PRISUTNOST MIKROORGANIZAMA U MESNIM PROIZVODIMA DOMAĆE PROIZVODNJE

Brkić, Evita-Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:005695

Rights / Prava: Attribution 4.0 International/Imenovanje 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-04**

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Evita-Lara Brkić

PRISUTNOST MIKROORGANIZAMA U MESNIM PROIZVODIMA DOMAĆE PROIZVODNJE

Završni rad

Rijeka, 2022.

SVEUČULIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Evita-Lara Brkić

PRISUTNOST MIKROORGANIZAMA U MESNIM PROIZVODIMA DOMAĆE PROIZVODNJE

Završni rad

Rijeka, 2022.

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

Završni rad obranjen je dana 5.7.2022. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing.

2. izv. prof. dr. sc. Darinka Vučković dr. med.

3. izv. prof. dr. sc. Marin Tota, mag. pharm.

Rad ima _stranica, _slika, _tablica, _literaturnih navoda

ZAHVALA

Veliku zahvalu, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Mateja Ožanič, na prenesenom znanju i vodstvu. Hvala Vam na nesebičnoj podršci, izdvojenom vremenu i uloženome trudu te savjetima koji su mi omogućili izradu završnog rada.

Također zahvaljujem se Valentini Marečić i svim drugim djelatnicima zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju, koji su bili susretljivi tijekom izvršavanja eksperimentalnog dijela završnog rada.

Naposljetku, najveću zahvalu dugujem svojim roditeljima, sestri i dečku, koji su mi bili beskrajna potpora i oslonac tijekom studiranja. Hvala što ste uvijek vjerovali u mene.

Evita-Lara Brkić

SAŽETAK

Domaći mesni proizvodi su mesne prerađevine koje su podvrgnute procesu usitnjavanja, soljenja, sušenja na zraku ili dimljenju. To su proizvodi kod kojih je moguća kontaminacija prilikom prerade, ali već i tijekom procesa klanja na što ponajviše utječe ljudski faktor.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti mikrobiološku ispravnost kobasica i mljevenog mesa, koji su čuvani pri različitim temperaturama. Praćena je kinetika rasta bakterija pri dvjema temperaturama, pri temperaturi od 4 °C i temperaturi od 23 °C, tijekom razdoblja od 15 dana. Određeni su sljedeći mikrobiološki parametari: porast enterokoka, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *B.cereus*, *Lysteria* spp., kvasaca i plijesni.

Rezultati su pokazali da je ukupni porast bakterija kod slavonske ne vakumirane i vakumirane kobasice zadovoljavajući i da je kao takva kobasica mikrobiološki ispravna. Porast bakterija znatno je veći kod ne vakumirane kobasice u odnosu na vakumiranu pri temperaturi od 4 °C.

Međutim, porast bakterija praćen kod istarske ne vakumirane i vakumirane kobasice nije zadovoljavajući, kobasica nije mikrobiološki ispravna. Također, veći porast bakterijskih kolonija zabilježen je kod ne vakumiranih istarskih kobasica u odnosu na vakumirane pri temperaturi od 4 °C.

Utvrđeno je da je mikrobiološka kakvoća mljevenog mesa nezadovoljavajuća i kao takvo meso nije pogodno za uporabu.

ABSTRACT

Home made meat products are meat products that have been subjected to the process of mincing, salting, air drying or smoking. Contamination of these products is possible during processing, but also during the slaughter process, which is mostly influenced by human factors.

The aim of this study was to determine the microbiological safety of sausages and minced meat, which were stored at different temperatures. Bacterial growth kinetics were monitored at two temperatures, at 4 °C and 23 °C, for a period of 15 days. The following microbiological parameters were determined: growth of *Enterococcus*, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *B.cereus*, *Lysteria* spp., yeasts and molds.

The results showed that the overall growth of bacteria in Slavonian non - vacuumed and vacuumed sausages is satisfactory and that as such the sausage is microbiologically correct. Growth of bacteria is significantly higher in non-vacuumed sausage compared to vacuumed at 4 °C.

However, the growth of bacteria observed in Istrian non-vacuumed and vacuumed sausages is not satisfactory, hence the sausage sample is not microbiologically correct. Further, significantly higher bacterial load was obtained in non-vacuumed Istrian sausages compared to vacuumed ones at a temperature of 4 ° C.

The microbiological quality of minced meat was found to be unsatisfactory and as such meat is not suitable for use.

Sadržaj

1.UVOD 1
1.1. Kontaminacija mesa 1
1.2. Sistematizacija mesnih proizvoda 2
1.3. Mikroorganizmi u kontaminiranom mesu 5
1.3.1.*Salmonella* 5
1.3.2.*Escherichia coli* 5
1.3.3.*Bacillus* 6
1.3.4.*Staphylococcus* 6
1.3.5.*Enterococcus* 7
1.3.6.*Listeria* 7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 8
3. MATERIJALI I METODE 9
3.1. Materijali 9
3.2. Laboratorijski pribor i oprema 9
3.3. Uzorci kobasica 9
3.4. Priprema uzorka 10
3.5. Kinetika rasta bakterija u uzorcima 10
3.6. Podloge 11
3.7. Potvrdni testovi 12
3.8. Statistička obrada podataka 13
4. REZULTATI 14
4.1. Dokazivanje i određivanje broja bakterija u uzorcima 14
4.1.1. Kobasice 14
4.1.2. Mljeveno meso 19
5. RASPRAVA 22
6. ZAKLJUČCI 25
7. LITERATURA 26
8. POPIS SLIKA 27
8. ŽIVOTOPIS 29

1.UVOD

Proizvodi koji su korišteni u istraživanju prikupljeni su iz domaćinstava koji svake godine provode klanje, dalje prerađuju mesni proizvod te ga kasnije konzumiraju. Prema pravilniku o mesnim proizvodima domaći mesni proizvodi definiraju se kao proizvodi životinja koje su podvrgnute klanju, pri čemu se za konačni proizvod koristi mišićno tkivo, masno tkivo, iznutrice i usitnjeno meso, otkošteno meso i kosti te razni sastojci (1). Proizvodi se zatim podvrgavaju različitim postupcima obrade poput otkoštavanja, usitnjavanja, soljenja, hlađenja, zamrzavanja ili dimljenja. Skupine životinja koje se najčešće koriste za proizvodnju mesa su govedo, svinja i perad te manje meso bivola, ovaca i koza (2). Meso je namirnica bogata vodom, proteinima, ugljikohidratima, bjelančevinama, mastima, mineralnim tvarima, organskim kiselinama, anorganskim kiselinama, vitaminima i enzimima. Kao takvo, meso je idealna namirnica za rast i razvoj mikroorganizama, a nepravilna obrada i skladištenje mogu dovesti do narušavanja njegove kvalitete.

1.1. Kontaminacija mesa

Postupci koji mogu dovesti do kontaminacije mesa su mnogobrojni. Ponajprije, kvaliteta mesa ovisna je o načinu tretiranja domaćih životinja za vrijeme tovljenja. Potrebno je voditi računa o redovitoj deratizaciji prostora, načinju skladištenja hrane, dostupnošću pitke vode te higijeni životinje i njene okoline. Nadalje, meso se može kontaminirati za vrijeme klanja. Potrebno je voditi računa o tome da se životinja neposredno prije samog čina klanja ne dovodi u stanje stresa, što u konačnici uvelike može utjecati na mesni proizvod. Također veliku opasanost predstavlja i sam čovjek, koji svojim higijenskim navikama i neopreznošću može dovesti u pitanje mikrobiološku kakvoću mesa.

Koža je glavni izvor mikroorganizama i kao takva može kontaminirati meso ukoliko se pravilno ne uklanja. Mikroorganizmi se ne prenose samo izravno s kože na meso, već se prenose i preko ruku osoba koje to meso obrađuju, ukoliko ne paze na higijenu prilikom samog procesa skidanja kože. Aerosol se također može kontaminirati bakterijama s kože, što isto tako doprinosi povećanju mikroba na samom mesu. Postupak uklanjanja kože razlikuje se s obzirom na vrstu životinja. Naime, koža svinje i peradi se ne uklanja nego se prelijeva vrućom vodom. Kasnijim postupcima „šurenja“ dodatno se smanjuje koncentracija mikroba na koži. Iznimno je bitno sve dijelove kože temeljito toplinski obraditi kako ne bi došlo do kontaminacije mišićnog tkiva.

Kontaminacija mesa moguća je i procesom evisceracije odnosno vađenjem utrobe. Proces je to koji podrazumijeva odvajanje masti s mišićnog tkiva, odvajanje glave i nogu te crijeva i iznutrica (jezik, srce, bubrezi, jetra i pluća). Najčešće do kontaminacije dolazi uslijed probijanja ovojnice crijeva čiji sadržaj dolazi u dodir s ostalim organima i mišićnim tkivom, iznimnu opasnost predstavlja i feces koji zaostaje unutar probavnog sustava. Ovaj korak je vrlo važan u samom procesu klanja i treba mu se pristupiti savjesno i sa velikom opreznošću. Crijeva životinje nisu isključivo potencijalni izvor kontaminacije, ona se mogu obraditi na specifičan način i koristiti u svrhu punjenja, za izradu kobasica (2). Veliku važnost treba posvetiti priboru i posuđu koje se upotrebljava tijekom postupka klanja, mjestima na kojima se ostavljaju te načinu na koji se taj pribor čisti ukoliko dođe u kontakt sa dijelom životinje koji predstavlja opasnost od kontaminacije.

1.2. Sistematizacija mesnih proizvoda

Dijelovi mesa spremaju se i zamrzavaju, ali se mogu i preraditi. U ovom završnom radu analizirano je mljeveno meso i meso koje je korišteno za izradu kobasica. Prema Pravilniku o mesnim proizvodima, mljeveno je meso ono koje je prošlo proces usitnjavanja, kojem postotak soli ne prelazi količinu od 1 % i ne sadrži veće količine masti u svom sastavu (1). Mljeveno meso naknadno se sprema u zamrzivač (-18 °C), na temperaturu niža od optimalne za rast i razvoj mikroba pa se na taj način inhibira njihov porast. Ovim procesom usporeno je kvarenje mesa tj. produljena mu je trajnost. Mljeveno meso dobiva se pomoću mašine za mljevenje (Slika 1.), u koje se stavljaju veći komadi mesa, usitnjavaju se te pod pritiskom guraju van kroz otvore na kraju mašine. Usitnjavanje se postiže pomoću zvjezdastih noževa unutar mašine i potiskivanja mesa pomoću rotirajućeg „puža“ kroz ploču za mljevenje. Ovisno o željenoj veličini konačnog proizvoda postoje različite veličine otvora na ploči za mljevenje. U domaćinstvima se najčešće koriste mašine sa jednim zvjezdastim nožem dok se u industrijskoj proizvodnji koristi više njih. Danas su češće u uporabi mašine koje imaju ugrađen elektromotor pa se meso ili masni dijelovi mogu konstantno dodavati u posudu na vrhu mlinca gdje ih rotirajući puž automatizmom gura prema ploči za mljevenje (Slika 2.).

Slika 1. Mašina za mljevenje mesa

(izvor: iz vlastite zbirke)

Slika 2. Automatska mašina za mljevenje mesa

(izvor: iz vlastite zbirke)

Istim pravilnikom definirana je kobasica. Proizvod je to koji sadrži masnoće, krv, usitnjeno meso koje je prethodno otkošteno, iznutrice i određene začine, koji su pomiješani i punjeni u umjetne ili prirodne ovitke (1). Mljeveno meso dobiveno ranije opisanim postupkom izdvaja se i važe, a ovisno o izvaganoj količini mesa dodaje se određen postotak soli, slatke i ljute crvene paprike, češnjak koji je protisnut ili prokuhan, papar te ponekad i bijelo vino ako se radi o „kulenovim sekama“. Meso kojim se pune kobasice je meso vratine, buta i kare, zajedno sa svim prisutnim masnoćama. Kulenova seka i kulen su proizvodi u koje se dodaje isključivo meso buta, koje se dodatno čisti od svih masnoća, žilica i opni, te se naknadno dozira određen postotak čiste masnoće (slanine) koja se uzima sa leđa životinje. Za punjenje običnih

kobasica koriste se vratina, but i kare te se meso čisti od žilica i opni, da sadržaj bude što kvalitetnije. U proizvodu se ostavljaju sve sadržane masnoće, a po potrebi se dodaje i više masnoća. Uređaj kojim se pune kobasice naziva se top za punjenje kobasica (Slika 3.). Topovi za punjene razlikuju se volumenom mesa kojeg mogu zaprimiti, najčešće su to topovi od deset litara. Stroj radi na principu pomičnog klipa, klip potiskuje meso do cilindra na dnu koji potom potiskuje meso kroz cijev za punjenje direktno u crijevo. Promjer cijevi za punjenje kobasice ovisi o debljini kobasice koju želimo.

Slika 3. Top za punjenje kobasica

(izvor: iz vlastite zbirke)

Nedostatak kisika smanjuje kvarenje proizvoda i produžuje njegovu trajnost, kao i sušenje-zrenje te dimljenje koje slijedi. Sazrijevanje kobasica odvija se u posebnim komorama takozvanim „pušnicama“. Te komore zahtijevaju posebne uvijete za zrenje/dimljenje kobasica. Najbitniji parametri su veliki protok zraka, temperatura i vlažnost, stoga je bitno pripaziti u koje doba godine se odvija proces klanja da se zadovolje ovi uvjeti koji bitno utječu na organoleptička svojstva namirnice (3). Na koncentraciju mikroorganizama u ovim proizvodima utječe aktivitet vode u mesu, pH vrijednost mesa, temperatura, količina začina te uvjeti skladištenja, aerobni ili anaerobni. Stvaranje anaerobnih uvjeta provodi se uklanjanjem zraka iz pakiranja odnosno vakumiranjem. Proces vakumiranja podrazumijeva pakiranje mesa u

plastične vrećice iz kojih se potom izvlači sav preostali zrak nakon čega se gornji dio vrećice zapečati. Na taj način usporava se promjena boje mesa, čuva se kvaliteta proizvoda, a prisutne bakterije iskorištavaju malu količinu kisika koja je preostala u ambalaži odnosno u samom mesu, no ona je nedostatna za njihov razvoj.

1.3. Mikroorganizmi u kontaminiranom mesu

Mikroorganizmi koje pronalazimo u mesu većinom su bezopasni, no neki od njih mogu biti potencijalni patogeni. Bakterije *Pseudomonas*, *Staphylococcus* i *Micrococcus* mikrobi su koje se prirodno nalaze na koži same životinje. Na koži su također prisutni plijesni i kvasci, a na prisutnost i sastav svih mikroba na koži ponajprije utječu okolišni čimbenici. Problem predstavljanju ponajprije *Enterobacteriaceae*, i gram pozitivne bakterije, potencijalni uzročnici kontaminacije mesa. Stoga je otkrivanje ovih patogena od velike važnosti u kontroli i kvaliteti mesa (4).

1.3.1.*Salmonella*

Salmonela je gram-negativan pokretni štapić, pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Poznate su dvije vrste *S.enterica* i *S.bongori*, a razvrstavaju se u 2200 serotipova. Prirodno stanište ove bakterije su voda, tlo i probavni sustav različitih životinja i čovjeka. Bakterija je to koja ne fermentira laktozu, ne stvara H_2S, ne stvara citokrom-oksidazu i reducira nitrate do nitrita. Za izolaciju ove bakterije iz hrane koriste se različite selektivne i diferencijalne podloge. Od selektivnih podloga najčešće korištene su XLD, MAC i SS agar. *Salmonella* je bakterija koja je izrazito opasna za ljude, a serotipovi koji su adaptirani na čovjeka su *S.Typhi* i *S.Paratyphi* A, B, C. Čovjek se najčešće zarazi putem bolesnika ili kliconoše. Manifestira se na 3 načina, u obliku gastroenteritisa, crijevne groznice i septičkog sindroma. *S.Enteritidis* i *S.Typhimurium* najčešći su uzročnici gastroenteritisa. Prvi simptom ove bolesti je mučnina iza koje slijedi proljev i povraćanje popraćeno bolovima u trbuhu. *S.Typhi* uzrokuje crijevne groznice ili trbušni tifus. Bakterija u tankom crijevu prodire u limfno tkivo od kud dospijeva u krvotok, pluća, slezenu. Specifična pojava svijetloružičastog osipa karakteristična je za crijevnu groznicu. Septički sindrom izaziva *S.Choleraesuis* i *S.Derby*. Ovo je oblik koji se najrjeđe pojavljuje.

1.3.2.*Escherichia coli*

E. coli je gram-negativan kokobacil koji pripada porodici *Enterobacteriaceae*. Najčešći je uzročnik crijevnih, urinarnih i sustavnih infekcija. Bakterija ne stvara spore, a neki sojevi posjeduju kapsulu. Nalazi se u probavnom sustavu, a može dovesti i do infekcije mokraćnog sustava. Bakterija posjeduje enzime za fermentaciju glukoze i laktoze, proizvodi indol iz

triptofana, ne stvara H_2S, te proizvodi CO_2. *E.coli* se koristi kao indikator fekalnog zagađenja te u uzorcima hrane ne smije biti pronađena niti jedna bakterija. Sojevi *E.coli* su: enteropatogena (EPEC), enterotoksična (ETEC), enteroagregacijska (EAEC), enteroinvazivna (EIEC) i najznačajnija enterohemoragična (EHEC). Bitno je izdvojiti ETEC koja je glavni uzročnik „dijareje putnika“, kao i EHEC koja je usko povezana sa nedovoljno termički obrađenim goveđim mesom. EHEC u težim slučajevima uzrokuje hemolitičko uremijski sindrom, a najčešći uzročnik je E.coli O157:H7. Infektivna doza je vrlo mala i iznosi 10-100 bakterija.

1.3.3.*Bacillus*

Bacillus je gram-pozitivna, aerobna bakterija koja pripada porodici *Bacillaceae*. U nepovoljnim uvjetima *Bacillus* stvara spore. One su otporne na sušenje, toplinu, hladnoću i dezinficijense. Stoga se apatogene vrste iz roda *Bacillus* koriste kao indikator u kontroli sterilizacijskih postupaka. Za kontaminaciju hrane značajna bakterija je *B.cereus*, koji se nalazi u tlu, hrani i vodi. Bakterija se ne uništava uobičajenom termičkom obradom, a razlikujemo dva oblika bolesti: emetički i dijarejalni. Emetički oblik poznat je kao oblik kratke inkubacije. Prilikom konzumacije hrane u organizam se unese termostabilni toksin koji vrlo brzo dovodi do povraćanja. Dijarejalni oblik očituje se dužom inkubacijom. Karakteristično je da se u organizam unesu bakterije koje tek naknadno u crijevima otpuštaju svoj termolabilan toksin. Kao simptom se najčešće pojavljuje proljev.

1.3.4.*Staphylococcus*

Staphylococcus je sferična fakultativno anaerobna gram-pozitivna bakterija. U mikroskopskom preparatu bakterije se grupiraju u nakupine poput grozdova. Bakterija je nepokretna i ne stvara spore, otporna je na toplinu i sušenje, te podnosi visoke koncentracije natrijevog klorida. Prirodno se nalazi na koži i mukoznoj membrani sisavaca i ptica. Patogenost ove bakterije se očituje u produkciji njenih toksina i enzima. Dokazivanje ovih bakterija temelji se na testovima koagulaze i katalaze. Sve bakterije roda *Staphylococcus* su katalaza pozitivne, no ono što izdvaja *S.aureus* od ostalih je koagulaza pozitivan test. Koagulaza negativni stafilokoki (CoNS) prirodno se nalaze u flori čovjeka i ne uzrokuju značajne infekcije (5). Najznačajniji koagulaza negativni stafilokoki su *S.epidermidis* i *S.saprophyticus*. Od patogena najznačajniji je *S.aureus* koji dovodi do stafilokoknog trovanja hranom (stafiloenterotoksemije). *S.aureus* česti je uzročnik bolničkih infekcija jer proizvodi enterotoksine, uzročnike alimentarnih intoksikacija, a i pokazuje rezistenciju prema antibioticima. Najčešće bolesti koje uzroku je su lokalne piogene infekcije i lokalizirane

infekcije s kožnim osipom – sindrom oparene kože. Bakterija se brzo razmnožava pa su simptomi vidljivi već nakon par sati.

1.3.5.*Enterococcus*

To su gram pozitivni koki. *Enterococcus* pripada bakterijama iz roda mliječne kiseline *Bacillota*. Normalno ih nalazimo u probavnom i spolnom sustavu kao dio normalne mikroflore. Najčešći uzročnici infekcija su *E. fecalis* i *E. faecium* koji uzrokuju preko 95 % infekcija uzrokovanih enterokokima. Najčešće su infekcije mokraćnog sustava, celulitis, infekcije rana, intraabdominalne infekcije, ali u slučaju da uđe u krvotok enterokok može izazvati i bakterijemiju.

1.3.6.*Listeria*

Unutar roda *Listeria* nalaze se gram-pozitivni štapići koji podnose vrlo niske temperature i na njima preživljavaju, a na temperaturi od 4 °C se i razmnožavaju. *L. monocytogenes* izrazito je rizična za određene skupine ljudi tzv. YOPI skupina – mladi, stari, trudnice i imunokompromitirani (Y-young, O-old, P-pregnant, I-immunocompromised) kod kojih dovodi do listerioze. Izvor infekcije ovom bakterijom predstavlja okoliš, mlijeko i mliječni proizvodi. Simptomi bolesti su slični gripi, a može dovesti do pojave meningitisa, pobačaja, preranog poroda i sepse. Zbog strogog mikrobiološkog standarda koji je određen visokom smrtnošću prouzrokovanom ovom bakterijom, ne smije se pronaći niti jedna kolonija u ispitivanoj hrani koja je spremna za konzumaciju.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološku ispravnost domaćih mesnih proizvoda koji su uzeti iz različitih domaćinstava, pripremljeni na različiti način te inkubirani pri temperaturama od 4 °C i 23 °C. Nadalje, cilj je bio utvrditi utječe li dodatak začina na količinu mikroorganizama u mljevenom mesu prilikom skladištenja pri prethodno navedenim temperaturama.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

- Hranjive podloge
    - XLD agar Biolife, Milano, Italija
    - TBX agar Biolife, Milano, Italija
    - VRBG agar, Biolife, Milano, Italija
    - SABOURAUND agar, Biolife, Milano, Italija
    - ALOA agar, Biolife, Milano, Italija
    - PEMBA agar, Biolife, Milano, Italija
    - BAIRD-PARKER agar, Biolife, Milano, Italija
    - Kvaščev ekstrakt, Biolife, Milano, Italija
    - Puferiranapeptonska voda (PPV)
- Uzorak 1 – slavonska ne vakumirana kobasica
- Uzorak 2 – slavonska vakumirana kobasica
- Uzorak 3 – istarska ne vakumirana kobasica
- Uzorak 4 – istarska vakumirana kobasica
- Uzorak 5 – nezačinjeno mljeveno meso
- Uzorak 6 – začinjeno mljeveno meso

3.2. Laboratorijski pribor i oprema

- Automatske pipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Automatske pipeta, Gilson, Middleton, SAD
- Inkubator BD 240, Binder, Gleisdor, Austrija
- Stakleno laboratorijsko posuđe (čaše od 200 ml, stakleni štapići, Erlenmeyerove tikvice od 500 ml)
- Plastični laboratorijski pribor (petrijeve zdjelice)
- Ostali laboratorijski pribor (metalne vilice i noževi, tarionik s tučkom, analitička vaga)

3.3. Uzorci kobasica

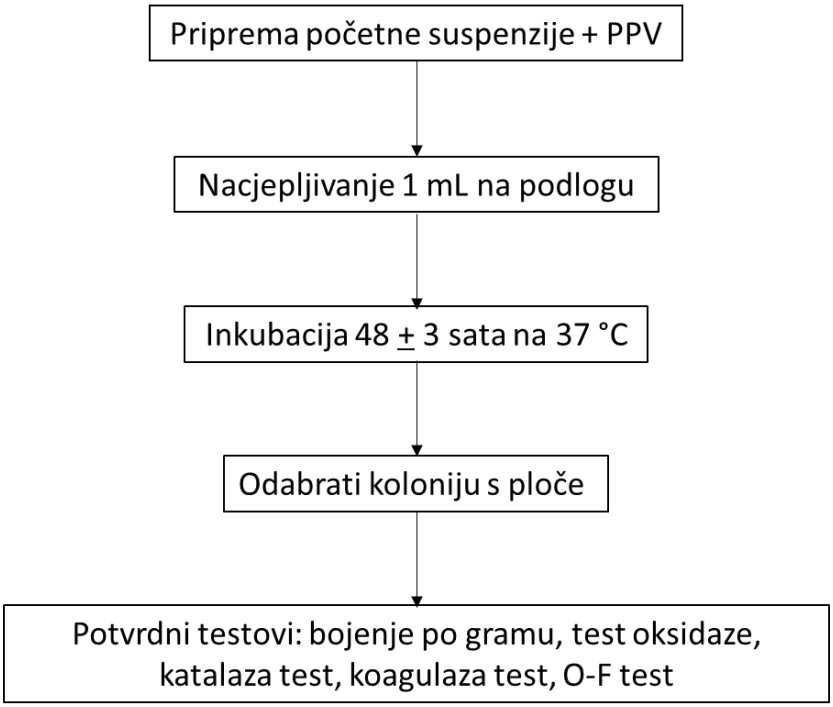
U ovom istraživanju korišteni su proizvodi iz tri različita domaćinstva. Sve vrste kobasica skladištene su na dva različita načina, vakumirano te u crijevnoj ovojnici. Prije analize, uzorci kobasica čuvani su na tamnom te pri temperaturi hladnjaka. Mljeveno meso se nakon klanja i dodatka začina izdvojilo u sterilne vrećice i naknadno se čuvalo u zamrzivaču.

3.4. Priprema uzorka

Uzorci u vakumiranim vrećicama pažljivo su otvoreni sterilnim škarama, izvađeni na sterilnu površinu i sterilnim nožem su prerezani po sredini. Sadržaj kobasice vađen je pomoću sterilne vilice i pincete, nakon čega je premješten u tarionik i dodatno usitnjen pomoću tučka. Nakon usitnjavanja i homogeniziranja uzorka u tarioniku, odvagana je količina od 25 g na analitičkoj vagi te je uzorak dodan u tikvicu sa zrncima. U tikvicu se zatim ulilo 225 ml peptonske vode te se zatvorila vatenim čepom, držeći tikvicu u ruci kružnim pokretima sadržaj tikvice se homogenizirao. Automatskom pipetom odpipetiran je 1 ml uzorka i prebačen u petrijeve zdjelice za određivanje ukupnog broja bakterija, dok se na ostale podloge nasađivalo po 100 µl. Svi uzorci inkubirani su pri 37 °C tijekom 48 h. Uzorci koji nisu bili vakumirani, razrezani su sterilnim nožem po sredini i slijedili su već ranije opisan proces pripreme uzorka.

3.5. Kinetika rasta bakterija u uzorcima

Porast broja bakterija pratio se u četiri vremenska razdoblja, u ukupnom periodu od 15 dana (dan 0, 5, 10 i 15). Svaki uzorak je nakon prve analize, provedene nultog dana, podijeljen na dva uzorka koja su čuvana pri temperaturi od 4 °C i 23 °C. Dalje je u periodima od 5 dana provođeno novo nasađivanje i bilježen je porast baterija.



Slika 4. Shematski prikaz određivanja i dokazivanja bakterija

(izvor: iz vlastite zbirke)

3.6. Podloge

XLD agar

XyloseLysineDesoxycholate (XLD), tj. ksiloza-lizin-dezoksikolatni agar proizvođača Biolife (Italija), selektivna je i diferencijalna podloga za izolaciju *Salmonella* spp. Medij sadrži saharozu, laktozu, ksilozu, žučne soli, natrij-tiosulfat, željezo-amonij-citrat te aminokiselinu lizin. Zbog taloženja željezovog sulfida u podlozi porast bakterije očituje se pojavom svijetlo crvenih kolonija sa crnim centrom.

VRBG agar

Violet Red Blue Glucose agar selektivna je podloga koja se koristi za dokazivanje bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*. Podloga sadrži žučne soli, kvaščev ekstrakt i pepton. Bakterijski rast potiču vitamini B kompleksa koji su sadržani u kvaščevom ekstraktu. Tamno ljubičast porast kolonija ukazuje na prisutnost enterobakterija u uzorku.

TBX

Podloga koja se koristi za dokazivanje *E. coli* u uzorku je Tryptone Bile X – glucuronide agar. Agar se priprema dodatkom 5-brom-4-klor-3-indol-beta-D-glukuronida (X-β-D glukuronid), žučnih soli i triptona. Ono što razlikuje porast *E. coli* od drugih koliformnih bakterija je β-D glukuronid jer ga ova bakterija apsorbira. Posljedica apsorpcije porast je plavo – zelenih kolonija.

Baird-Parker (BP) agar

Selektivna i diferencijalna podloga za izolaciju stafilokoka koji su pozitivni na koagulazu je BP agar. Podloga se priprema dodatkom litijevog klorida, kalijevog tulerita, glicin i natrijev piruvat. U podlozi je sadržan i žumanjak koji ovoj podlozi daje diferencijalna svojstva. Inhibicija ostalih mikroorganizama postiže se selektivnim svojstvima litij bromida i kalij telurija. Koagulaza-pozitivni stafilokoki reducirat će žumanjak, to se očituje pojavom prozirne halo zone oko kolonije. Kolonije rastu crno oboje, posljedica je to redukcije kalij telurija.

ALOA agar

Agar Listeria Ottaviani Agosti selektivna je i diferencijalna podloga za izolaciju *L. monocytogenes*. Zbog sadržaja antibiotika ceftazimida, litij klorida, polimiksina B, cikloheksamda i nalidiksične kiseline ova podloga je selektivna. Vrste roda *Listeria* sadrže enzim β-glukozidazu čime se postiže njihova diferencijacija. Zbog sadržaja supstrata L-α-

fosfatidilinozitola razlikujemo porast *L. monocytogenes* od ostalih *Listeria*. Porast zeleno plavih kolonija upućuje na pojavu *L.* spp., dok porast zeleno-plavih kolonija okruženih neprozirnom halo zonom upućuje na prisutnost *L. monocytogenes* u uzorku.

PEMBA

Podloga za dokazivanje i izolaciju *B. cereusa* iz uzorka je Pepton Egg Yolk Polymyxin B Bromothymol Blue Agar. Podloga se priprema dodatkom kazein peptona, D-manitola, natrijevog piruvata, natrijevog klorida, magnezijevog sulfata, natrijevog fosfata, kalijevog fosfata te bromotimol plavog pigmenta. *B. cereus* ne fermentira manitol na podlozi, ne snižava pH pa stoga ne mijenja boju agara. Pojavom nepravilnih, velikih i plavih kolonija potvrđuje se prisutnost *Bacillusa*.

Sabouraud agar

Selektivna i diferencijalna podloga za dokazivanje kvasca i plijesni je glukozni agar, Sabouraud. Specifičan je jer se inkubira 5 dana na 25 °C. Peptoni sadržani u agaru omogućuju rast kolonija, kao i glukoza koja je glavni izvor energije za sve mikroorganizme. Prisutnost kvasaca i plijesni očituje se porastom bijelih ispupčenih malih kolonija (6).

Kvaščev agar

Za određivanje ukupnog broja bakterija koristi se agar s kvaščevim ekstraktom. Podloga se priređuje miješanjem destilirane vode i praškastog uzorka, nakon čega se suspendira i kuha tijekom 10 min. Ukoliko je podloga ranije pripremljena i čuvana na temperaturi od 4 °C, mora se dodatno pripremiti zagrijavanjem i zatim hlađenjem na temperaturu od 44 – 47 °C. Tako rastopljena i polu ohlađena podloga prelije se preko uzorka i inkubira na 37 °C tijekom 72 sata.

3.7. Potvrdni testovi

Za dokazivanje bakterija porodice *Enterobacteriaceae* u uzorku korišteni su potvrdni testovi: test oksidazei O-F test. Test oksidaze zahtjeva korištenje malog komada filter papira koji se navlaži destiliranom vodom i neposredno nakon se pikira kolonija plastičnom ezom i nanese se na papirić te se doda kapljica reagensa. Pozitivan rezultat biti će pojava tamno plave boje na filter papiru. O-F test zahtjeva nasađivanje kolonije u epruvete s podlogom, ezom pikiramo jednu koloniju i ubodom do dna ju nasadimo u epruvetu. Za ovo ispitivanje potrebne su dvije epruvete, jedan uzorak prelijeva se parafinskim uljem do visine 1,5 cm radi stvaranja anaerobnih uvjeta, dok se drugi uzorak izlaže atmosferskom kisiku. Promjena boje podloge u žuto dokaz je fermentacije glukoze. Ukoliko je dobiveni rezultat oksidaza negativan i dokazano

je fermentiranje glukoze potvrđuje se prisutnost *Enterobacteriaceae* u uzorku (7). Za dokazivanje *E. coli* u uzorku korišten je potvrdni test bojanja po gramu i O-F test. Bojenje po gramu zahtjeva korištenje predmetnog stakalca na koji se kapne kap fiziološke otopine, ezom pikiramo koloniju i lagano dodirnemo rub kapljice i kružnim pokretima u obliku elipse razmažemo uzorak na stakalcu. Uzorak kratko ostavljamo da se osuši te ga fiksiramo na plameniku 3 puta. Nakon fiksiranja slijedi prelijevanje kristal violet bojom, drži se 1 minutu, nakon čega se ispire, slijedi prelijevanje lugolom koji se drži 1 min, stakalce se zatim ponovo ispere. Idući korak je ispiranje jod acetonom te prelijevanje safraninom koji djeluje 3 min. Preparat se ponovo ispere i osuši te je spreman za mikroskopiranje. *E. coli* je gram negativna bakterija i po gramu se boji crveno, bakterija ima tanki sloj peptidoglikana pa se uslijed dodatka alkohola ispire kristal violet (7). *L. monocytogenes*gram je pozitivna bakterija koja na ALOA agaru raste u obliku plavo-zelenih kolonija, pikiranjem jedne kolonije i provođenjem potvrdnih testova: reakcija katalaze, bojenje po Gramu, hemoliza i CAMP test, dokazujemo je u uzorku. *Listeria* se po gramu boji plavo, a karakteristično uzrokuje hemolizu na krvnom agaru. Bakterije roda *S. aureus* na Baird-Parker agaru rastu u obliku crnih kolonija, koje su sjajne i konveksne pritom okružene prozirnom zonom. Bakterija se dokazuje dodatnim testovima katalaze i koagulaze te bojenjem po gramu. Kako je *Staphylococcus* gram pozitivna bakterija bojenjem po gramu dat će ljubičasto obojenje. Pozitivan test na katalazu i koagulazu dokaz je prisutnosti *Staphylococcus aureus* u hrani. Dokazivanje *B. cereus* u uzorku provodi se nasađivanjem kolonija na krvni agar pri 30 °C tijekom 24 sata, nakon čega se prati pojava hemolize. Također *Bacillus* se dokazuje bojenjem po gramu – plavo obojene bakterije. Kvasce i plijesni specifični su za inkubaciju koja traje 5 dana, mikroskopiranjem plodnih struktura dokazujemo prisutnost istih u uzorku.

3.8. Statistička obrada podataka

Statistička obrada dobivenih podataka provedena je programom Statistica 12 (StatSoft Inc., SAD). Normalnost distribucije svih parametara je utvrđena. Uzorci koji su pokazali normalnu distribuciju analizirani su parametrijskim Student t - testom, a razina od $p<0,05$ smatrana je statistički značajnom i označena zvjezdicom (*).

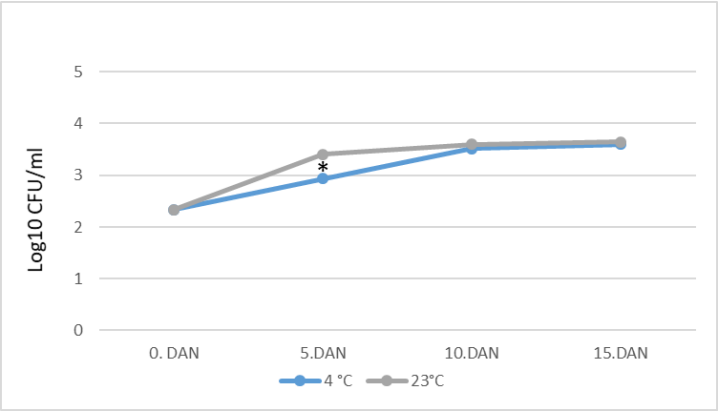
4. REZULTATI

Tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada ispitivana je mikrobiološka čistoća mesnih proizvoda, 4 vrste kobasica i dva uzorka mljevenog mesa, ovisno o uvjetima skladištenja. Prisutnost bakterija praćena je tijekom 15 dana, 0., 5., 10. i 15. dana. Analiza je provedena s obzirom na temperaturu i način skladištenja, a ispitivana je prisutnost ukupnog broja bakterija te bakterija iz roda *Salmonella, Escherichia, Listeria, Bacillus, Staphylococcus, Enterococcus* te kvasaca i plijesni.

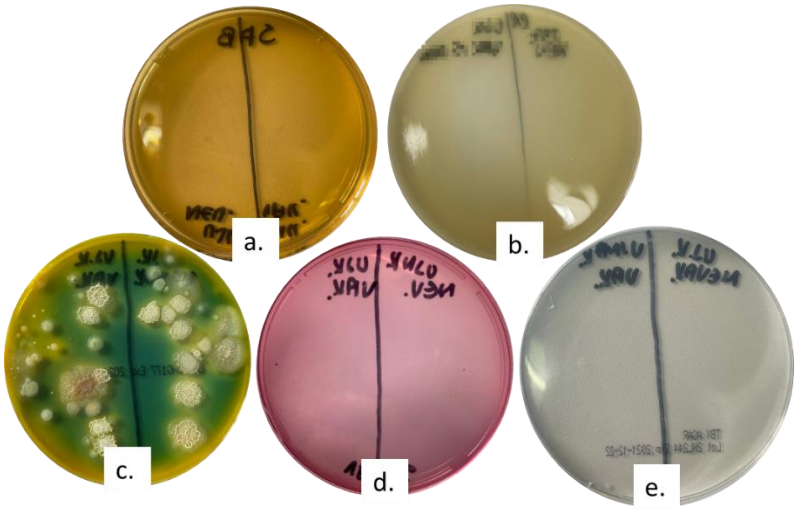
4.1. Dokazivanje i određivanje broja bakterija u uzorcima

4.1.1. Kobasice

Slika 5. prikazuje rezultate ukupnog broja bakterija dobivenih čuvanjem ne vakumirane slavonske kobasice (uzorak 1) na temperaturi hladnjaka i sobnoj temperaturi. U vremenskom razdoblju od 15 dana, broj bakterija bio je statistički značajno viši 5. dana u uzorku koji je čuvan pri temperaturi 23 °C u odnosu na uzorak koji je čuvan na temperaturi od 4 °C ($p<0.05$). Početni broj bakterija iznosio je $2x10^2$ CFU/ml. Broj kolonija kod uzorka inkubiranog pri 4 °C, nakon 5. dana, iznosio je $8,6x10^2$ CFU/ml, dok je prilikom čuvanja na 23 °C iznosio $2,5x10^3$ CFU/ml. Nadalje, prilikom čuvanja uzorka na 23 °C, desetog dana zabilježeno je $3,3x10^3$ CFU/ml. Bez obzira na temperaturu čuvanja, nakon 15 dana broj bakterija je bio isti u oba uzorka te je iznosio $4x10^3$ CFU/ml.



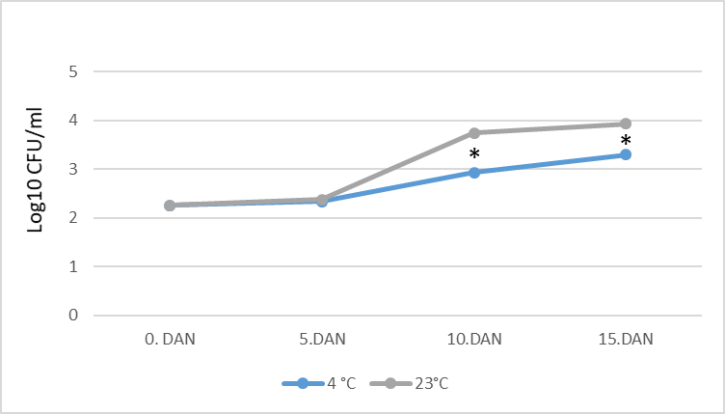
Slika 5. Prikaz kinetike rasta ukupnog broja bakterija u uzorku 1 ne vakumirane slavonske kobasice, tijekom 15. dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.0$).



Slika 6. Prikaz porasta bakterija u uzorku 1 (desna strana podloge) i uzorku 2 (lijeva strana podloge) na podlogama: a) Sabouraud agar, b) Baird Parker, c) PEMBA, d) VRBG, e) XLD

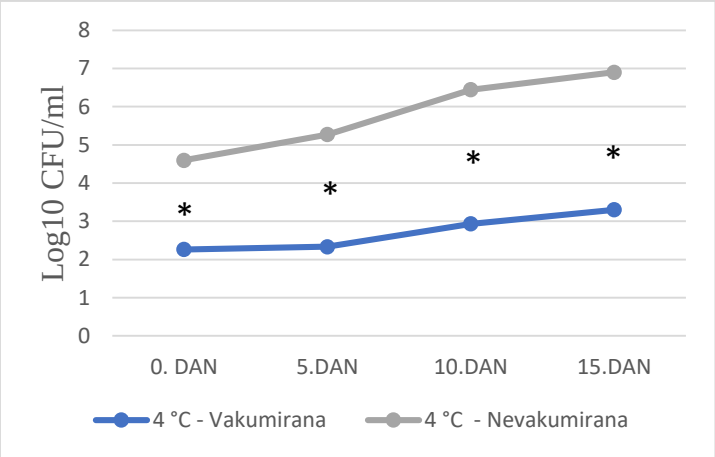
Porast bakterijskih kolonija na Sabouraud, BP, VRBG, XLD i TBX agaru nije zabilježen u navedenom razdoblju od 15 dana (Slika 6.). Porast bakterija zabilježen je na PEMBA selektivnoj podlozi, gdje je broj kolonija bio značajno veći pri temperaturi od 23 °C u odnosu na temperaturu od 4 °C. Stoga, prama Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu, prema normi HR EN ISO 6579 ovaj je uzorak zadovoljavajući.

Vakumirani uzorak slavonske kobasice (uzorak 2), izložen je istim uvjetima kao i prethodni uzorak te je čuvan tijekom 15 dana pri temperaturama od 4 °C i 23 °C. Podaci koji su prikazani na slici 7., pokazuju da je statistički značajna razlika u broju bakterija zabilježena 10. i 15. dana eksperimenta ($p<0.05$). Veći broj bakterija zabilježen je pri temperaturi od 23 °C u odnosu na temperaturu od 4 °C. Nultog dana broj bakterija iznosio je $1,8x10^2$ CFU/ml, dok je bakterijski broj nakon 5 dana pri temperaturi od 4 °C iznosio $2,1x10^2$ CFU/ml, a pri 23 °C iznosio je $2,4x10^2$CFU/ml. Porast kolonija nije zabilježen na ostalim hranjivim podlogama, stoga je prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu i Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu ovaj proizvod zadovoljavajuće mikrobiološke ispravnosti.



Slika 7. Prikaz kinetike rasta ukupnog broja bakterija u uzorku vakumirane slavonske kobasice (uzorak 2), tijekom 15 dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$).

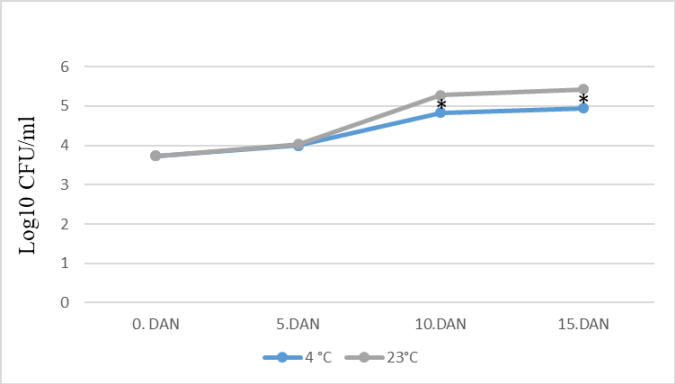
Dobiveni rezultati uspoređeni su i s obzirom na način skladištenja. Tijekom cjelokupnog promatranog razdoblja, opažena je statistički značajna razlika između broja bakterija u uzorku kobasica 1 i 2. Broj kolonija bio je značajno viši kod kobasice koja nije vakumirana u odnosu na vakumiranu ($p<0.05$). Rezultati su prikazani na Slici 8.



Slika 8. Usporedba kinetike rasta ukupnog broja bakterija u uzorku 1 (ne vakumirana slavonska kobasica) i uzorku 2 (vakumirana slavonska kobasica), pri temperaturi od 4 °C u razdoblju od 15 dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$).

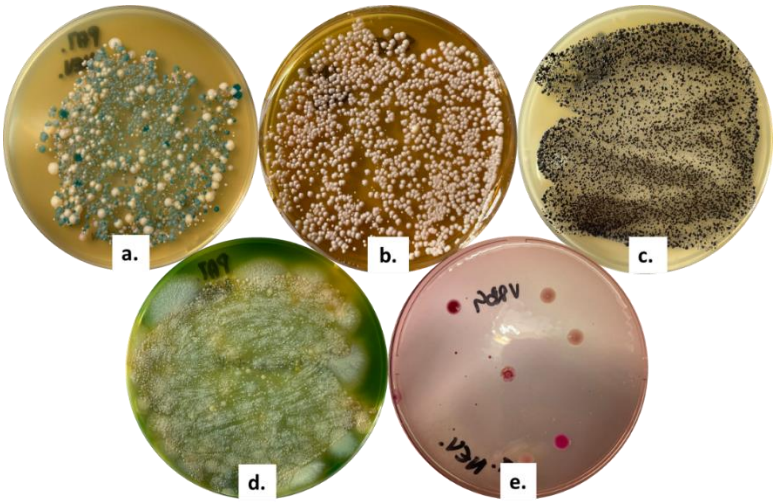
Uzorak 3, ne vakumirana istarska kobasica, proizvod je koji je podvrgnut istim temperaturama, nasađen na istu vrstu hranjivih podloga te je u periodu od 15 dana praćen tijek rasta kolonija. Statistički značajna razlika zabilježena je nakon 10. i 15. dana skladištenja gdje je viši porast zabilježen na temperaturi od 23 °C u odnosu na temperaturu od 4 °C ($p<0.05$). Pri temperaturi 4 °C, nultog dana pokusa zabilježen je porast od $5{,}4 \times 10^3$ CFU/ml. Desetog dana

mjerenja ukupni broj bakterija iznosio je 6,8x10^4 CFU/ml. Konačnog 15. dana ukupni broj kolonija iznosio je 8,8x10^4 CFU/ml. Pri temperaturi od 23 °C početni broj kolonija iznosio je 5,4x10^3 CFU/ml, dok je već 10. dana taj broj iznosio 8,5x10^4 CFU/ml. Broj kolonija 15. dana iznosio je 2,7x10^5 CFU/ml. Rezultati su prikazani na Slici 9.



Slika 9. Prikaz kinetike rasta bakterija u uzorku 3 (ne vakumirane istarske kobasice) čuvanog 15 dana pri temperaturama od 4 °C i 23 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$).

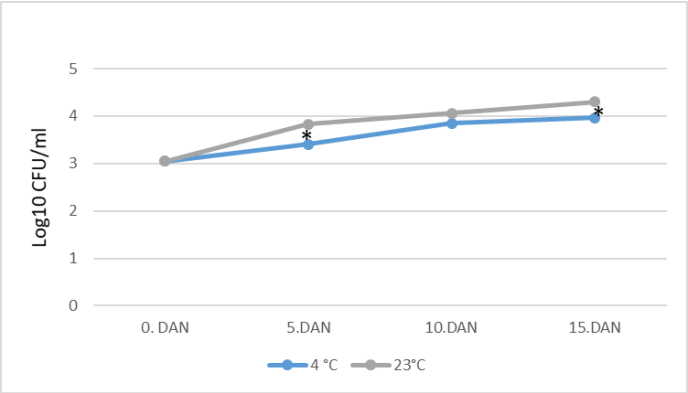
Uzorak je pokazao statistički značajan porast bakterija na svim agarima u odnosu na broj bakterija koji je propisan Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu ($p<0.05$). (Slika 10.). Na podloge je nasađen 1ml uzorka, koje su zatim inkubirane 48 $\pm$ 3 sata pri temperaturi od 37 °C.



Slika 10. Prikaz pozitivnog porasta bakterija na sljedećim hranjivim podlogama: a) – ALOA agar, b) Sabouraud agar, c) Baird Parker agar, d) PEMBA agar, e) VRBG agar; uzorak 3. (Izvor: iz vlastite zbirke)

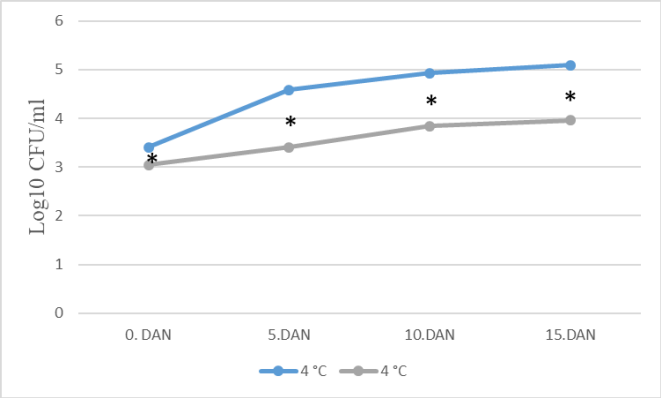
Na slici 10 prikazan je pozitivan porast bakterija na različitim selektivnim i diferencijalnim podlogama. Porasle zeleno-plave kolonije na ALOA agaru ukazuju na prisutnost *L. monocytogenes*u uzorku. Sabouraud agar selektivna je podloga za izolaciju kvasaca i plijesni, njihove kolonije rastu bijele u obliku malih, okruglih i ispupčenih kolonija. Nakon inkubacije od 48 sati porasle crne, sitne kolonije na Baird Parker agaru ukazuju na pozitivan rast bakterije *S. aureus*. Također, opažen je izrazito gust porast kolonija *B. cereus* na PEMBA agaru. Porast *B. cereus* vidljiv je u obliku velikih, plavih te nepravilnih kolonija. Prisutnost *Enterobacteriaceae* na VRBG agaru ističe se ružičasto obojenim kolonijama.

Na slici 11. prikazan je porast bakterija u uzorku 4., vakumirane istarske kobasice, mjeren tijekom 15 dana. Uzorci su nasađeni na podloge s kvaščevim ekstraktom te su inkubirane na 48 $\pm$ 3 sata na 37 °C. Statistički značajna razlika zabilježena je 5. i 15. dana mjerenja. Značajno viši broj bakterija zabilježen je kod uzorka čuvanog na 23 °C, u odnosu na uzorak čuvan pri 4 °C ($p<0.05$). Petog dana mjerenja ukupni broj bakterija pri temperaturi od 4 °C iznosio je $2,6x10^3$ CFU/ml, dok je istog dana pri temperaturi od 23 °C broj kolonija iznosio $6,7x10^3$ CFU/ml. Značajna je razlika zabilježena i 15. dana mjerenja. Broj poraslih kolonija pri temperaturi od 4 °C iznosio je $9,2x10^3$ CFU/ml, a pri temperaturi od 23 °C $2,0x10^4$ CFU/ml.



Slika 11. Porast kinetike rasta ukupnog broja bakterija uzorka 4 (vakumirana istarska kobasica) praćen tijekom 15 dana pri temperaturi od 4 °C i 23 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.5$).

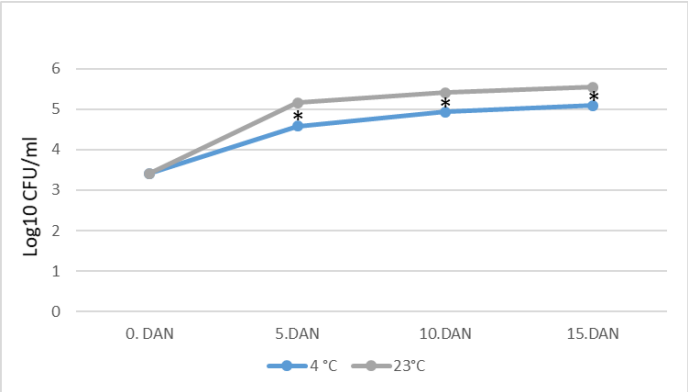
Usporedbom uzorka 3., ne vakumiranih istarskih kobasica, i uzorka 4., vakumiranih istarskih kobasica, pri temperaturi od 4 °C, prema statističkim značajkama uviđamo da je veći porast broja bakterija prisutniji kod uzorka 3., tj. ne vakumirane istarske kobasice 0., 5., 10. i 15. dana mjerenja ($p<0.05$). Rezultati su obrađeni i prikazani Slikom 11. Oba uzorka su nasađena na podloge s kvaščevim ekstraktom, po 1ml uzorka. Uzorak je potom inkubiran pri temperaturi od 37 °C tijekom 48 sati.



Slika 12. Usporedba kinetike rasta bakterija u uzorcima 3. i 4. pri temperaturi od 4 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$).

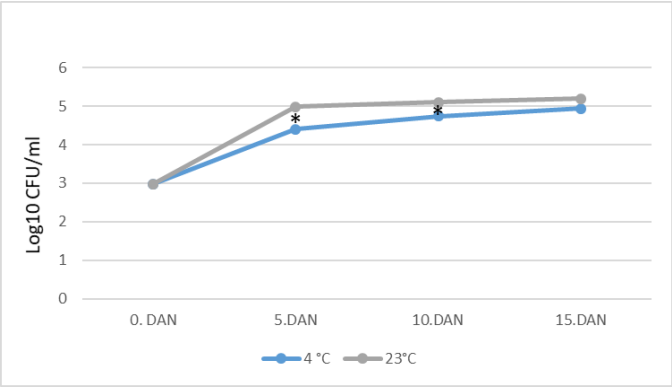
4.1.2. Mljeveno meso

Uzorci 5 i 6, su uzorci mljevenog mesa. Uzorak broj 5 odnosi se na mljeveno meso koje je prije zamrzavanja nije začinjeno. Meso je također izlagano dvjema temperaturama, sobnoj i temperaturi hladnjaka te je praćen porast kolonija tijekom razdoblja od 15 dana. Po 1 ml homogeniziranog uzorka nasađivan je na hranjive podloge. Ukupni porast bakterija pri 4 °C izražen je u CFU/ml, a prikazan je Slikom 13. Nultog dana zabilježen je porast od $2,6x10^3$ CFU/ml. Broj bakterija je rastao dok nije dosegnuo $1,3x10^5$ CFU/ml 15. dana. Statistički značajne razlike u broju bakterija zabilježene su tijekom 5., 10. i 15. dana inkubacije ($p<0.05$). Također, zabilježen je značajan porast bakterija na selektivnim i diferencijalnim podlogama, stoga je uzorak podvrgnut i potvrdnim testovima gdje je utvrđena prisutnost *E. coli*, *Salmonella* spp., *L. momocytogenes* i *S. aureusa*. Prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu ovaj se proizvod smatra neispravnim za daljnju upotrebu.



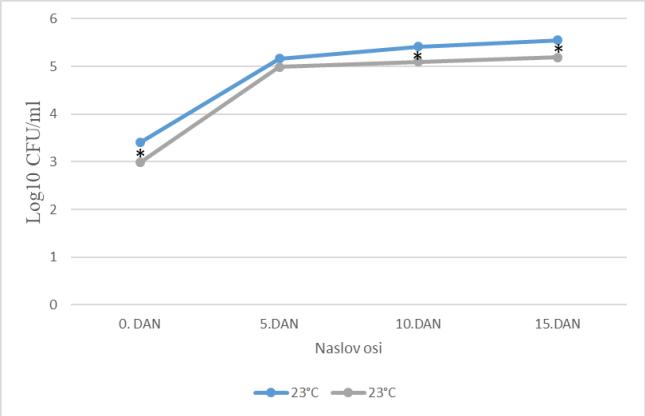
Slika 13. Porast bakterija u uzorku mljevenog mesa broj 5. tijekom 15 dana pri temperaturi od 4 °C i od 23°C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$).

Uzorkovano je i mljeveno meso koje nije začinjeno, nego je samo prošlo proces zamrzavanja do konačne analize. Nultog dana, za uzorak skladišten pri 4 °C, ukupni broj bakterija iznosio je $9,6x10^2$ CFU/ml. Dok je 5. dana zabilježen značajni porast bakterija na $2,5x10^4$ CFU/ml. Desetoga dana izmjerena je koncentracija od $5,4x10^4$ CFU/ml, dok je u konačnici 15. dana zabilježeno $8,6x10^4$ CFU/ml. Podaci su prikazani grafički, u ovisnosti o temperaturi i danima inkubacije. Broj bakterija pri temperaturi od 23 °C nultog dana iznosio je $9,6x10^2$ CFU/ml, a 5. dana već je statistički značajnije odstupao od kolonija poraslih na 4 °C kada je njihov broj iznosio $9,7x10^4$ CFU/ml. Desetoga dana mjerenja broj bakterija raste na $1,3x10^5$ CFU/ml, i 15.dana doseže razinu od $1,6x10^5$ CFU/ml. (Slika 14.) Značajan porast bakterija izračunat je i prikazan pri različitim temperaturama na različitim agarima. Zbog prisutnosti bakterija *Salmonella. E. coli, Staphylococcus, kvasaca i plijesni* uzorak se prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu smatra nezadovoljavajućim.



Slika 14. Uzorak 6, mljeveno začinjeno meso; praćenje ukupnog broja bakterija pri dvije različite temperature u razdoblju od 15.dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$).

Usporedbom mljevenog mesa začinjenog i nezačinjenog, koje je čuvano pri temperaturi od 23 °C, dobiveni su sljedeći podaci. (Slika 15.) Statistički značajna razlika uočljiva je tijekom 0., 10., i 15. dana čuvanja mesa, a viši broj bakterija zabilježen je kod nezačinjenog mesa nego kod mljevenog mesa koje je začinjeno ($p<0.05$).



Slika 15. Usporedba mljevenog mesa, začinjenog i nezačinjenog, pri temperaturi od 23 °C, u razdoblju od 15 dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$).

5. RASPRAVA

Dobiveni rezultati uspoređeni su sa Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu N.N. 46/07 (1), na temelju čega je utvrđeno da su dva od šest ispitanih uzoraka mikrobiološki ispravna. Meso je namirnica bogata proteinima, bjelančevinama, ugljikohidratima, mastima, vodom i kao takvo idealna je podloga za rast i razvoj mikroorganizama. Bakterije koje su pokazatelji nezadovoljavajuće mikrobiološke ispravnosti mesnih proizvoda su bakterije roda *Salmonella* spp., *Escherichia, Bacillus, Staphylococcus, Enterococcus,* kvasci i plijesni. Ukupan porast bakterija u uzorku 1, ne vakumirane slavonske kobasice, praćen je tijekom 15 dana. Kobasica je izložena temperaturi od 4 °C i temperaturi od 23 °C, porast je praćen svakog petog dana (0., 5., 10. i 15. dana). Rezultati su pokazali da broj bakterija raste s vremenom skladištenja. Nadalje, u uzorku 1 zabilježen je jedino porast bakterija iz roda *Bacillus*. Sukladno Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (1) ovaj uzorak je mikrobiološki ispravan. Uzorak 2, vakumirana slavonska kobasica, izložena je istim uvjetima, ukupan porast bakterija rastao je povišenjem temperature i dana inkubacije. Uzorak je nasađen na različite selektivne i diferencijalne podloge, gdje se također pratio porast kolonija tijekom 15 dana pri temperaturama od 4 °C i 23 °C. Inkubacijom tih podloga nije zabilježen porast niti jedne kolonije. Uzorak 2, vakumirana slavonska kobasica, se prama Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (1) smatra mikrobiološki ispravnom. Usporedbom uzorka 1 i uzorka 2 uviđamo da kinetika rasta bakterija ovisi o uvjetima skladištenja. Tako je ukupni broj bakterija pri temperaturi od 4 °C statistički veći u uzorku 1, u odnosu na uzorak 2 ($p<0.05$). Iz čega zaključujemo da uzorak koji je vakumiran ima manji broj bakterija, tj. bolje je mikrobiološke čistoće u odnosu na ne vakumirani uzorak.

Kod uzorka 3, ne vakumirane istarske kobasice, zabilježen je značajan porast kolonija na svim selektivnim i diferencijalnim podlogama. Ukupan broj bakterija bio je izrazito visok već pri temperaturi od 4 °C. Broj bakterija je nultog dana iznosio$5,4x10^3$ CFU/ml, dok je već 15. dana inkubacije iznosio $8,8x10^5$ CFU/ml. Značajniji porast broja kolonija zabilježen je pri temperaturi od 23 °C koji je sa početnog broja bakterija $5,4x10^3$ CFU/ml porastao na $2,7x10^5$ CFU/ml. Daljnjom analizom selektivnih i diferencijalnih podloga zabilježen je rast bakterija na sljedećim agarima: ALOA, XLD, TBX, VRBG, PEMBA, Sabouraud i Baird Parker. Korištenjem potvrdnih testova navedenih u poglavlju materijala i metoda dokazane su bakterije iz roda *Salmonella, Bacillus, Escherichia, Listeria, Staphylococcus, Enterococcus* te je utvrđena prisutnost kvasaca i plijesni. *Listeria* je bakterija koja raste i razmnožava se pri temperaturi od 4 °C, a u ispitivanoj hrani koja je spremna za konzumaciju ne smije se pronaći

niti jedna kolonija. Bakterija je vrlo opasna za skupine ljudi tzv. YOPI tj. mlade, stare, trudnice i imunokompromitirane. Prema istraživanju kojeg su proveli Matle, Mbatha i Madoroba proveli u zemljama u razvoju, porast broja kolonija bakterije *L. monocytogenes* povećao se s vremenom skladištenja u pripravcima od mljevenog mesa (8). Nadalje, u istraživanju koje je ispitivalo mikrobiološku čistoću svinjskog mesa u Africi 2020. godine (9), zabilježen je porast bakterija iz roda *Campylobacter* u 24,6 % ispitivanih uzoraka, dok je porast bakterija iz roda *Salmonella* zabilježen u 13,1 % ispitivanih uzoraka.

Uzorak 4, vakumirana istarska kobasica, pokazao je značajan porast ukupnog broja bakterija. Početni dan pokusa, broj bakterija je pri temperaturi od 4 °C iznosio $1{,}1 \times 10^3$ CFU/ml, te je konačnog 15. dana iznosio $9{,}2 \times 10^3$ CFU/ml. Isti uzorak inkubiran je pri temperaturi od 23 °C, kada je početni broj bakterija bio isti, no 15. dana inkubacije iznosio je 2×10^4 CFU/ml. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je broj poraslih kolonija veći što je temperatura inkubacije viša. Uspoređujući ove rezultate s Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu ovaj uzorak nije zadovoljavajuće mikrobiološke ispravnosti.

Mikrobiološka ispravnost mljevenog mesa ispitivana je na isti način. Mljeveno meso inkubirano je tijekom 15 dana na temperaturama od 4 °C i 23 °C. Uzorci su nasađeni na iste selektivne i diferencijalne podloge kao i kobasice. U uzorku broj 5, nezačinjeno mljeveno meso, zabilježen je značajan porast ukupnog broja bakterija koji je sa početnog broja $2{,}6 \times 10^3$ CFU/ml inkubiranog pri 4 °C, porastao na $1{,}3 \times 10^5$ CFU/ml tijekom 15 dana. Na svim selektivnim i diferencijalnim podlogama zabilježen je značajan porast ispitivanih bakterija. Bakterije koje su dokazane potvrdnim testovima ukazuju na mikrobiološku neispravnost mesa. Dokazane su bakterije roda *Salmonella, Staphylococcus, Escherichia, Listeria, Enterococcus, Bacillus,* te kvasci i plijesni. Kao takvo ovo mljeveno meso smatra se mikrobiološki neispravnim. Isto tako ispitivano je i začinjeno mljeveno meso, uzorak broj 6. Kao i kod prethodnog uzorka i u ovom slučaju je utvrđena mikrobiološka neispravnost, s obzirom da ukupni broj bakterija nije sukladan Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (1). Nultog dana ukupni broj bakterija pri temperaturi od 4 °C iznosio je $9{,}6 \times 10^2$ CFU/ml, koji je konačnog 15. dana dosegao iznos od $8{,}6 \times 10^4$ CFU/ml. Porast svih ispitivanih bakterija bio je značajno viši u uzorku mesa inkubiranog pri 23 °C. Početni broj bakterija iznosio je$9{,}6 \times 10^2$ CFU/mla tijekom ispitivanog vremenskog razdoblja porasao je do $1{,}6 \times 10^5$ CFU/ml. Porast broja kolonija zabilježen je na svim selektivnim i diferencijalnim podlogama. Potvrdnim testovima dokazane su i potvrđene bakterije roda *Salmonella, Escherichia, Listeria, Staphylococcus, Enterococcus,* te kvasci i plijesni. Usporedbom uzoraka 5 i 6 izmjerena je

statistički značajna razlika tijekom 0., 10. i 15. dana. Pri temperaturi od 23 °C, viši broj bakterija zabilježen je kod mesa bez dodatka začina nego kod mljevenog mesa koje je začinjeno ($p<0.05$).

Istraživanje u kojem je ispitivan utjecaj različitih režima pakiranja mljevenog mesa na ponašanje bakterije *Salmonella* spp., provođeno je tijekom 12 dana gdje su uzorci mljevenog mesa bili skladišteni pri temperaturi od 3±1 °C. Mljeveno meso izložili su modificiranoj atmosferi prostora od 20%O_2/50%CO_2/30%N_2 i 20%O_2/30%CO_2/50%N_2. Uzorci su analizirani svakog trećeg dana. Istraživanje je pokazalo da se s danima smanjio broj kolonija bakterije *Salmonella* spp. za oko 1,5 $\log_{10}$ CFU/g. Međutim, značajne razlike nisu zabilježene između mesa pakiranog u atmosferi koja sadrži 50% CO_2 i mesa pakiranog u 30% CO_2 (10).

S obzirom na dobivene rezultate, prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu možemo zaključiti da su uzorak 1 i 2 mikrobiološki ispravni, dok su ostala 4 uzorka mikrobiološki neispravna.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti:

- Uzorak 1, ne vakumirana slavonska kobasica, zadovoljavajuće je mikrobiološke kvalitete.
- Uzorak 2, vakumirana slavonska kobasica, zadovoljavajuće je mikrobiološke kvalitete.
- Broj ispitivanih bakterija u uzorku 1 (ne vakumirana kobasica) statistički je značajno veći u odnosu na uzorak 2 (vakumirana kobasica) pri temperaturi od 4 °C.
- Uzorak 3, ne vakumirana istarska kobasica, nije zadovoljavajuće mikrobiološke ispravnosti
- Uzorak 4, vakumirana istarska kobasica, nije zadovoljavajuće mikrobiološke ispravnosti
- Broj ispitivanih bakterija u uzorku 3 (ne vakumirane kobasice) Statistički je značajno veći u odnosu na uzorak 4 (vakumirana kobasica) pri temperaturi od 4 °C.
- Uzorak 5, mljeveno meso bez dodatka začina, nije zadovoljavajuće mikrobiološke ispravnosti
- Uzorak 6, začinjeno mljeveno meso, nije zadovoljavajuće mikrobiološke ispravnosti
- Bakterijski porast u uzorku 5 (nezačinjenog mljevenog mesa) znatno je veći u odnosu na uzorak 6 (začinjeno mljeveno meso) pri temperaturi od 23 °C.

7. LITERATURA

1. NN 74/2008 (27.6.2008.), Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu
2. Heinz G., Hautzinger P. Meat processing technology for small - to medium-scale producers. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok. 2007.
3. Kovačević D., K. Mastanjević, D. Šubarić, I. Jerković, Z. Marijanović. Physicochemical, colour and textural properties of Croatian traditional dry sausage (Slavonian Kulen). Meso. Vol. XII No. 5. 2010. 270-275.
4. Kalenić S. i suradnici, Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb 2019., str. 207-213
5. Hrvatska agencija za hranu (HAH), „Biološke opasnosti u hrani“ 2009.
6. Duraković S. i suradnici, Moderna mikrobiologija namirnica, knjiga prva, Kugler, Zagreb, 2002., str. 322-326
7. Šantić M., Gobin I., Ožanič M., Marečić V., Mikrobiologija hrane i vode, Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2014.
8. Matle I, Mbatha KR, Madoroba E., A review of Listeria monocytogenes from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. (Internet). 2020 Oct 9 (citirano 14. lipnja) 2020; Dostupno na: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33054262/
9. Thomas KM, de Glanville WA, Barker GC, Benschop J, Buza JJ, Cleaveland S, Davis MA, French NP, Mmbaga BT, Prinsen G, Swai ES, Zadoks RN, Crump JA: Prevalence of Campylobacter and Salmonella in African food animals and meat: A systematic review and meta-analysis. 2020 Feb 16;315:108382; Dostupno na: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31710971/
10. Djordjević J, Bošković M, Starčević M, Ivanović J, Karabasil N, Dimitrijević M, Lazić IB, Baltić MŽ.: Survival of Salmonella spp. in minced meat packaged under vacuum and modified atmosphere. 2018 Jul-Sep;49(3):607-613. Dostupno na: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29449174/

8. POPIS SLIKA

Slika 1. Mašina za mljevenje mesa 3
Slika 2. Automatska mašina za mljevenje mesa 3
Slika 3. Top za punjenje kobasica 4
Slika 4. Shematski prikaz određivanja i dokazivanja bakterija 10
Slika 5. Prikaz kinetike rasta ukupnog broja bakterija u uzorku 1 ne vakumirane slavonske kobasice, tijekom 15. dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (p<0.0). 14
Slika 6. Prikaz porasta bakterija u uzorku 1 (desna strana podloge) i uzorku 2 (lijeva strana podloge) na podlogama: a) Sabouraud agar, b) Baird Parker, c) PEMBA, d) VRBG, e) XLD 15
Slika 7. Prikaz kinetike rasta ukupnog broja bakterija u uzorku vakumirane slavonske kobasice (uzorak 2), tijekom 15 dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (p<0.05). 16
Slika 8. Usporedba kinetike rasta ukupnog broja bakterija u uzorku 1 (ne vakumirana slavonska kobasica) i uzorku 2 (vakumirana slavonska kobasica), pri temperaturi od 4 °C u razdoblju od 15 dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (p<0.05). . 16
Slika 9. Prikaz kinetike rasta bakterija u uzorku 3 (ne vakumirane istarske kobasice) čuvanog 15 dana pri temperaturama od 4 °C i 23 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (p<0.05). 17
Slika 10. Prikaz pozitivnog porasta bakterija na sljedećim hranjivim podlogama: a) – ALOA agar, b) Sabouraud agar, c) Baird Parker agar, d) PEMBA agar, e) VRBG agar; uzorak 3. (Izvor: iz vlastite zbirke) 17
Slika 11. Porast kinetike rasta ukupnog broja bakterija uzorka 4 (vakumirana istarska kobasica) praćen tijekom 15 dana pri temperaturi od 4 °C i 23 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (p<0.5). 18
Slika 12. Usporedba kinetike rasta bakterija u uzorcima 3. i 4. pri temperaturi od 4 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (p<0.05). 19
Slika 13. Porast bakterija u uzorku mljevenog mesa broj 5. tijekom 15 dana pri temperaturi od 4 °C i od 23°C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (p<0.05). 19

Slika 14. Uzorak 6, mljeveno začinjeno meso; praćenje ukupnog broja bakterija pri dvije različite temperature u razdoblju od 15.dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$). 20
Slika 15. Usporedba mljevenog mesa, začinjenog i nezačinjenog, pri temperaturi od 23 °C, u razdoblju od 15. dana. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost ($p<0.05$). 21

8. ŽIVOTOPIS

Evita-Lara Brkić rođena je 24.12.1998. godine u Zgrebu. Osnovnu školu Braće Seljan pohađala je i završila u Karlovcu u razdoblju od 2005. do 2013. Paralelno je završila i osnovnu glazbenu školu. Nakon završena dva razreda matematičke gimnazije u Karlovcu prebacuje se na opći smjer koji završava 2017. Redoviti studij Sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci upisuje 2018. godine. Od 6.godine bavila se kickboxingom, u kojem joj je najveće dostignuće bila bronca na Svjetskom prvenstvu 2014. Redoviti je darivatelj krvi od 2021.godine, a uz studij povremeno radi na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo u Primorsko-goranskoj županiji te aktivno sudjeluje u organizacijskom odboru studentskog kongresa Sanitas.