infekcija zbog svoje antimikrobne otpornosti koja kao krajnji ishod može prouzročiti smrt bolesnika. Osim bolničkih, poznate su i izvanbolničke infekcije koje uzrokuju infekcije kože i drugih organa. Za njihovo liječenje upotrebljavaju se antibiotici poput klindamicina, azitromicina i eritromicina (7).

#### 1.5.4. Laboratorijski uzgoj

*Staphylococcus aureus* može se kultivirati na nekoliko različitih hranjivih podloga, uključujući Baird-Parker i krvni agar, pri čemu izgled kolonija ostaje nepromijenjen. Bakterija se uzgaja tijekom 24 sata pri temperaturi od 37 °C.

##### 1.5.4.1. Baird-Parker podloga

Za dokazivanje prisustva bakterije *S. aureus* u nekom uzorku, uobičajeno je presađivanje bakterija na selektivnu i diferencijalnu Baird-Parkerovu podlogu. Vrijeme inkubacije je 24-48 sati pri temperaturi od 37 °C na kojoj bakterija formira crno-sive kolonije sa halo zonom.

##### 1.5.4.2. Krvni agar

Krvni agar je diferencijalna hranjiva podloga s dodatkom životinjske krvi koja se koristi za izolaciju različitih bakterijskih vrsta. Nakon inkubacije od 24 sata na temperaturi od 37 °C, *S. aureus* raste u obliku bjelkastih kolonija koje s vremenom postaju žućkaste. Otuda naziv *aureus* (zlatni).

##### 1.5.4.3. Određivanje osjetljivosti *S. aureus* na podloge

###### 1.5.4.3.1. Difuzijska metoda

Difuzijska metoda je semikvantitativna metoda koja se koristi za dokazivanje antimikrobne rezistencije MRSA soja. Na krutu hranjivu podlogu nanosi se bakterija u određenoj koncentraciji i papirnati diskovi s antibiotikom koji difundira u podlogu. Ukoliko je bakterija rezistentna na određeni antibiotik, u potpunosti će porasti na agaru. U suprotnom, ostaje prazan prostor oko diskova s antibiotikom jer na bakteriju djeluju svojstva antibiotika i s toga ne može rasti na tom dijelu podloge.

###### 1.5.4.3.2. E-test

Slično kao i u difuzijskoj metodi, kod E-testa se koristi antibiotik. Na papirnoj vrpici nanose se različite koncentracije određenog antibiotika koji se položi na agar na kojem je prethodno nasadena bakterija. Antibiotik difundira u podlogu na različitim udaljenostima od vrpce ovisno o koncentraciji i sprječava daljnji rast bakterije.

## 2. Cilj i hipoteze istraživanja

Proteinski pripravci na bazi sirutke konzumiraju se u najvećoj mjeri tijekom i/ili nakon povećane sportske aktivnosti. Upravo stoga, hipoteza ovog istraživanja je da mikroorganizmi prisutni na koži čovjeka, kao što su bakterije roda *Staphylococcus*, mogu potencijalno uzrokovati kvarenja takvih namirnica.

Zbog toga, cilj ovog istraživanja bio je odrediti kinetiku rasta bakterije *S. aureus* unutar tri proteinska pripravaka na bazi sirutke, koji se znatno razlikuju prema nutritivnoj deklaraciji. Nadalje, cilj istraživanja je pratiti kinetiku rasta bakterije *S. aureus* u različitim proteinskim pripravcima na tri različite temperature, kao što je temperatura hladnjaka, sobna temperatura i temperatura ljudskog tijela.

### 3. Materijali i postupci

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Bakterijski soj

U istraživanju korištena je kruta Baird-Parker podloga za dokazivanje prisutnosti koagulaza-pozitivnih stafilokoka. Diferencijalnost podloge definirana je prozirnim zonama oko sivo-crnih obojenih kolonija koje nastaju bakterijskom razgradnjom žumanjka i kalij telurita podloge.

Za selektivna svojstva podloge zadužen je 1%-tni kalij telurit te litij klorid koji inhibiraju porast drugih mikroorganizama (7).

Tijekom 24 sata, bakterija se uzgaja na Baird-Parker podlozi pri temperaturi od 37 °C.

##### 3.1.2. Proteinski prah

U eksperimentalnom dijelu istraživanja korištene su tri različite vrste proteinskog praha: sirutkini proteinski koncentrat, izolat i hidrolizat. Glavna i osnovna karakteristika navedenim dodacima prehrani je njihova jasno definirana nutritivna vrijednost prema kojoj se oni međusobno razlikuju.

Korišteni proteinski prahovi kupljeni su u poslovnicama zdrave hrane i sportske opreme.

U sljedećim tablicama navedene su nutritivne deklaracije kupljenih proizvoda.

Tablica 1. Nutritivna vrijednost sirutkinog proteinskog koncentrata

| NUTRITIVNA VRIJEDNOST            |                |              |
|----------------------------------|----------------|--------------|
| Na                               | 100g           | 25g          |
| Energija                         | 1509kJ/357kcal | 377kJ/89kcal |
| Masti                            | 5,3g           | 1,4g         |
| od kojih zasićene masne kiseline | 3,9g           | 1,0g         |
| Ugljikohidrati                   | 8,5g           | 2,1g         |
| od kojih šećeri                  | 3,2g           | 0,8g         |
| Bjelančevine                     | 65g            | 16g          |
| Sol                              | 0,84g          | 0,21g        |

Tablica 2. Nutritivna vrijednost sirutkinog proteinskog izolata

| NUTRITIVNA VRIJEDNOST            |                |              |
|----------------------------------|----------------|--------------|
| Na                               | 100g           | 25g          |
| Energija                         | 1497kJ/353kcal | 374kJ/88kcal |
| Masti                            | 1,3g           | 0,3g         |
| od kojih zasićene masne kiseline | 0,8g           | 0,2g         |
| Ugljikohidrati                   | 6,6g           | 1,7g         |
| od kojih šećeri                  | 2,3g           | 0,6g         |
| Bjelančevine                     | 77g            | 19g          |
| Sol                              | 0,50g          | 0,13g        |



Tablica 3. Nutritivna vrijednost sirutkinog proteinskog hidrolizata

| NUTRITIVNA VRIJEDNOST            |                |              |
|----------------------------------|----------------|--------------|
| Na                               | 100g           | 25g          |
| Energija                         | 1397kJ/334kcal | 349kJ/83kcal |
| Masti                            | 0,5g           | 0,1g         |
| od kojih zasićene masne kiseline | 0,2g           | 0g           |
| Ugljikohidrati                   | 0,9g           | 0,2g         |
| od kojih šećeri                  | 0,9g           | 0,2g         |
| Bjelančevine                     | 80g            | 20g          |
| Sol                              | 0,08g          | 0,02g        |

### 3.2. Postupci

#### 3.2.1. Uzimanje uzoraka

Uzorci briseva prikupljeni su sa sprava fitness centra i teretane na otvorenom te su testirani na nekoliko bakterija (enterobakterije, *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*). Budući da se *S. aureus* pokazao najzastupljenijim u testiranim uzorcima, daljnja istraživanja su provedena upravo s tom bakterijom.

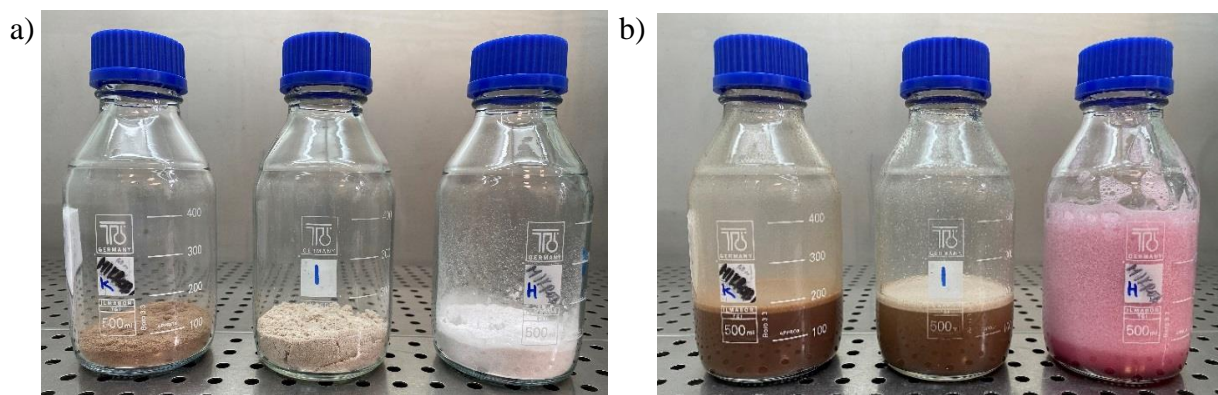
#### 3.2.2. Dokazivanje prisustva *S. aureus*

Prisutnost *S. aureus* dokazana je uzetim brisevima sa različitih sprava za vježbanje. Brisni štapići prvo su uronjeni u peptonsku vodu unutar epruveta te je prebrisana površina sprave za vježbanje od otprilike 25 cm<sup>2</sup> nakon čega su štapići ponovno uronjeni u 10 ml peptonske vode. Prije samoga nasađivanja uzoraka na agar, epruvete su podvrgnute centrifugiranju kako bi se talog bakterija mogao jednoliko raspodijeliti u otopini. Nakon centrifugiranja, pipetirano je po 100 mikrolitara svakoga uzoraka na Baird-Parkerove podloge (čija je priprema kasnije

objašnjena u radu). Ispipetirani uzorci su razmazani pomoću staklenih L štapića preko podloga i inkubirani na temperaturi od 37 °C. Podloge su inkubirane tijekom 24 sata na temperaturi od 37 °C nakon čega je uočen porast karakterističnih crnih kolonija sa halo zonom. Dokazivanje karakterističnih kolonija provodilo se potvrdnim testovima bojanja po Gramu te pozitivnim reakcijama katalaze i oksidaze.

### 3.2.3. Priprema otopine proteinskog praha

Za pripremu otopina, u staklenim bočicama je odvagano 25 grama praha proteinskoga koncentrata, izolata i hidrolizata. Nakon odvage, u svaku bočicu je dodano 150 ml vode prethodno sterilizirane u autoklavu i temeljito promućkano.

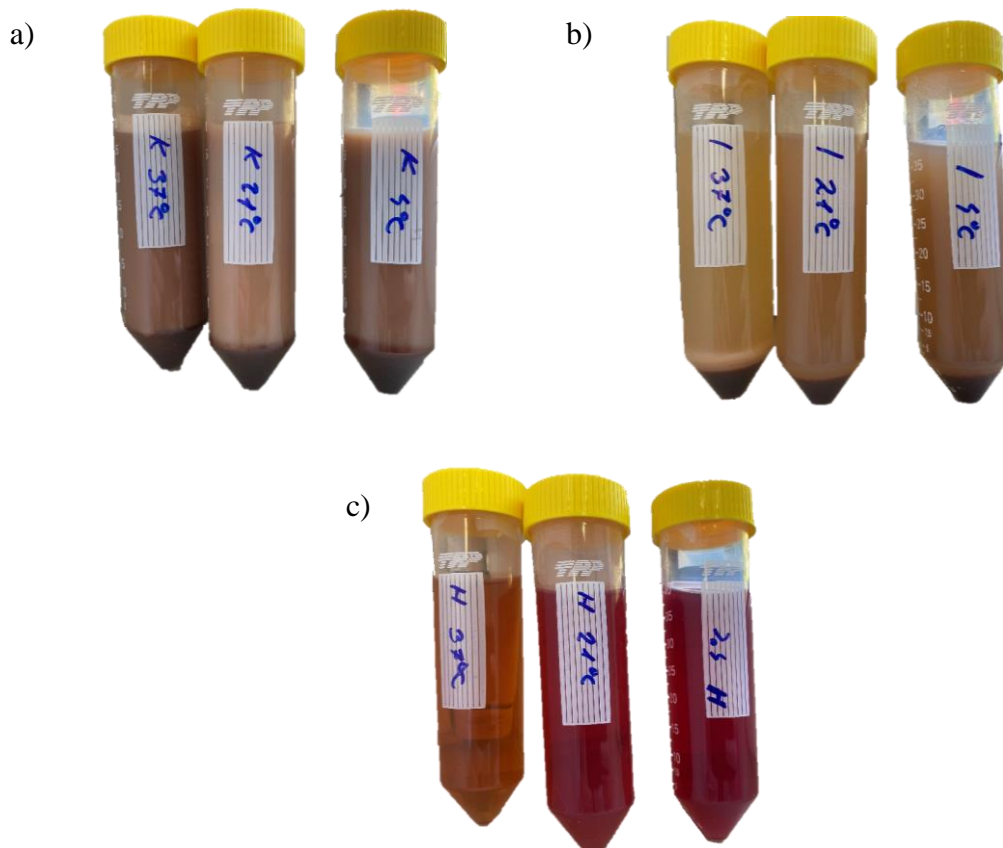


Slika 1. Priprema proteinskih otopina.

Prethodno dobivene karakteristične kolonije *S. aureus* na Baird-Parkerovim podlogama, uzete su bakteriološkom ezom i promiješane steriliziranim vodom u prozirnoj kiveri. Nastaloj otopini mjerena je optička gustoća spektrometrom. Optička gustoća definirana je logaritamskom funkcijom omjera intenziteta upadne i propuštene svjetlosti. U prijašnjim radovima eksperimentalno je dokazano da pripravak čija optička gustoća iznosi 1 A (apsorbancija), sadrži  $10^9$  CFU/ml bakterija. Istu smo vrijednost dobili i upotrijebili za ovo istraživanje a ona označava da je u svakom mililitru otopine prisutno  $10^9$  bakterija. Pipetiranjem 15  $\mu$ l tako pripremljene otopine u sve tri staklene bočice od 150 ml proteinskih pripravaka, dobiveni su uzorci sa dodatkom bakterijske kulture u iznosu od  $10^5$  CFU/ml. Svaki proteinski pripravak pretočen je u tri epruvete koje su potom čuvane pri temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C. Sveukupno je pripravljeno devet proteinskih otopina s dodatkom bakterije *S. aureus*.



Slika 2. Očitanje optičke gustoće vode na spektrometru nakon kontaminacije sa *S.aureus*.



Slika 3. Proteinski pripravci koncentrata (K), izolata (I) i hidrolizata (H) s dodatkom *S. aureus* u koncentraciji od  $10^5$  CFU/ml.

#### 3.2.4. Priprema hranjive podloge za dokazivanje prisustva *S. aureus*

Za pripremu Baird-Parkerove podloge potrebno je:

- suspendirati željenu količinu medija u 950 ml destilirane vode
- zagrijavati uz povremeno miješanje jednu minutu da se medij potpuno otopi
- autoklavirati 15 min na 121 °C
- nakon hlađenja na 45-50 °C, dodati 3 ml sterilne otopine 3,5%-tnog kalijevog telurita hranjivoj podlozi obogaćenom žumanjkom i teluritom
- dobro promiješati i preliti u Petrijevu zdjelicu

#### 3.2.5. Primjena uzoraka na hranjive podloge

Nakon pripremljenih proteinskih otopina sa dodatkom bakterija nasađeno je 10 µl otopine iz svake epruvete na Baird-Parker podloge. Podloge su inkubirane pri temperaturi od 37 °C. Izvorne epruvete s uzorcima vraćene su na prethodno definirane temperature od 4 °C, 21 °C i 37 °C. Kako bi pratili kinetiku rasta bakterija u pripremljenim otopinama, isti postupak je ponovljen nakon 4., 7., 10. i 13. dana. Očitavanje porasta karakterističnih kolonija sa inkubiranih podloga uslijedilo je 48 sati nakon svakog definiranog vremenskog razdoblja. U svakom vremenskom razdoblju eksperimentalnoga dijela istraživanja izbrojane su sve kolonije crno-sive boje sa halo zonom karakteristične za bakterije roda *Staphylococcus aureus*.

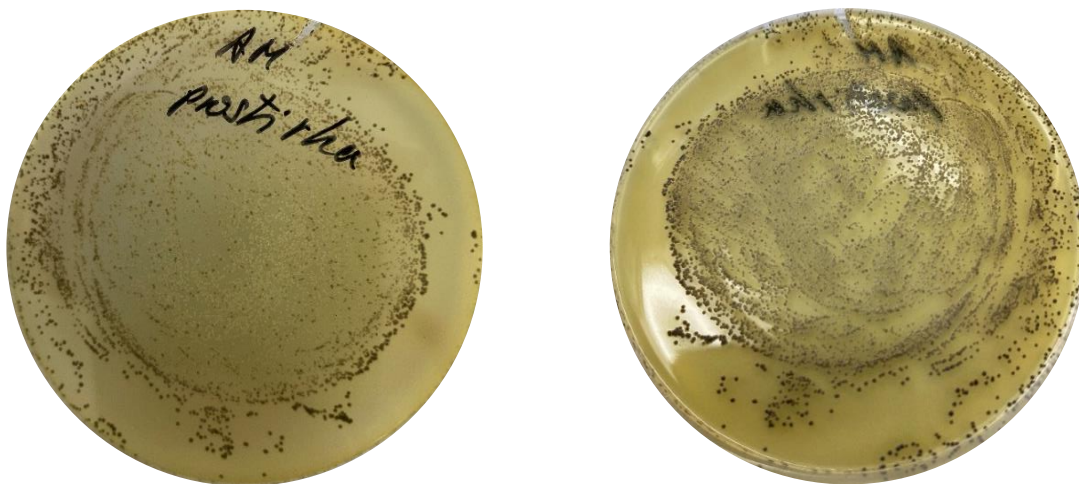
S obzirom na veliki broj porasta kolonija kod sirutkinih proteinskih koncentrata i izolata, u kasnijim vremenskim razdobljima nasađena je manja količina otopina od 5 µl, dok je u proteinskim hidrolizatima uočen slabiji porast i iz tog razloga je nasađeno 50 µl otopine. S obzirom na uspješno razmnožavanje bakterija u pojedinim uzorcima, posljednji dan nasađivanja uzoraka iz epruveta na nove podloge, volumen uzorka umanjen je sa 5 µl na 2 µl zbog gustoga porasta. Pripravak hidrolizata je međutim ostao pipetiran i nasađen u istim količinama kao i pripravci koncentrata i izolata pri ostalim temperaturama. Daljnja procedura inkubacije i održavanja izvornih proteinskih otopina je ostala identična. Petnaesti dan je bio završni dan eksperimentalnoga dijela istraživanja kada je očitani i zabilježen porast karakterističnih kolonija.

#### 4. REZULTATI

Za dokazivanje prisutnosti bakterije *S. aureus* u teretanama, brisnim štapićima su prebrisane površine sprava za vježbanje i istezanje. Uzorci su nasadivani na Baird-Parkerovim podlogama i kasnije korišteni za kontaminaciju proteinskih pripravaka.



Slika 4. Pozitivan porast *Staphylococcus aureus* na Baird-Parker podlozi uzet brisom trake za trčanje fitness centra.

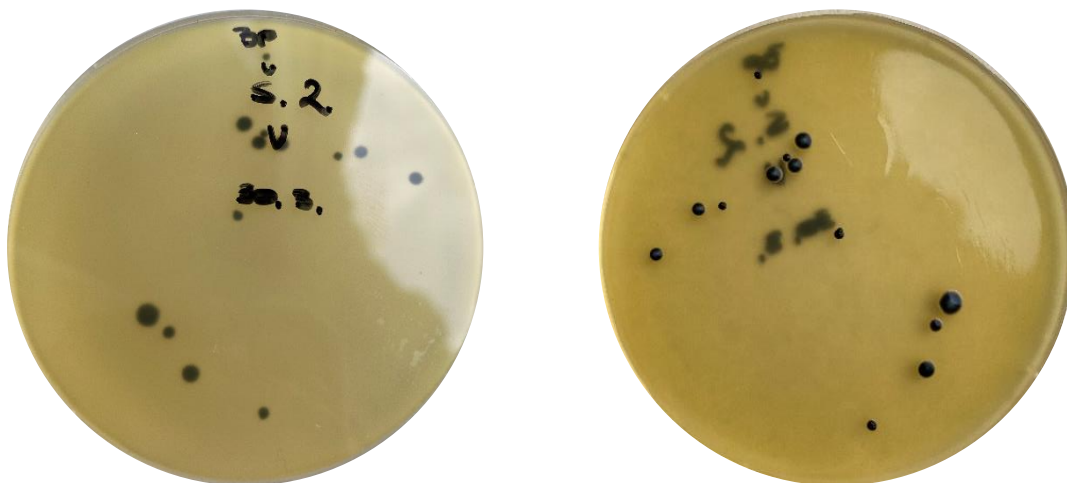


Slika 5. Pozitivan porast *Staphylococcus aureus* na Baird-Parkerovoj podlozi uzet brisom prostirke iz fitness centra.





Slika 6. Pozitivan porast *Staphylococcus aureus* na Baird-Parkerovej podlozi uzet brisom orbitreka sa vježbališta na otvorenom.



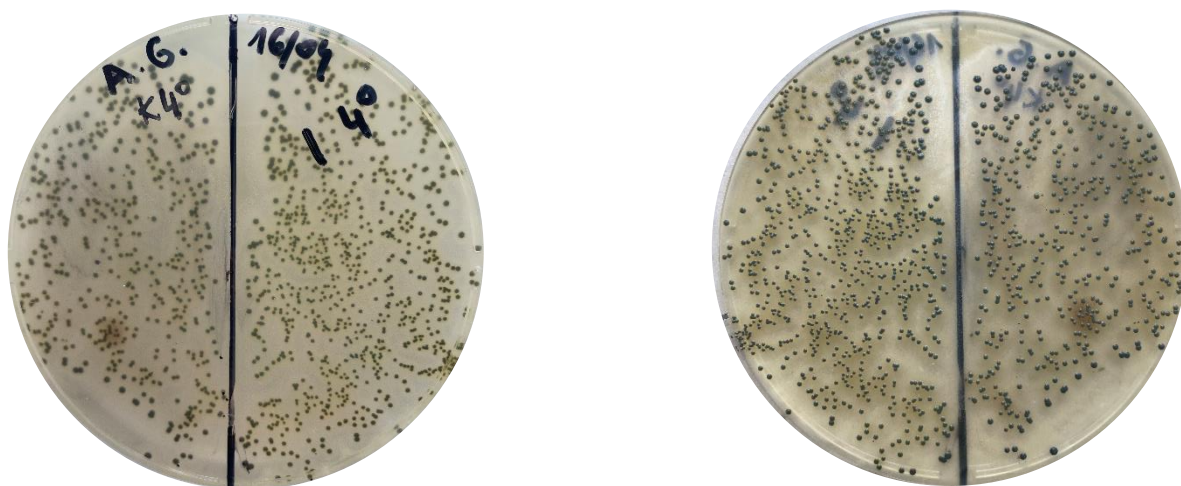
Slika 7. Pozitivan porast *Staphylococcus aureus* na Baird-Parkerovej podlozi uzet brisom šipke sa vježbališta na otvorenom.

Unutar 15 dana praćena je kinetika rasta bakterije *S. aureus* u proteinskim koncentratima, izolatima i hidrolizatima na temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C.

Ukupan broj poraslih kolonija bakterije *S. aureus* na Baird-Parkerovom agaru prikazan je slijedećim tablicama i slikama.

Tablica 4. Prikaz ukupnog broja poraslih bakterija u proteinskim otopinama s dodatkom *S. aureus* tijekom inkubacije od četiri dana na temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C.

| 4. DAN     | Broj bakterija (CFU/ml)  |                          |                          |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | 4 °C                     | 21 °C                    | 37 °C                    |
| Koncentrat | $2,9 \times 10^4$ CFU/ml | $1,9 \times 10^5$ CFU/ml | $1,8 \times 10^5$ CFU/ml |
| Izolat     | $6,5 \times 10^4$ CFU/ml | $4,8 \times 10^5$ CFU/ml | $1,5 \times 10^5$ CFU/ml |
| Hidrolizat | 100 CFU/ml               | 200 CFU/ml               | 0 CFU/ml                 |



Slika 8. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih koncentrata i izolata nakon četiri dana izlaganja temperaturi od 4 °C.

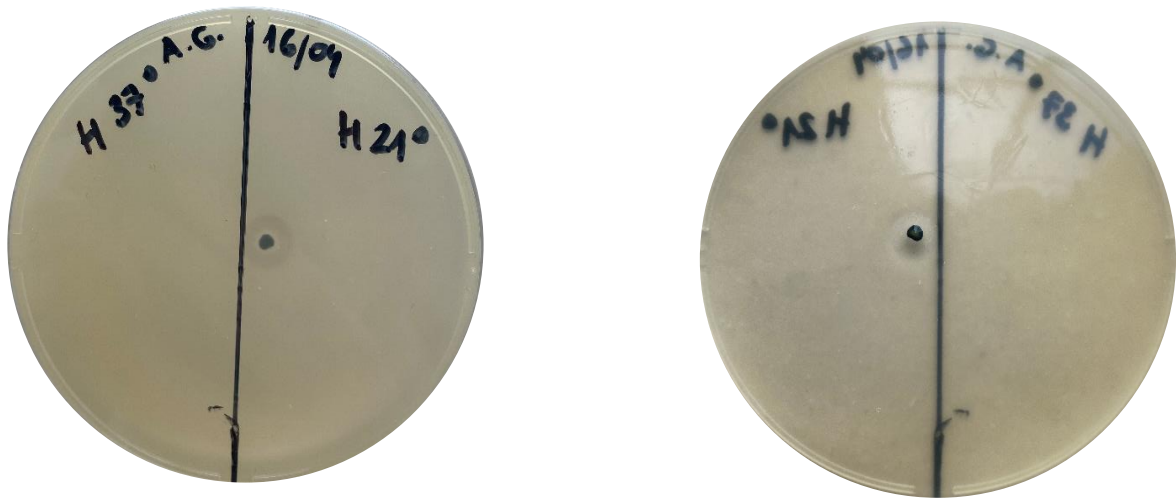


Slika 9. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih koncentrata nakon četiri dana izlaganja temperaturama od 37 °C i 21 °C.



Slika 10. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog hidrolizata nakon četiri dana izlaganja temperaturi od 4 °C.





Slika 11. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog hidrolizata nakon četiri dana izlaganja temperaturi od 21 °C.



Slika 12. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih izolata nakon četiri dana izlaganja temperaturama od 37 °C i 21 °C.

Tablica 5. Prikaz ukupnog broja poraslih bakterija u proteinskim otopinama s dodatkom *S. aureus* tijekom inkubacije od sedam dana na temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C.

| 7. DAN     | Broj bakterija (CFU/ml)  |                          |                           |
|------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|            | 4 °C                     | 21 °C                    | 37 °C                     |
| Koncentrat | $1 \times 10^4$ CFU/ml   | $9,6 \times 10^5$ CFU/ml | $5,35 \times 10^3$ CFU/ml |
| Izolat     | $1,2 \times 10^5$ CFU/ml | $1,4 \times 10^6$ CFU/ml | $9 \times 10^5$ CFU/ml    |
| Hidrolizat | 0 CFU/ml                 | 0 CFU/ml                 | 0 CFU/ml                  |



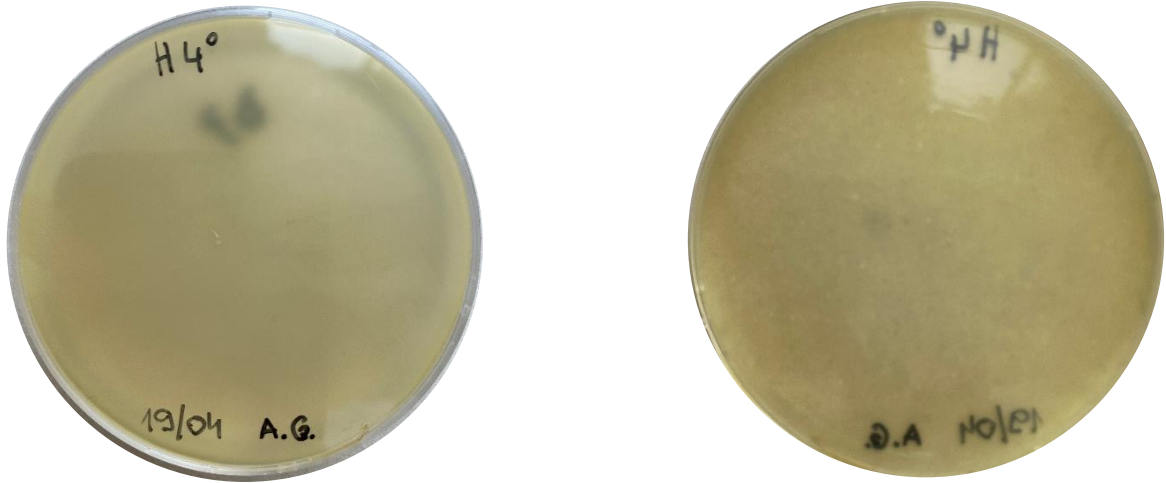
Slika 13. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih izolata nakon sedam dana izlaganja temperaturama od 37 °C i 21 °C.



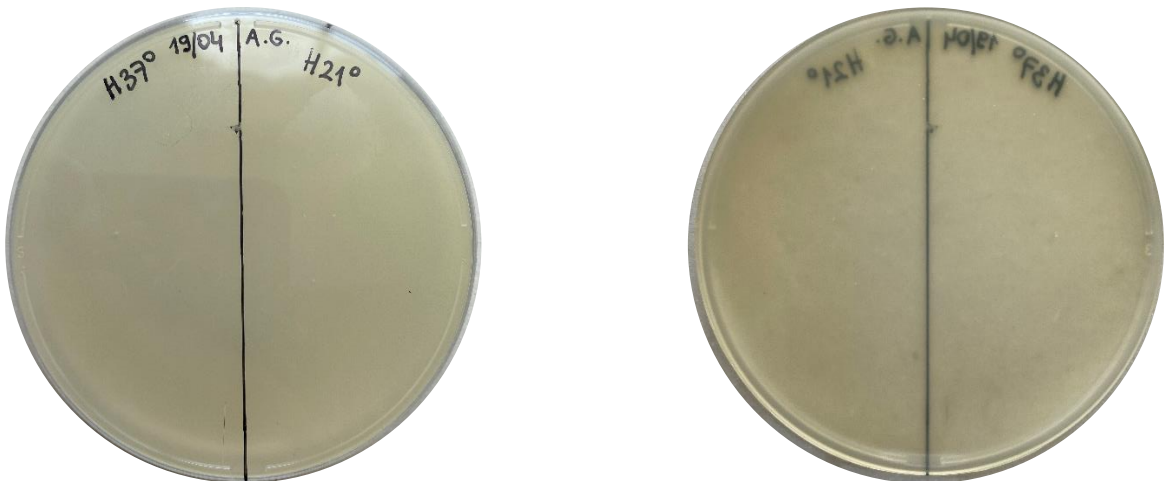
Slika 14. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih koncentrata nakon sedam dana izlaganja temperaturama od 37 °C i 21 °C.



Slika 15. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih izolata nakon sedam dana izlaganja temperaturama od 37 °C i 21 °C.



Slika 16. Podloga bez porasta bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog hidrolizata nakon sedam dana izlaganja temperaturi od 4 °C.



Slika 17. Podloga bez porasta bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih hidrolizata nakon sedam dana izlaganja temperaturama od 37 °C i 21 °C.

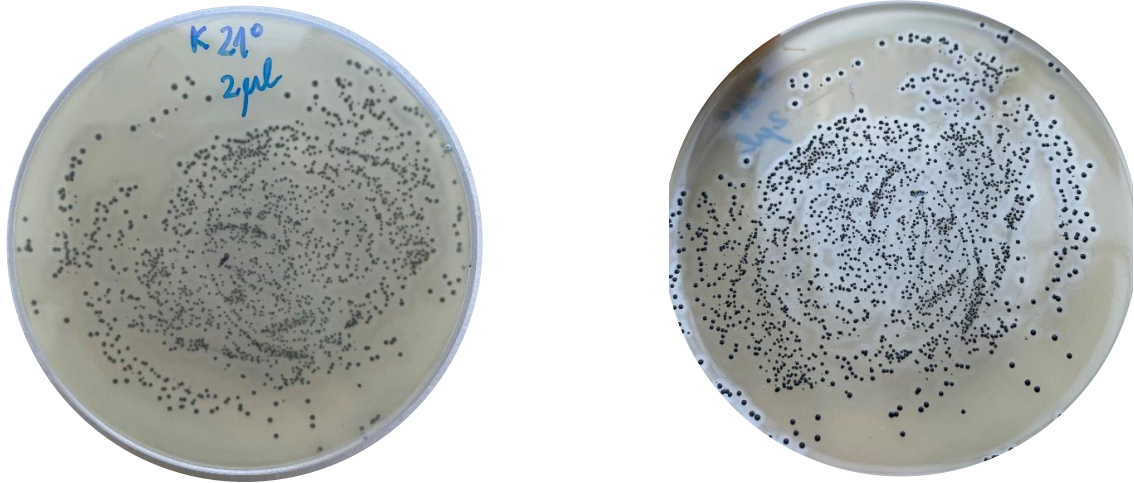


Tablica 6. Prikaz ukupnog broja poraslih bakterija u proteinskim otopinama s dodatkom *S. aureus* tijekom inkubacije od deset dana na temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C.

| 10. DAN    | Broj bakterija (CFU/ml)  |                        |                          |
|------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
|            | 4 °C                     | 21 °C                  | 37 °C                    |
| Koncentrat | $2,8 \times 10^3$ CFU/ml | $8 \times 10^5$ CFU/ml | $6,4 \times 10^5$ CFU/ml |
| Izolat     | $1 \times 10^5$ CFU/ml   | $2 \times 10^6$ CFU/ml | $3,4 \times 10^5$ CFU/ml |
| Hidrolizat | 0 CFU/ml                 | 0 CFU/ml               | 0 CFU/ml                 |



Slika 18. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravcima proteinskih koncentrata nakon deset dana izlaganja temperaturama od 4 °C i 37 °C.



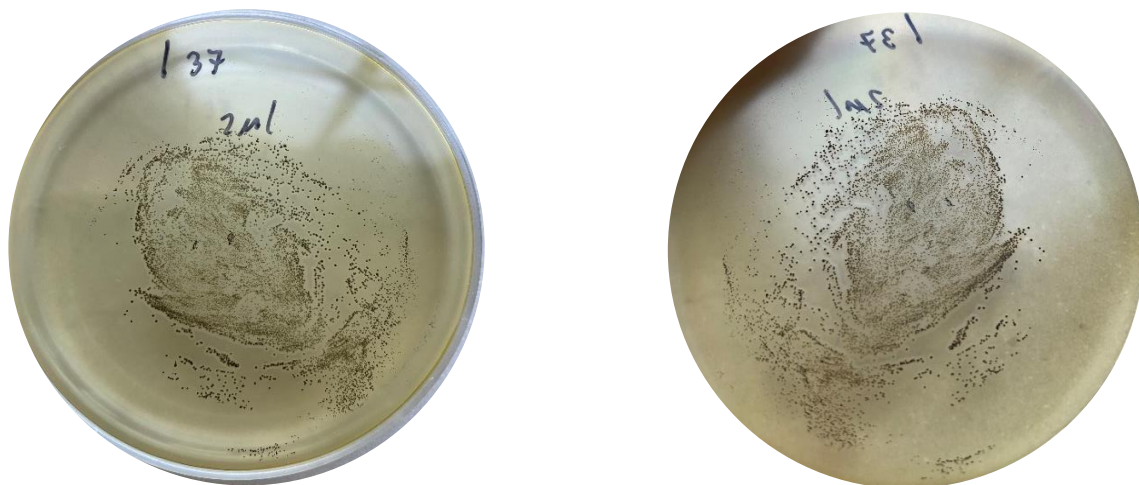
Slika 19. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog koncentrata nakon deset dana izlaganja temperaturi od 21 °C.



Slika 20. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog izolata nakon deset dana izlaganja temperaturi od 4 °C.



Slika 21. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog izolata nakon deset dana izlaganja temperaturi od 21 °C.



Slika 22. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog izolata nakon deset dana izlaganja temperaturi od 37 °C.

Tablica 7. Prikaz ukupnog broja poraslih bakterija u proteinskim otopinama s dodatkom *S. aureus* tijekom inkubacije od trinaest dana na temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C.

| 13. DAN    | Broj bakterija (CFU/ml)  |                          |                        |
|------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
|            | 4 °C                     | 21 °C                    | 37 °C                  |
| Koncentrat | $2 \times 10^3$ CFU/ml   | $7,6 \times 10^5$ CFU/ml | $6 \times 10^5$ CFU/ml |
| Izolat     | $1,3 \times 10^5$ CFU/ml | $2,4 \times 10^6$ CFU/ml | $6 \times 10^5$ CFU/ml |
| Hidrolizat | 0 CFU/ml                 | 0 CFU/ml                 | 0 CFU/ml               |



Slika 23. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog koncentrata nakon trinaest dana izlaganja temperaturi od 4 °C.

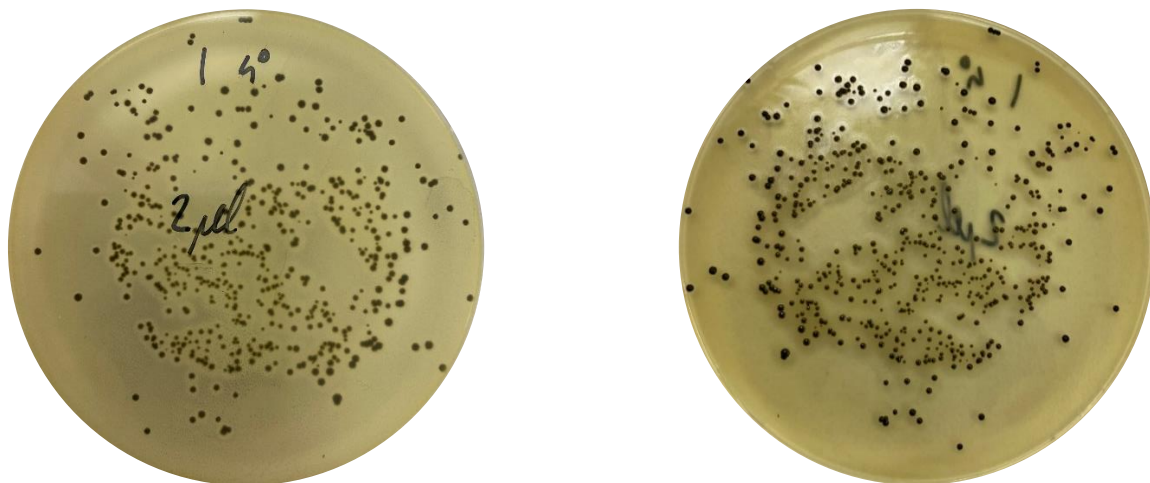




Slika 24. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog koncentrata nakon trinaest dana izlaganja temperaturi od 21 °C.



Slika 25. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog koncentrata nakon trinaest dana izlaganja temperaturi od 37 °C.



Slika 26. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog izolata nakon trinaest dana izlaganja temperaturi od 4 °C.



Slika 27. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog izolata nakon trinaest dana izlaganja temperaturi od 21 °C.

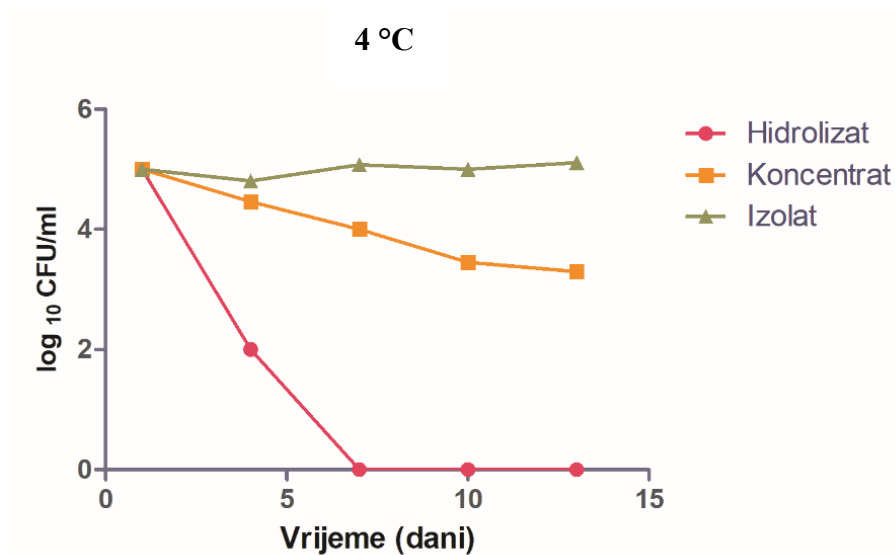


Slika 28. Pozitivan porast bakterije *S. aureus* u pripravku proteinskog izolata nakon trinaest dana izlaganja temperaturi od 37 °C.

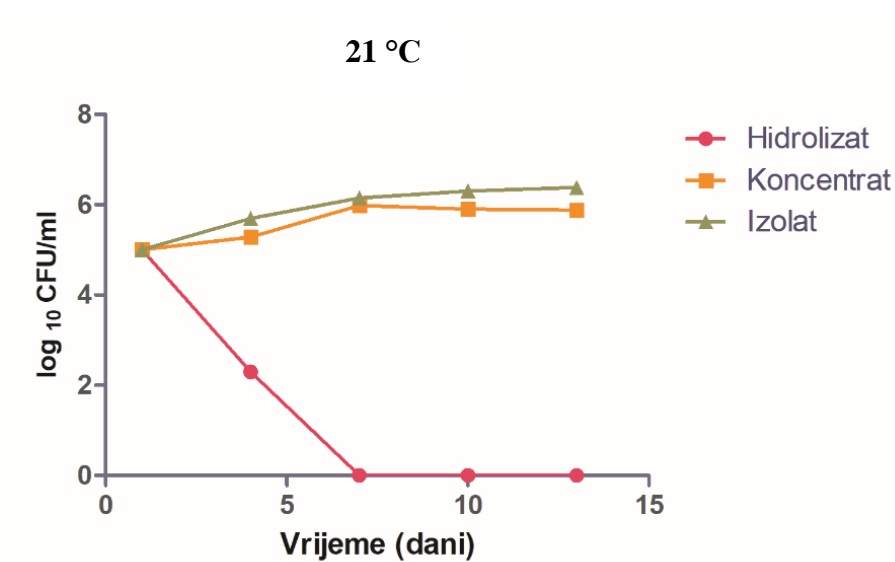
Iz prethodnih tablica i slika, evidentno je da je pri svim temperaturama zabilježen značajan pad ukupnoga broja bakterije *S. aureus* u kontaminiranom proteinskom hidrolizatu. Dobiveni rezultati ukazuju na to da je proteinski hidrolizat nepovoljan medij za rast i razmnožavanje bakterije *S. aureus*.

Unutar suspenzije proteinskih izolata i koncentrata bakterija je pokazala znatno bolju sposobnost razmnožavanja. Pri 4 °C popraćen je postepeni pad broja bakterija u proteinskom koncentratu dok su u proteinskome izolatu bakterije pokazale značajno bolju sposobnost preživljavanja.

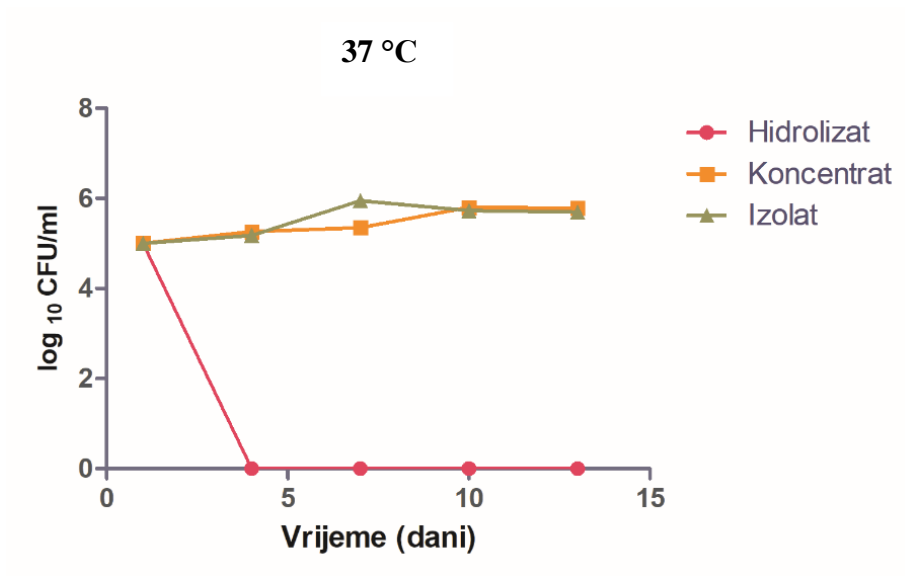
Krivulja rasta bakterije *S. aureus* u suspenziji proteinskog izolata (Slika 9.) pri temperaturi od 21 °C prikazuje logaritamski porast. Takvi rezultati ukazuju na povoljne uvjete medija i temperature za razmnožavanje testirane bakterije. Unatoč pozitivnom porastu broja bakterija unutar prvih nekoliko dana istraživanja, u proteinskim koncentratima se na kraju ipak počela ostvarivati blaga stagnacija po pitanju broja bakterija u jednome mililitru. Temperatura od 37 °C nedvojbeno stvara slične uvjete kao i temperatura od 21 °C, iako je preživljavanje bakterije otežano.



Slika 29. Kinetika rasta *S. aureus* u proteinskim pripravcima tijekom 15 dana na temperaturi od 4 °C.



Slika 30. Kinetika rasta *S. aureus* u proteinskim pripravcima tijekom 15 dana na temperaturi od 21 °C.



Slika 31. Kinetika rasta *S. aureus* u proteinskim pripravcima tijekom 15 dana na temperaturi od 37 °C.

## 5. RASPRAVA

Svaki mikroorganizam zahtijeva određene uvjete za rast i razmnožavanje u nekome uzorku. Na samome početku eksperimentalnog dijela istraživanja, proteinskim prahovima je dodana sterilizirana voda čime se udio vode u uzorcima znatno povećao te je na taj način stvoren prvi pogodan parametar za daljnji razvoj bakterije.

Drugi parametar koji doprinosi razvoju bakterije je sastav proteinskih prahova. Prema prethodno navedenim nutritivnim vrijednostima (Tablica 1., Tablica 2., Tablica 3.), proteinski prahovi sadrže različitu energetske vrijednosti i količinu makronutrijenata na 100g/25g praha. Iz tablica se može iščitati da su energetske vrijednosti proteinskih prahova veće što je udio ugljikohidrata i masti veći. Razlog tomu je što su ugljikohidrati, zajedno s mastima, glavni izvori energije. Posebnost ugljikohidrata je ta što su građeni od šećera neophodnih za rast mikroorganizama. Budući da proteinski hidrolizati sadrže minimalan udio šećera možemo reći da je slabije razmnožavanje bakterije *S. aureus* na taj način opravdana jer bakterije nisu imale dovoljno energije za preživljavanje (8).

Dodatan faktor koji uvjetuje razmnožavanju bakterija je temperatura. Osim kod psihrofila, niže temperature dovode do usporavanja metabolizma bakterija i otežavanja njihovog razvoja zbog čega je kinetika rasta bakterije *S. aureus* u svim proteinskim uzorcima pri temperaturi hladnjaka slabije izražena.

Vlastiti rezultati istraživanja pokazuju da je nakon trinaest dana izlaganja proteinskih pripravaka koncentrata i izolata s dodatkom bakterije *S. aureus* na temperaturama od 4 °C, 21 °C i 37 °C, broj bakterije u većini ostao iznad od 10<sup>5</sup> CFU/ml. Minimalna količina od 10<sup>5</sup> bakterija u 1 ml napitka ili 1 g hrane, dovoljna je za uzrokovanje stafilokokne intoksikacije enterotoksinima bakterije (9).

Primjer takve intoksikacije bio bi moguć ukoliko sportaš prilikom treninga u teretani kontaminira čep bočice proteinskog napitka preko kapljica znoja, ručnika, stafilokoknih apscesa na koži ili ruku kojima je prethodno dirao kontaminirane sprave bakterijom *S. aureus*. Zatvaranjem bočice kontaminiranim čepom, bakterija se može vrlo brzo prošiti na unutrašnji dio grla bočice i time dospjeva u proteinski pripravak.

Osim navedene kontaminacije proteinskih pripravaka bakterijom *S. aureus*, u nekim istraživanjima pokazalo se prisustvo bakterije u uzorcima mlijeka.

Jedan od mogućih uzroka kontaminacije mlijeka je zaraženo vime. Prodiranjem patogenih stafilocoka do vime muzne životinje stvaraju se upalne reakcije poznate kao mastitis. Na pojavu mastitisa utječu higijenski uvjeti u kojima se provodi mužnja. Ukoliko na površini vimena ili na stroju za mužnju životinja postoje patogene bakterije poput pozitivnih stafilocoka, velike su mogućnosti narušavanja kvalitete i mikrobiološke čistoće izlučenoga mlijeka. Drugi izvor kontaminacije mlijeka je čovjek. Kao i kod proteinskih pripravaka, prisutnost stafilocoka na koži čovjeka omogućava kontaminaciju mlijeka naročito u slučajevima stafilokoknih infekcija kada je izvor stafilocoka osiguran (10). Navedeni načini kontaminacije mlijeka preduvjet su za nastajanje stafilokoknih intoksikacija prilikom konzumacije mlijeka ili mliječnih proizvoda nastali preradom kontaminiranog sirovog mlijeka.

## 6. ZAKLJUČAK

Zaključci provedenog istraživanja su:

- prilikom tjelesnih aktivnosti obavezno je voditi računa o osobnoj higijeni
- u slučaju sumnje na kontaminaciju proteinskog napitka najbolje čuvati pripravak na temperaturi hladnjaka zbog slabijeg razmnožavanja bakterije
- kinetika rasta bakterije *S. aureus* najniža je u proteinskim hidrolizatima te ih zbog toga smatramo najsigurnijima za konzumiranje tijekom povećane tjelesne aktivnosti
- kod konzumiranja kontaminiranih proteinskih pripravaka moguće su stafilokokne intoksikacije



## 7. LITERATURA

1. John E. McMurry, C. A. Hoeger, V. E. Peterson, David S. Ballantin. 7th edition Fundamentals of General, Organic, and Biological Chemistry; 2012
2. Atkins, R., Dr. Atkins Diet Revolution, Bantam Books, 1990.
3. Xavier Bigard , Nutrition in sports, 2020 May. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
4. Bulatović M.Lj., Rakin M.B., Mojović Lj.V., Nikolić S.B., Vukašinović Sekulić M.S., Đukić Vuković A.J. Sirutka kao sirovina za proizvodnju funkcionalnih napitaka. Hemijska industrija 66 (4) 567–579. 2012 Dostupno na: <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0367-598X/2012/0367-598X1200009B.pdf>
5. Božanić R., Tratnik Lj. Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga 2012. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/605158>
6. Herceg Z., Režek A. Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. Mljekarstvo 2006. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/8414>
7. Smilja Kalenić i sur. Medicinska mikrobiologija , Zagreb: Mediciska naklada; 2013
8. Adams, D. W., and Errington, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. Nat. Rev. Microbiol. 7(9):642–53. 2009
9. Albert Marinculić, Boris Habrun, Ljubo Barbić, Relja Beck: Biološke opasnosti u hrani, Osijek, 2009 Hrvatska agencija za hranu. Dostupno na: <https://www.hah.hr/pdf/Prirucnik%20bioloske%20opasnosti.pdf>
10. Asperger , H., Veterinar Medizinische Universität, Wien, ünke Bahn-gasse 11, A-1030 Wien, Austria Specijalno izdanje broj 9405: Staphylococcus aureus. Mljekarstvo 45 (2) 125-144. 1995. Dostupno na: <file:///C:/Users/angel/AppData/Local/Temp/IDF-1.pdf>

## **8. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNNE INFORMACIJE:**

- Ime i prezime: Anamaria Girotto
- Spol: Ž
- Datum i mjesto rođenja: 16.02.1999., Rijeka
- Državljanstvo: Hrvatica
- E-mail: [anam.girotto@gmail.com](mailto:anam.girotto@gmail.com)

### **OBRAZOVANJE:**

- Talijanska osnovna škola „Dolac“
- Glazbena škola Ivana Matetića Ronjgova Rijeka
- Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka – opća gimnazija
- Medicinski fakultet u Rijeci - preddiplomski sveučilišni studij Sanitarno inženjerstvo

### **RADNO ISKUSTVO:**

- Rad u mjenjačnici i turističkoj agenciji, rad u trgovinama odjeće i namirnica, administrativni poslovi
- Nastavni Zavod za javno zdravstvo PGŽ – ispomoć na COVID-19 odjelima

### **STUDENTSKE AKTIVNOSTI:**

- Sudjelovanje na kongresima, konferenciji i simpoziju: „Sanitas“, „NeuRi“, „SanMo“, „Prevencijom do kulture nenasilja“.
- Studentski rad i obuka na znanstvenim projektima na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju na Medicinskom fakultetu u Rijeci pod vodstvom predstojnika prof. dr.sc. Roberta Domitrovića, i dr. sc. Ive Potočnjak.

### **JEZICI:**

- Materinski jezik: Hrvatski
- Ostali jezici: Talijanski, Engleski

**VJEŠTINE:**

- Računalne vještine: Microsoft Office<sup>TM</sup>, Google dokumenti, tablice, prezentacije
- Znanje u fitness-u
- Organizacija, snalažljivost, kontinuirano učenje, multitasking