

Mikrobiološka ispravnost spontano fermentiranih kobasica proizvedenih u domaćoj radinosti

Grgić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:500644>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

**MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST SPONTANO
FERMENTIRANIH KOBASICA PROIZVEDENIH U
DOMAĆOJ RADINOSTI**

DIPLOMSKI RAD

Iva Grgić

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Agroekologija - Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST SPONTANO
FERMENTIRANIH KOBASICA PROIZVEDENIH U
DOMAĆOJ RADINOSTI**

DIPLOMSKI RAD

Iva Grgić

Mentor:

prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Iva Grgić**, JMBAG 1003150549, rođen/a 21.10.1999. u Vinkovcima, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST SPONTANO FERMENTIRANIH KOBASICA
PROIZVEDENIH U DOMAĆOJ RADINOSTI**

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Iva Grgić**, JMBAG 1003150549, naslova

**MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST SPONTANO FERMENTIRANIH KOBASICA
PROIZVEDENIH U DOMAĆOJ RADINOSTI**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka, mentor

2. Prof. dr. sc. Ivančica Kovaček, komentor

3. Prof. dr. sc. Ivica Kos, član

4. Doc. dr. sc. Ivana Rajnović, član

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja	2
2. Pregled literature	3
2.1. Zakonodavstvo	3
2.2. Proizvodnja tradicionalnih kobasica u domaćoj radinosti.....	4
2.3. Mikrobiološke opasnosti	5
2.3.1. <i>Salmonella</i> spp.	5
2.3.1.1. Detekcija <i>Salmonella</i> spp.	6
2.3.2. Enterobacteriaceae.....	8
2.3.2.1. Uzgoj i validacija enterobakterija	9
2.3.3. Koagulaza pozitivni stafilokoki (<i>Staphylococcus aureus</i>)	10
2.3.3.1. Uzgoj i validacija <i>S. aureus</i>	11
2.3.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.3.4.1. Identifikacija i validacija <i>Listeria monocytogenes</i>	13
2.3.5. Sulfitredicirajuće klostridije	14
2.3.5.1. Detekcija i validacija sulfitredicirajućih klostridija	15
2.4. Aerobne mezofilne bakterije	15
3. Materijali i metode	17
3.1. Uzorkovanje.....	17
3.2. Materijali	18
3.3. Mjerenje aktiviteta vode i pH vrijednosti.....	20
3.4. Izolacija i identifikacija indikatorskih mikroorganizama	21
3.5. Dokazivanje indikatorskih mikroorganizama.....	22
3.5.1. Uzgoj i potvrda <i>Salmonella</i> spp.	22
3.5.2. Uzgoj i identifikacija bakterija porodice Enterobacteriaceae	24
3.5.3. Uzgoj i identifikacija <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.5.4. Uzgoj i identifikacija <i>Listeria monocytogenes</i>	28
3.5.5. Određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija	31
4. Rezultati	32
5. Rasprava.....	35
6. Zaključak.....	37
7. Literatura	38

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Iva Grgić**, naslova

MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST SPONTANO FERMENTIRANIH KOBASICA PROIZVEDENIH U DOMAĆOJ RADINOSTI

U ovom radu prikazani su rezultati mikrobiološke analize spontano fermentiranih kobasica proizvedenih u domaćoj radinosti na području grada Županje. U uzorcima kobasica (n=20) određen je broj aerobnih mezofilnih bakterija, *Salmonella* spp., Enterobacteriaceae, sulfitreducirajućih klostridija i stafilokoka standardnim mikrobiološkim metodama. Također je utvrđen aktivitet vode (a_w) i pH vrijednost. Broj aerobnih mezofilnih bakterija iznosio je u prosjeku 5,82 log₁₀ CFU/g, a ukupan broj stafilokoka 2,38 log₁₀ CFU/g, međutim u nijednom uzorku nisu utvrđeni koagulaza pozitivni stafilokoki / *Staphylococcus aureus*. U većini uzoraka (90 %) nisu bile detektirane enterobakterije te je u samo jednom uzorku njihov broj bio iznad 2 log₁₀ CFU/g. Sulfitreducirajuće klostridije kao ni *Salmonella* spp. nisu pronađene u uzorcima kobasica. U tri uzorka kobasica (15 %) detektirana je *Listeria monocytogenes*. Aktivitet vode (a_w) iznosio je od 0,639 do 0,909, a pH vrijednost od 6,68 do 6,89. Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti kako je mikrobiološka ispravnost domaće proizvedenih trajnih fermentiranih kobasica uglavnom zadovoljavajuća. Ipak, prisutnost *Listeria monocytogenes* u pojedinim uzorcima predstavlja zdravstveni rizik i ukazuje na potrebu za poboljšanjem higijenskih uvjeta proizvodnje i kontrolnih mjera u domaćinstvima kako bi se osigurali zdravstveno ispravni proizvodi.

Ključne riječi: fermentirane kobasice, mikrobiološki kriteriji, aktivitet vode, pH

Abstract

Of the master's thesis- student Iva Grgić, entitled

Microbiological safety of spontaneously fermented sausages produced in household conditions

This paper presents the results of microbiological analysis of spontaneously fermented sausages produced in households in the area of the city of Županja. In sausage samples (n=20), the number of aerobic mesophilic bacteria, *Salmonella spp.*, Enterobacteriaceae, sulfite-reducing clostridia, and staphylococci were determined using standard microbiological methods. Additionally, water activity (a_w) and pH values were measured. The average number of aerobic mesophilic bacteria was 5.82 log₁₀ CFU/g, and the total number of staphylococci was 2.38 log₁₀ CFU/g. However, no coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus*) were detected in any sample. In the majority of samples (90 %), no enterobacteria were detected, with only one sample showing levels above 2 log₁₀ CFU/g. Sulfite-reducing clostridia and *Salmonella spp.* were not found in any of the tested sausage samples. *Listeria monocytogenes* was detected in three sausage samples (15 %). Water activity (a_w) ranged from 0.639 to 0.909, and pH values ranged from 6.68 to 6.89. Based on the conducted research, it can be concluded that the microbiological safety of homemade dry fermented sausages is generally satisfactory. However, the presence of *Listeria monocytogenes* in some samples poses a health risk and highlights the need for improved hygiene conditions during production and stricter control measures in households to ensure the production of safe food products.

Keywords: fermented sausages, microbiological criteria, water activity, pH

1. Uvod

U Republici Hrvatskoj se proizvode razne vrste trajnih fermentiranih proizvoda čime se značajno doprinosi očuvanju bogate i raznovrsne gastronomske tradicije naše zemlje. Spontano fermentirane kobasice jedan su od popularnijih mesnih proizvoda koje se proizvode po tradicionalnoj recepturi na brojnim malim obiteljsko-poljoprivrednim gospodarstvima i u kućnoj radinosti. Takve tradicionalne i spontano fermentirane proizvode karakterizira posebna kvaliteta te slove kao delikatese specifičnog okusa i mirisa. Međutim, tradicionalan način proizvodnje kobasica koji ne uključuje mikrobne kulture i aditive može rezultirati proizvodom neujednačene kvalitete i upitne mikrobiološke ispravnosti (Markov i sur., 2013). Nerijetko su moguće pogreške u proizvodnji zbog neznanja ili nepridržavanja osnovnih tehnološko-higijenskih načela i nestandardizirane proizvodnje. Kobasice proizvedene u kućanstvima (domaća radinost) koje nisu namijenjene za stavljanje na tržište, ne podliježu sustavima kontrole konačnog proizvoda kao što je HACCP sustav (Hazard Analysis and Critical Control Point), za razliku od proizvoda koji dopijevaju na tržište. Fermentirane trajne kobasice većinom ne predstavljaju velik rizik za zdravlje zbog prisutnih organskih kiselina, dodatka soli i začina, smanjenog aktiviteta vode i dominacije korisnih mikroorganizama koji potiskuju rast patogenih bakterija (Mrkonjić Fuka i sur., 2020). Međutim, razni faktori mogu utjecati na higijenu mesa i posljedično na mikrobiološku ispravnost kobasica. Prema Uredbi Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu definirani su kriteriji sigurnosti hrane i higijene tijekom proizvodnje hrane, a Vodič o mikrobiološkim kriterijima za hranu usklađen je s navedenom Uredbom. Za kategoriju hrane iz Vodiča "Trajne kobasice i drugi suhomesnati proizvodi" preporučeni mikrobiološki kriteriji koji uključuju detekciju su *Salmonella* spp., Enterobacteriaceae, sulfitreducirajuće klostridije, koagulaza pozitivni stafilokoki / *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*. Ovi kriteriji primijenjeni su u ovom istraživanju kako bi se odredio mikrobiološki status fermentiranih kobasica proizvedenih u domaćoj radinosti na području grada Županje i kako bi se evaluirao njihov potencijalni rizik u širenju zoonoza.

1.1. Cilj istraživanja

Poznato je kako suhomesnati proizvodi proizvedeni u kućnoj radinosti (kućanstvima) ne podliježu sustavima kontrole te iako većinom sadrže bezopasne i korisne mikroorganizme, u domaćim kobasicama se mogu pronaći i patogeni mikroorganizmi.

Opći cilj ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološku ispravnost spontano fermentiranih kobasica (n=20) proizvedenih u domaćoj radinosti i na obiteljsko-poljoprivrednim gospodarstvima s područja grada Županje.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti brojnost mikroorganizama (\log_{10} CFU/g) u skladu s relevantnim ISO standardima, prema Uredbi Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu.
2. Validirati sumnjive kolonije biokemijskim testovima i kemotaksonomskim metodama.
3. Odrediti aktivitet vode (a_w) i pH vrijednost uzoraka kobasica.

2. Pregled literature

2.1. Zakonodavstvo

Uredbom Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu definirani su kriteriji sigurnosti hrane i higijene tijekom proizvodnje hrane. Uredba je uvedena u hrvatsko zakonodavstvo kroz Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22). Nadalje, istom Uredbom se utvrđuju mikrobiološki kriteriji za određene mikroorganizme te provedbena pravila kojih se subjekt u poslovanju s hranom mora pridržavati. Ministarstvo poljoprivrede izdalo je Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu kako bi se jednostavnije razumjela mikrobiološka ispravnost hrane. Vodič je usklađen s Uredbom (EZ-a) 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu i Uredbom (EZ) br. 1441/2007 o izmjeni Uredbe (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

Vodič je prvenstveno namijenjen Subjektima u poslovanju s hranom (u daljnjem tekstu: SPH) koji svoje proizvode stavljaju na tržište, a obuhvaća obavezne kriterije, mikrobiološke zahtjeve i preporuke. SPH su odgovorni da hrana u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije bude pod njihovom kontrolom i da udovoljava zahtjevima propisa o hrani. Mikroorganizmi, njegovi toksini i metaboliti, plan uzorkovanja i kriteriji za trajne kobasice i druge suhomesnate proizvode propisani u Vodiču o mikrobiološkim kriterijima za hranu prikazani su niže u tekstu (Slika 2.1.1).

U kategoriji „Trajne kobasice i drugi trajni suhomesnati proizvodi“ navodi se da *Salmonella* spp. ne smije pronaći u pet elementarnih jedinica uzorka u 25 g dok se sulfitreducirajuće klostridije smiju naći u jednom od pet elementarnih uzoraka i to u rasponu; $m=10$ CFU/g, $M=10^2$ CFU/g. Koagulaza pozitivni stafilokoki / *Staphylococcus aureus*, mogu se pronaći u jednom uzorku od pet elementarnih uzoraka u rasponu od $m=10$ CFU/g, $M=10^2$ CFU/g. Enterobacteriaceae smiju biti nađene na jednom od 5 elementarnih uzoraka i to u rasponu; $m=10$ CFU/g, $M=10^2$ CFU/g. *Listeria monocytogenes* smije biti detektirana u rasponu od $m=10$ CFU/g, $M=10^2$ CFU/g u jednom od pet uzoraka ako se radi od proizvodima s aktivnosti vode $\leq 0,92$. Ako je a_w veći od 0,92 *L. monocytogenes* se ne smije biti detektirana niti jednom od pet uzoraka.

1.2. Kobasice, suhomesnati proizvodi i slanine

	Hrana	Preporučeni parametri	Plan uzorkovanja		Kriteriji
			n	c	
1.2.1.	Trajne kobasice i drugi trajni suhomesnati proizvodi	<i>Salmonella spp.</i>	5	0	n.n. u 25g
		<i>Enterobacteriaceae</i>	5	1	m=10cfu/g M=10 ² cfu/g
		Sulfitreducirajuće klostridije	5	1	m=10cfu/g M=10 ² cfu/g
		Koagulaza pozitivni stafilocoki / <i>Staphylococcus aureus</i>	5	1	m=10cfu/g M=10 ² cfu/g
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	n.n. u 25g Proizvodi s aw>0,92
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	1	m=10cfu/g M=10 ² cfu/g Proizvodi s aw≤0,92

Slika 2.1.1. Kriterij 1.2.1. vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu za trajne kobasice i druge trajne suhomesnate proizvode

cfu/g- (engl. colony forming unit) broj kolonija u gramu

n.n. = nije nađeno

n = broj elementarnih jedinica uzorka koje čine uzorak

c = broj jedinica uzorka, u kojima se dobivene vrijednosti ispitivanja mogu nalaziti između "m" i "M", pri čemu se uzorak smatra prihvatljivim, ukoliko je dobivena vrijednost ispitivanja u ostalim jedinicama uzorka jednaka "m" ili manja od "m"

m = granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim

M = granična dopuštena vrijednost iznad koje se svi rezultati smatraju nezadovoljavajućim

2.2. Proizvodnja tradicionalnih kobasica u domaćoj radinosti

Različite vrste kobasica i ostalih mesnih proizvoda tradicionalno se proizvode u domaćinstvima diljem Slavonije. Ovi proizvodi često se konzumiraju unutar obitelji ili dijele s prijateljima i susjedima, čime postaju ključni dio lokalne gastronomije i kulturne baštine. Budući da proizvodnja ovih domaćih kobasica nije regulirana strogim normama niti standardiziranim postupcima, u procesu proizvodnje postoji veća varijabilnost, što može dovesti do promjena u kvaliteti i sigurnosti proizvoda. Iako mnogi proizvođači primjenjuju tradicionalne metode i održavaju visoke higijenske standarde, uvijek postoji potencijalni rizik od kontaminacije i izbijanja bolesti zbog nepredvidljivih uvjeta u kojima se proizvodi pripremaju (Pavičić i sur., 2008).

Proizvodnja kobasica podrazumijeva korištenje svinjskog mesa i masnog tkiva, uz dodatak soli (od 2 do 2,5 %) i mješavine začina (slatka i ljuta crvena paprika, češnjak,

mljeveni papar) u različitim omjerima. Meso i masno tkivo se nakon mljevenja pune u svinjska tanka crijeva, a nakon nadijevanja kobasice se podvrgavaju dimljenju u pušnicama. Proces dimljenja mesa je postupak konzerviranja koji ima baktericidno, fungicidno i antioksidativno djelovanje, ali i daje proizvodu specifičan miris i okus. Dimljenje kobasica provodi se nakon 24 h tijekom sljedećih 10 dana, odnosno svaki drugi dan po 6–7 h ili po potrebi i procjeni proizvođača. Nakon procesa dimljenja, kobasice se prebacuju u prostorije za zrenje i sušenje koje traje između 30-90 dana i nakon toga su spremne za konzumaciju. Sušenjem se smanjuje količina vode u proizvodu na manje od 40 %, što onemogućava rast i razmnožavanje mikroorganizama (Rašeta i sur., 2021; Zdolec i sur., 2007).

Tijekom zrenja odvijaju se razni složeni mikrobiološki, biokemijski, i fizikalno-kemijski procesi koji utječu na sigurnost i kakvoću gotovih fermentiranih kobasica. Prvotna mikrobna kontaminacija ovisi o mikrobiološkoj kakvoći sirovine i dodataka, ali i o (ne)higijeni tijekom procesa proizvodnje (Zdolec i sur., 2007). Na svojstva i kvalitetu proizvoda znatno utječu opće karakteristike podneblja i specifični mikroklimatski uvjeti. Zbog specifične mikrokline, aktivira se mikrobiota i enzimi iz mesa i masnog tkiva, te ostaju aktivni tijekom cijelog procesa proizvodnje. Složeni fizikalno-kemijski procesi u fazama zrenja (snižavanje pH i aktiviteta vode, povećanje koncentracije soli) doprinose razvoju specifične mikrobiote. Sve se to očituje u stvaranju veoma ugodnih aromatičnih svojstava gotovog proizvoda (Zdolec i sur., 2007). Smatra se kako fermentirane kobasice u pravilnim uvjetima čuvanja neće mijenjati svoj kemijski sastav i mikrobiološku stabilnost. Kako bi se omogućili pravilni uvjeti (temperatura, vlaga, svjetlost), tradicionalna proizvodnja se odvija zimi zbog niskih temperatura.

2.3. Mikrobiološke opasnosti

2.3.1. *Salmonella* spp.

Rod *Salmonella* obuhvaća Gram-negativne štapiće koji su vrlo rasprostranjeni u prirodi i uzročnici su gastrointestinalnih infekcija i sustavnih bolesti u ljudi i životinja. Bakterije se mogu pronaći u intestinalnom traktu reptila, ptica, insekata, domaćih životinja i ljudi. *Salmonella* se morfološki podudara s ostalim pripadnicima enterobakterija jer ne stvara spore te posjeduje kapsulu (Ohl i sur., 2001).

Salmonella nisu zahtjevni mikroorganizmi za uzgoj na posve jednostavnim hranjivim podlogama. Za izolaciju salmonela iz primarno sterilnih uzoraka rabe se neselektivne podloge: krvni agar i brucella-agar. Na takvim podlogama salmonele rastu u sivim, okruglim, konveksnim kolonijama promjera 2-3 mm, ravnih rubova i sjajne površine (Coburn i sur., 2007).

Salmoneloze, bolesti izazvane bakterijom *Sallmonella*, su primarno infekcije životinja, a na čovjeka se prenose namirnicama životinjskog podrijetla. Bolest može nastati konzumacijom zaraženih jaja, mesa, mlijeka i mliječnih proizvoda, ribe. Osim u životinjskim proizvodima, *Salmonella* je pronađena i u povrću, voću i orašastim plodovima. Ulazna točka salmonela u ljudski organizam je probavni sustav, te je gastroenteritis najčešći oblik salmoneloza. Najčešći uzročnici gastroenteritisa su *S. enteritidis* i *S. typhimurium*. Iz tankog crijeva salmonele vrlo brzo prodiru u krvotok (Coburn i sur., 2007).

Zdrave životinje, koje mogu nositi patogene sojeve salmonele, značajan su izvor zaraze za ljude. U procesu klanja životinja, patogeni poput salmonele mogu kontaminirati površine trupova, potencijalno dovodeći do kontaminiranih proizvoda. Prilikom procesa toplinske obrade nisu uvijek postignute dovoljno visoke temperature i stoga nije moguće u potpunosti eliminirati salmonelu. Skupina brazilskih autora (Morioka i sur., 2017) analizirali su uzorke domaćih, ali i industrijskih kobasica, uključujući kobasice od peradi, svinje, koza, ribe te dimljeni chorizo. Prisutnost *Salmonella* spp. otkrivena je u svim uzorcima izuzev choriza i riblje kobasice.

2.3.1.1. Detekcija *Salmonella* spp.

Prva faza u tradicionalnim metodama detekcije *Salmonella* spp. započinje umnažanjem uzorka u neselektivnom tekućem mediju, kao što je puferirana peptonska voda. Nakon obogaćivanja, uzorak se prebaci u RVS (Rappaport-Vassiliadis Soya) tekući medij, koji je selektivan za *Salmonella* vrste. Iz RVS medija, kultura se potom nanosi ezom na selektivni čvrsti medij XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar, s ciljem izolacije potencijalnih kolonija *Salmonella*. Nakon inkubacije, promatra se porast kolonija crvene boje s crnim središtem. XLD agar sadrži ekstrakt kvasca kao izvor hranjivih tvari i vitamina te djeluje inhibitorno na Gram-pozitivne mikroorganizme. Ako nakon inkubacije na XLD mediju nisu prisutne pojedinačne kolonije, kultura se

ponovno presađuje na XLD podlogu ili krvni agar te se ostavlja na daljnju inkubaciju (Boughton i sur., 2004).

Dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp. u uzorcima obavlja se putem biokemijskog niza koji se sastoji od nekoliko karakterističnih biokemijskih testova.

Prvi test u nizu je trostruki šećer (glukoza, saharoza, laktoza). Trostruki šećer je kosi medij žute boje, a nakon nanošenja kolonije, ako je prisutna *Salmonella* spp., polovica testa pokazati će roza boju zbog fermentirane glukoze (American Society for Microbiology, 2005).

SIM (Sulfide Indole Motility) medij je biokemijski test koji se koristi za razlikovanje bakterija na temelju njihove sposobnosti proizvodnje sumporovodika, pokretljivost i nastanka indola. Sastojci u SIM mediju omogućuju određivanje ovih triju aktivnosti pomoću kojih se mogu razlikovati članovi porodice Enterobacteriaceae, uključujući vrste *Salmonella*. Natrijev tiosulfat i amonijev fericitrat pokazatelji su proizvodnje sumporovodika stvaranjem crnog taloga. *Salmonella* spp. reduciraju sumpor, što rezultira crnim obojenjem na agaru. Kazein pepton je bogat triptofanom, kojeg koriste određeni mikroorganizama što rezultira proizvodnjom indola. Indol se može identificirati pojavom crvenog prstena nakon dodavanja Kovacevog reagens. *Salmonella* su indol negativne, pa se nakon dodavanja reagensa ne javlja se promjena boje. Detekcija pokretljivosti moguća je zbog polučvrste prirode medija, idealne za ispitivanje pokretljivosti. Pozitivna reakcija javlja se kod *Salmonella* spp. i očituje se difuznim rastom/zamućenjem koje se proteže iz središnje linije uboda i ukazuje na to da je organizam pokretan. (Hardy Diagnostic, 2022; Liofilchem, 2022).

Simmons citratni agar koristi se za razlikovanje Gram-negativnih bakterija ovisno metaboliziraju li citrat. Simmonsov agar je podloga zelene boje koja se sastoji od natrijeva citrata i bromtimol plavo kao indikatora pH. Ako su mikroorganizmi sposobni za metaboliziranje citrata iz podloge, tada se boja podloge iz zelene (neutralni pH) mijenja u modro plavu (alkalna reakcija). *Salmonella* spp. mogu koristiti citrat, što dovodi do promjene boje medija. Ovaj test pomaže u razlikovanju bakterija unutar porodice Enterobacteriaceae (American Society for Microbiology, 2009).

Lizin dekarboksilaza je biokemijski test kojim se identificiraju bakterije koje mogu razgraditi navedenu aminokiselinu. Većina *Salmonella* spp. dekarboksilizira lizin te dolazi do promjene boje u ljubičastu. Sastav hranjive podloge lizina je glukoza, lizin,

triptofan, bromkrezol ljubičasto kao pH indikator. Ukoliko bakterije mogu metabolizirati lizin, a pri tome koriste glukozu čijom fermentacijom nastaje kiselina koja snižava pH, tada indikator mijenja boju iz ljubičaste u žutu. Kiselo okruženje će potaknuti aktivnost enzima dekarboksilaze, a produkt dekarboksilacije lizina je alkalni spoj. Zbog prisustva alkalnog spoja, pH podloge raste i indikator ponovo postaje ljubičast (Sigma-Aldrich, 2018).

Ureaza biokemijski test sadrži ureu kao izvor ugljika, fenilalanin i fenol crveno (indikator pH vrijednosti). Ako je došlo do razgradnje uree djelovanjem enzima ureaze, kao produkt reakcije nastaje amonijak koji uzrokuje porast pH medija pri čemu indikator mijenja boju medija iz narančaste u boju ciklame. *Salmonella* spp. su ureaza-negativne, dakle medij neće mijenjati boju u ružičastu (American Society for Microbiology, 2016).

2.3.2. Enterobacteriaceae

Enterobakterije su velika heterogena skupina Gram-negativnih štapića koji ne stvaraju spore, fakultativni su anaerobi i dobro preživljavaju u nepovoljnim uvjetima. Optimalna temperatura rasta ovih bakterija iznosi 37 °C. Enterobakterije su katalaza pozitivne i oksidaza negativne bakterije. Stanovnici su probavnog sustava čovjeka i mnogih životinjskih vrsta. Uz stafilokoke i streptokoke, ovaj rod najčešće uzrokuje bolest u ljudi. U probavnom sustavu čovjeka čine 1-2 % ukupne normalne gastrointestinalne mikrobiote (Kalenić, 2013).

Taksonomija enterobakterija je složena jer postoji preko 50 rodova i 250 vrsta. Za identifikaciju ovih bakterija su se nekad koristile samo biokemijske i serološke metode, no danas za koriste i modernije metode poput PCR i DNA-DNA hibridizacije. MacConkey agar je selektivna podloga za uzgoj enterobakterije koja inhibira rast Gram-pozitivnih bakterija i omogućuje razlikovanje laktoza negativnih vrsta koje imaju prozirne kolonije, od laktoza pozitivnih koje imaju ružičaste kolonije (Kalenić, 2013).

Razni članovi obitelji Enterobacteriaceae (*Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* i *Escherichia*) su enteropatogeni zbog sposobnosti proizvodnje enterotoksina koji uzrokuje značajne gastrointestinalne promjene. Štoviše, kao rezultat aktivnosti amin dekarboksilaze enterobakterija, nastaju biogeni amini iz aminokiselina tijekom zrenja

kobasice. Tijekom fermentacije se smanjuje pH kobasica, obično zbog proizvodnje mliječne kiseline, te će niži pH inhibirati rast Enterobacteriaceae. Međutim, ako pH ne padne brzo ili adekvatno (obično ispod 5,0), enterobakterije mogu napredovati. Broj Enterobacteriaceae u kobasici ovisi i o kontaminaciji trupa životinja mikroorganizmima iz probavnog sustava životinja (Al-Mutairi, 2011).

2.3.2.1. Uzgoj i validacija enterobakterija

Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD) koristi se za otkrivanje i brojanje bakterija porodice Enterobacteriaceae u hrani. Ekstrakt kvasca potiče rast bakterija, dok žučne soli i kristal violet inhibiraju Gram-pozitivne bakterije. Glukozni fermentori proizvode crvene kolonije s crveno-ljubičastim aureolama u prisutnosti neutralne crvene, pH indikatora (Laboratories Humeau, 2018).

Za validaciju porodice Enterobacteriaceae koristi se test oksidaza i oksidacijsko-fermentacijski test.

Test oksidaze ključni je test za razlikovanje obitelji Pseudomonadaceae (ox +) i Enterobacteriaceae (ox -), a koristan je za specijaciju i identifikaciju mnogih drugih bakterija. Test oksidaze je biokemijska reakcija kojom se utvrđuje prisutnost enzima citokrom oksidaze. Ako mikroorganizam sadrži enzim citokrom oksidazu, reducirani bezbojni reagens oksidira se u obojeni spoj karakteristične plavo-ljubičaste boje. Wursterovo plavo je ljubičasti spoj koji je lako vidljiv i označava pozitivnu reakciju (American Society for Microbiology, 2010).

Oksidacijsko-fermentacijski test je diferencijalni test koji se koristi za određivanje sposobnosti bakterija da koriste ugljikohidrate bilo oksidativnim metabolizmom (aerobno disanje) ili fermentativnim metabolizmom (anaerobno disanje ili fermentacija). Osobito je koristan u razlikovanju članova obitelji Enterobacteriaceae, ali se obično se koristi za identifikaciju vrste *Pseudomonas*. U slučaju vrsta *Pseudomonas*, one tipično pokazuju oksidativni metabolizam (pozitivna oksidacija) i ne fermentiraju ugljikohidrate (negativna fermentacija), što rezultira plavom bojom u aerobnoj cijevi i zelenom bojom u anaerobnoj cijevi (American Society for Microbiology, 2016).

2.3.3. Koagulaza pozitivni stafilokoki (*Staphylococcus aureus*)

Staphylococcus aureus (dalje u tekstu *S. aureus*) su nepokretni, Gram-pozitivni koki, klasificirani u porodicu Staphylococceae, katalaza pozitivni, oksidaza negativni, fakultativni anaerobi, te anaerobno i mezofilno fermentiraju glukozu i manitol (Gherardi i sur., 2018).

U laboratorijskim uvjetima optimalna temperatura za rast je 37 °C (raspon od 7 do 48 °C). Optimalni pH za rast je 7,0 - 7,5 s rasponom od 4,2 - 9,3. Treba spomenuti sposobnost mikroorganizma da raste pri niskim vrijednostima a_w i visokim koncentracijama soli (20 % NaCl) (Foster, 2002).

Prirodna staništa *S. aureusa* su nos, grlo, kosa, koža i sluznice zdravih ljudi. *S. aureus* povezuje se s nosnim traktom kod 20 – 50 % zdravih ljudi. Bakterija je također prisutna u zraku, prašini, kanalizaciji i na površini opreme za preradu hrane. Kontaminacija hrane općenito dolazi iz navedenih izvora, poglavito od osoba koje rukuju hranom (Tong i sur., 2015).

S. aureus proizvodi enterotoksine ako su količine bakterije od 10^6 do 10^8 CFU/mL. Stafilokokno trovanje hranom nastaje gutanjem enterotoksina zajedno s hranom koju proizvode toksični sojevi *S. aureus*. Toksigeni *S. aureus* proizvodi stafilokokne enterotoksine (SET) koji su termostabilni, tj. ne uništavaju se kuhanjem ili postupkom konzerviranja. Glavni izvori hrane za *S. aureus* su obrađene namirnice kao što su salate, mliječni proizvodi, kreme, sladoledi i pekarski proizvodi punjeni kremom. *S. aureus* može rasti u ukiseljenoj i suhoj hrani, ali sol inhibira proizvodnju toksina (Kadariya i sur., 2014).

U ispitivanjima maloprodajnih suhomesnatih proizvoda utvrđen je visok broj *S. aureusa*. Za rast *S. aureusa* u trajnim i polusuhim kobasicama, način proizvodnje ima vrlo važnu ulogu. Temperatura fermentacije od 30 – 40 °C omogućuje rast *S. aureusa* i proizvodnju stafilokoknih enterotoksina. Prvi dani fermentacije posebno su kritični, a budući da fermentirana kobasica nije stabilna s obzirom na pH i a_w vrijednost, u početnoj fazi fermentacije dolazi do složene mikrobiološke aktivnosti. S obzirom na to da *S. aureus*, koji je otporan na sol i nitrite, također može rasti u anaerobnim uvjetima, postoji povećani rizik da će rasti i proizvoditi toksine (Güzin i sur., 2006).

2.3.3.1. Uzgoj i validacija *S. aureus*

Selektivna podloga za utvrđivanje prisutnosti koagulaza pozitivnih stafilokoka (*S. aureus*) je Baird Parker agar. Baird-Parker je diferencijalni medij pogodan za uzorke iz hrane, okoliša i kliničke uzorke. Sadrži izvore ugljika i dušika potrebne za rast. Nakon inkubacije porast crnih i sivih, sjajnih kolonija s prozirnou zonom („halo“ efekt) karakteriziraju pozitivnu reakciju (Sabljak i sur., 2013).

Sve suspektne kolonije podvrgavaju se plazma testu (eng. Rabbit Coagulase Plasma) koji se koristi za razlikovanje sojeva *Staphylococcus aureus* od *Staphylococcus epidermidis* i drugih koagulaza-negativnih vrsta. Sojevi *S. aureus* obično su sposobni koagulirati plazmu te će proizvesti nakupine stanica na predmetnom stakalcu (American Society for Microbiology, 2016).

DNAza test je biokemijski test koji se koristi za identifikaciju organizama koji proizvode enzim deoksiribonukleazu. U mediju DNAza testa, tripton osigurava hranjive tvari za rast, a natrijev klorid održava osmotsku ravnotežu. Visikomolekularna deoksiribonukleinska kiselina omogućuje detekciju deoksiribonukleaze (DNase) koja depolimerizira DNA. Nakon primjene klorovodične kiseline na medij, DNaza pozitivni mikroorganizmi bit će okruženi prozirnou zonom. Ovaj test je posebno koristan za razlikovanje vrsta *Staphylococcus*, odnosno za razlikovanje *Staphylococcus aureus* (koji je obično DNAza pozitivan) od drugih vrsta stafilokoka (Kateete i sur., 2010).

2.3.4. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je Gram-pozitivni pokretni fakultativni anaerob koji nastanjuje različite ekološke niše. Pomoću selektivnih medija može se lako izolirati iz tla, vode i vegetacije, uključujući sirove proizvode namijenjene ljudskoj prehrani. Površinska kontaminacija mesa i povrća je relativno česta. Osim toga, bakterija je prolazni stanovnik i životinjskog i ljudskog gastrointestinalnog trakta (Popović i sur., 2008).

Rod *Listeria* taksonomski je vrlo slična porodici Lactobacillaceae, a prema novoj klasifikaciji sastoji od 17 vrsta. Među najznačajnije vrste ubrajaju se: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* i *L. murrayi*.

U rodu *Listeria* predvladavaju fakultativno anaerobne i psihrotolerantne bakterije, koje su iznimno rezistentne na nepovoljne uvjete u okolišu, iako ne mogu proizvoditi spore.

Preživljavaju na temperaturama između - 1°C do + 45 °C, u pH rasponu od 4.0 - 9.5. Upravo ta sposobnost *Listeria* da prežive temperature od oko 0 °C je najvažnija karakteristika svih vrsta u rodu, te stoga predstavlja i velik rizik za zdravlje potrošača. Rastući u hladnjaku, *L. monocytogenes* može postići minimalnu infektivnu dozu za izazivanje listerioze. *L. monocytogenes* reagira na niske temperature modificirajući kompoziciju masnih kiselina svoje lipidne membrane. U hladnim uvjetima ona reducira brojnost dugih lanaca masnih kiselina i proporcionalno povećava kratke lance, koji imaju nižu točku smrzavanja (Duraković i sur., 2001).

Listeria monocytogenes vrlo dobro podnosi uvjete smanjene vlažnosti te tako može preživjeti duže razdoblje u kobasicama, fermentiranim salamama i fermentiranim sirevima. Pokazalo se kako *L. monocytogenes* preživljava tijekom proizvodnje suhomesnatih proizvoda ako je početna kontaminacija $>10^3$ CFU/g. *L. monocytogenes* prilično je tolerantna na natrijev klorid. Studije su pokazale kako bakterija raste i u 10 % NaCl, te zbog toga dodavanje 2,0 - 3,5 % soli u suhe kobasice ne može eliminirati bakteriju. Rezultati studije također pokazuju kako povećanje razine nitrita i nitrata u kobasicama ima značajan učinak na eliminaciju listerije. Količine ovih aditiva korištene u mesnim proizvodima imale su najbolji bakteriostatski učinak na *L. monocytogenes*, ali ne mogu u potpunosti eliminirati bakterije kod značajnije kontaminiranih kobasica. Predloženo je da se antimikrobna aktivnost NaNO_2 može postići samo s >3 % NaCl i $\text{pH} < 5,5$ na temperaturama hlađenja. Povećanje samo razine nitrita u kobasicama nije dovoljno učinkovito u kontroli rasta i preživljavanja ovih mikroorganizama. Dakle, rast *L. monocytogenes* u kobasicama potisnut je sinergizmom soli, nitrita i pH. Također, nitrati su važni u inhibiciji *Listeria monocytogenes* zbog svojih antimikrobnih svojstava, proizvodnje dušikovog oksida i sposobnosti da pojačaju učinke drugih metoda konzerviranja, pridonoseći sigurnosti i stabilnosti hrane (De Daza i sur., 1991; Ruggeri i sur., 2018).

2.3.4.1. Identifikacija i validacija *Listeria monocytogenes*

Dokazivanje prisutnosti i određivanja broja bakterija *L. monocytogenes* i drugih *Listeria* spp. provodi se prema međunarodnim standardnim metodama, ISO 11290-1:2017 i ISO 11290-2:2017.

Half Fraser bujon koristi se kao primarni bujon za obogaćivanje u ISO metodologiji za detekciju *Listeria* spp. i *Listeria monocytogenes*. Svrha Half Fraser bujona je osigurati pogodno okruženje za rast *Listeria* uz istovremeno suzbijanje proliferacije drugih bakterijskih vrsta. Fraser otopina sadrži eskulin koji ukazuje na prisutnost potencijalnog izolata *Listeria*. *Listeria* spp. hidrolizira eskulin kako bi nastao eskuletin, koji reagira s feri-amonijevim citratom što rezultira crnim talogom i vidljivom pozitivnom reakcijom. Ove komponente djeluju zajedno kako bi stvorile okruženje koje sprječava rast nepoželjnih mikroorganizama, dok istovremeno potiče rast *Listeria* (ThermoFisher Scientific). Fraser-ov bujon se zatim precjepljuje na čvrstu selektivnu podlogu i detektira bakteriju *L. monocytogenes*. Jedna od selektivnijih podloga koja se za tu svrhu koristi je OAA (Ottaviani agosti) selektivni agar. Zelene kolonije na OAA agaru su dobar pokazatelj da je *Listeria monocytogenes* možda prisutna, a za točnu identifikaciju provode se daljnji potvrdni testovi (Vlaemynck i sur., 2000).

U svrhu identifikacije bakterije *Listeria monocytogenes* koristi se API Listeria test, a u svrhu identifikacije bakterije koristi se i MALDI- TOF MS analiza.

API Listeria je standardizirani sistem za identifikaciju *Listeria* spp. Temelji se na minijaturnim testovima i specijalno prilagođenoj bazi podataka. Sve su kulture testirane i identificirane korištenjem identifikacijskog kompleta API Listeria koji se sastoji od sustava 10 mikroepreveta koje sadrže dehidrirane supstrate za enzimske testove ili testove fermentacije šećera. API Listeria test kit uključuje supstrat peptidaze amino kiseline (DIM reakcija) koji hidroliziraju sve vrste *Listeria* osim *Listeria monocytogenes*. API Listeria je namijenjen samo za identifikaciju bakterija koje pripadaju rodu *Listeria* koje su uključene u bazu podataka, te se stoga ne može koristiti za identifikaciju bilo kojeg drugog mikroorganizma. Točnost testa je 98,91 %.

MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization time of flight) se koristi za brzu, kemotaksonomsku identifikaciju bakterija. MALDI TOF metoda se zasniva na prevođenju i ioniziranju masivne, termolabilne i nehlapive molekule u

plinsku fazu. TOF označava time of flight, odnosno vrijeme detektiranja mase čestice. Temelji se na ionizaciji ko-kristaliziranog uzorka materijala kratkim laserskim impulsima. Ioni se ubrzavaju i mjeri im se vrijeme leta u vakuumu. Ionizirane molekule su ubrzane kroz elektrostatičko polje i izbačene kroz metalnu cijev pod vakuumom do detektora. Manji ioni putuju brže od većih, omogućujući razdvajanje molekula prema vremenu leta (TOF). Na taj način dobiva se maseni spektar, sastavljen od pikova omjera mase (m) i naboja (z) različitih intenziteta. Spektar služio kao jedinstveni mikrobní otisak, koji uspoređuje s bazom podataka za identifikaciju mikroorganizama na razini vrste ili roda (Croxatto i sur., 2012).

2.3.5. Sulfitreducirajuće klostridije

Klostridije su prilično heterogena skupina bakterija, stoga nije dostupan medij koji bi poticao rast svih klostridija te istovremeno zaustavljao rast cjelokupne kompetitivne flore. Većina klostridija u anaerobnim uvjetima reducira sulfit u sulfid uz pojavu crnih točkica željeznog sulfida. *Clostridium* spp. su anaerobne bakterije koje se najčešće povezuju s hranom. Bakterije ovog roda prisutne su u tlu, mulju i prašini, ali i u probavnom sustavu ljudi i životinja. Pokazuju veliku raznolikost u metaboličkoj aktivnosti i nutritivnim zahtjevima.

U skupinu sulfitreducirajućih klostridija spadaju bakterije *C. perfringens* i *C. botulinum*, koje su jedan od najčešćih uzročnika bolesti prilikom konzumacije kontaminiranih namirnica. Sulfitreducirajuće klostridije često su povezane s fekalnom kontaminacijom hrane. Ove bakterije rastu u uvjetima bez prisutnosti kisika, a u nepovoljnim uvjetima stvaraju spore. Endospore koje stvaraju Gram-pozitivne bakterije uzrokuju histotoksične i gastrointestinalne bolesti kod ljudi i životinja (Bredius i sur., 2003).

Spore *Clostridium perfringens* i druge anaerobne spore koje reduciraju sulfite ostale su prisutne i nakon duljeg skladištenja u soli. Naknadna obrada kobasica, kao što je pasterizacija ili povećanje aktivnosti vode, može potaknuti bakterijske spore da se vrate u svoje vegetativno stanje, uzrokujući velike zdravstvene rizike za krajnjeg potrošača. Nitriti se tradicionalno koriste za kontrolu *Clostridium botulinum* u suhomesnatim proizvodima. Međutim, u slučaju trajnih fermentiranih kobasica, okolišni čimbenici kao što su pH, a_w i konkurentna mikrobiota mogu imati važniju ulogu od nitrita

u inhibiciji rasta i proizvodnje toksina *C. botulinum* (Hospital i sur., 2016).

2.3.5.1. Detekcija i validacija sulfitreducirajućih klostridija

Iron Sulphite Agar (ISA) je medij koji se koristi za detekciju sulfitreducirajućih klostridija. Medij je namijenjen ispitivanju hrane, stočne hrane i okolišnih uzoraka u području proizvodnje i rukovanja hranom. H₂S-pozitivne bakterije u mediju reduciraju sulfit u sulfid, koji reagira sa željezom. Zbog navedene reakcije, stvaraju se crni kolonije. Nakon inokulacije uzoraka na ISA emdiju, posude se stavljaju u anaerobne komore ili inkubatore. Ovo osigurava da se uzorci nalaze u potpuno anaerobnom okruženju koje je pogodno za rast sulfit-reducirajućih klostridija. Ako se na podlogama pojave karakteristične crne kolonije, tada su uzorci potencijalno pozitivni na klostridije (Prevost i sur., 2013).

Prisutnost crnih kolonija traži daljnju analizu s ciljom potvrde sulfitreducirajućih klostridija u uzorcima. Mikroskopska analiza, uključujući bojenje po Gramu može otkriti Gram-pozitivne štapiće karakteristične za klostridije. Od ostalih analiza bitni su biokemijski testovi, poput testova fermentacije i proizvodnje plina. Također, uzgoj bakterija na dodatnim selektivnim ili diferencijskim medijima može pomoći u identificiranju vrsta klostridija. Biokemijska analiza koristeći API (Analytical Profile Index) sustave mogu dodatno potvrditi identitet bakterija. U svim fazama mikrobiološke analize, usporedba analize s drugim potvrđenim metodama pomaže u osiguravanju točnosti rezultata (Bredius i sur., 2003).

2.4. Aerobne mezofilne bakterije

Aerobne mezofilne bakterije (AMB) su široka skupina bakterija koje najbolje rastu pri temperaturama od 20 do 40 °C (mezofilno) te u prisutnosti kisika (aerobno). Ove bakterije su pokazatelji kvalitete hrane, ali ne sigurnosti hrane. Ako se pojavi veliki broj aerobnih mezofilnih bakterija, važno je identificirati tip mikroorganizama koji prevladava. Povećan broj ovih bakterija u hrani upućuje na starost i lošiju mikrobiološku kakvoću namirnice (kontaminaciju i/ili početak kvarenja). Prema Vodiču (2011) za kategoriju hrane „Trajne kobasice i drugi trajni suhomesnati proizvodi“ nije

određeno koliko aerobnih mezofilnih bakterija može biti u toj kategoriji. Broj AMB koristi se kao dio opće procjene kakvoće hrane. Manje od 10^6 CFU/g AMB obično je povezano s mješovitom mikrobiotom, a iznad ove razine obično prevladava jedna populacija.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorkovanje

Za potrebe ovog rada prikupljeno je i analizirano ukupno 20 različitih uzoraka trajnih fermentiranih kobasica u razdoblju od ožujka 2023. do svibnja 2023. Kobasice su prikupljene s malih obiteljskih gospodarstava i iz domaćinstva iz grada Županje i okolice.

Tablica 3.1.1 Podrijetlo prikupljenih uzoraka kobasica

Uzorak	Obiteljsko-poljoprivredno gospodarstvo (OPG)/ Domaća radinost (DR)
1	DR
2	DR
3	OPG
4	DR
5	DR
6	DR
7	DR
8	DR
9	DR
10	DR
11	DR
12	DR
13	DR
14	OPG
15	OPG
16	DR
17	OPG
18	DR
19	OPG
20	DR

Svi uzorci kobasica (n=20) su zrele kobasice spremne za konzumaciju, izrađene od svinjskog mesa (leđa, but, leđna slanina), sa dodacima kuhinjske soli, mljevene crvene paprike (ljute i slatke), papra i bijelog luka. Ukupno trajanje proizvodnje iznosilo je oko 90 dana. Uzorci kobasica su rezani steriliziranim nožem i stavljani u čiste vakuum vrećice, vakuumirani i označeni analitičkim brojem. Vrećice s kobasicama su odmah stavljene u hladnjak na temperaturu +4 °C.

Potom su uzorci transportirani na Odjel za mikrobiološke analize hrane, predmeta opće uporabe i okolišnih uzoraka u NZJZ „Dr. Andrija Štampar“ gdje su provedene analize. Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu u trajnim kobasicama ispitana je se brojnost i/ili prisutnost AMB, *Salmonella* spp., Enterobacteriaceae, koagulaza pozitivnih stafilokoka/ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i sulfitreduirajućih klostridija.

3.2. Materijali

Za potrebe istraživanja korišteni su odgovarajući instrumenti i pribor. Sav pribor koji je upotrebljavan tijekom istraživanja bio je steriliziran, opran, očišćen i suh. U korišteni pribor i aparaturu ubrajaju se:

- pincete,
- laboratorijske žlice,
- škare,
- nožići,
- vaga,
- sterilne vrećice,
- jednokratne sterilne eze,
- predmetno stakalce,
- pipete,
- kivete,
- termostati,
- homogenizator (Smasher, AES Laboratoires, Njemačka),
- uređaj za mjerenje aktiviteta vode (AquaLab LITE, Decagon, Sjedinjene Američke Države),

- uređaj za mjerenje pH vrijednosti (XS Instruments, Italija)
- MALDI TOF MS uređaj (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization and Time of Flight Mass Spectrometry), (Vitek MS, bioMerieux, Francuska)

BIOKEMIJSKI TESTOVI

- API Listeria test (API LISTERIA, bioMerieux, Francuska)
- plazma test (reagens staph-ase)
- DNA test (reagens DNase)
- Katalaza test
- Oksidaza test
- Oksidacijsko-fermentacijski (eng. oxidation-fermentation) test
- Biokemijski niz: trostruki šećer, SIM (sulfide, indol, motility), Simmons citratni agar, lizin, ureaza test

KEMIKALIJE

- 1M HCL (NZJZ „Dr. Andrija Štampar“)
- vodikov peroksid (3%-tni)
- Kovacov reagens

MEDIJI

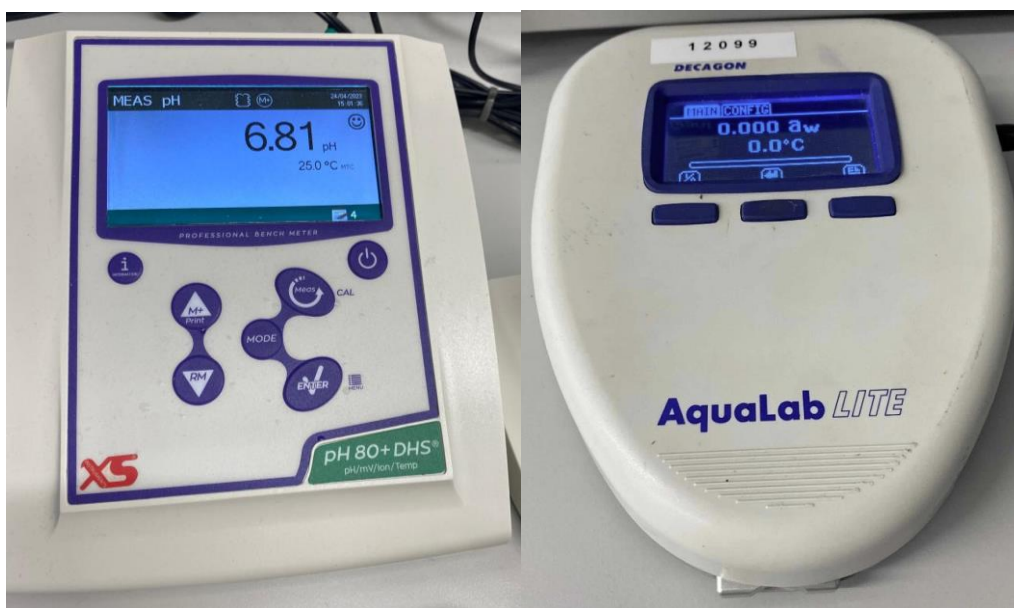
Sve podloge su pripremljene na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“.

- PPV- puferska peptonska otopina
- OAA- Ottaviani agosti agar
- BP- Baird-Parker agar
- VRBD- violet red bile dextrose agar
- XLD- ksiloza lizim deoksiholat
- KA- krvni agar
- DNAza agar
- half Fraser i Fraser otopina

3.3. Mjerenje aktiviteta vode i pH vrijednosti

Uzorci (n=20) su pripremljeni za mjerenje aktiviteta vode (a_w) tako da su se sterilnim nožićem narezali na sitne dijelove kojima su ispunjene plastične ispitne posudice. Plastične posudice su postavljene na predviđeno mjesto u uređaju, a mjerenje je obavljeno nakon nekoliko sekundi (AquaLab LITE, Decagon Devices, Sjedinjene Američke Države).

Kako bi se odredila pH vrijednost uzoraka kobasica, u Falcon epruvetu odpipetirano je oko 5 ml uzorka prethodno dobro homogeniziranog u PPV (peptonskoj) otopini. Zatim je svaka epruveta uronjena u sondu uređaja (pH 80+ DHS, XS Instruments, Italija) i očitana je pH vrijednost. Korišteni uređaji prikazani su dolje (Slika 3.3.1).



Slika 3.3.1. Uređaj za mjerenje pH vrijednosti (lijevo); uređaj za mjerenje aktiviteta vode (desno)

3.4. Izolacija i identifikacija indikatorskih mikroorganizama

Za izolaciju i identifikaciju bakterija prema uputama u Vodiču (2011) koriste se HRN EN ISO metode, odnosno ISO metode prema Uredbi 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu prethodno opisane u pregledu literature.

Tablica 3.4.1. Popis bakterija prema Vodiču, pripadajuće hranjive podloge, specifikacije inkubacije i odgovarajuće ISO norme

Patogen	Hranjive podloge	Inkubacija	ISO norma
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird-Parker agar (BP)	37 °C / 24-48 h	HRN EN ISO 6888-1:2021 Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Horizontalni postupak brojenja koagulaza– pozitivnih stafilokoka (<i>S. aureus</i> i druge vrste)- 1. dio: Postupak primjene Baird Parkerove hranjive podloge na agaru
Enterobacteriaceae	Ljubičasto-crveno žučni glukoza agar (Violet red bile glucose/dextrose agar – VRBG/VRBD agar)	37 °C / 24 h	HRN ISO 21528-2:2008 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae – 2.dio: Metoda određivanja broja kolonija
<i>Salmonella</i> spp.	Rappaport-Vasiliadis bujon (Merck), Muller-Kauffman etrationat /novobiocin bujon (Merck), Brilljant fenol laktoza sukrozaagar (BPLS) (Merck) XLD (Merck)	37 °C / 16 h 42 °C / 24 h 37 °C / 48 h 37 °C / 24 h 37 °C / 48 h	HRN EN ISO 6579-1:2017 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti <i>Salmonella</i> spp.
Sulfitreducirajuće klostridije	Sulfit Polimiksin Sulfadiazin Agar (SPS)	37 °C / 3 + 5 d	HRN ISO 15213-1:2023 Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima
<i>Listeria monocytogenes</i>	Half-Fraser bujon (Merck) Fraser-bujon (Merck) Palcam (Merck) Ottaviani Agosti agar (OAA) (BioMerieux)	30 °C / 24-48 h 37 °C / 48 h 37 °C / 24 h 37 °C / 24 - 48 h	HRN EN ISO 11290-2:2017 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja <i>Listeria monocytogenes</i> – 1. dio:Metoda dokazivanja – Amandman 1: Modifikacijapodloge za izolaciju, test hemolize i uključivanje podataka o točnosti

Svi uzorci kobasica su izvađeni iz vakuum vrećica i stavljeni na papirnate ubruse. Sterilni skalpel i sterilna pinceta služili su kao pribor prilikom narezivanja kobasica na sitnije komade, a pincetom su se pridržavali uzorci i odstranjivao ovoj kobasica.

Priprema uzoraka za mikrobiološku analizu započela je uzimanjem određene količine uzorka (10 - 25 g), koji se zatim homogenizira u puferiranoj peptonskoj vodi u omjeru 1:9. Ovisno o vrsti bakterije koja se ispituje, može se koristiti i druga vrsta bujona koji pogoduje rastu specifičnih mikroorganizama. Na primjer, za selektivni uzgoj određenih patogenih bakterija mogu se koristiti specifični mediji koji potiču njihov rast, a inhibiraju druge bakterije.

Nakon homogenizacije uzorka u puferiranoj peptonskoj vodi ili odgovarajućem bujonu, pripremljeno je osnovno razrjeđenje, u omjeru 1:10, iz kojeg su dalje napravljena dodatna decimalna razrjeđenja do razine 10^2 ili više. Razrjeđenja omogućuju precizniju kvantifikaciju mikroorganizama prisutnih u uzorku.

Mikrobiološka pretraga nastavljena je prema specifičnim uputama pojedine norme, što podrazumijeva inkubaciju uzorka na odgovarajućim temperaturama i vremenskim periodima kako bi se omogućio rast ciljanih mikroorganizama. Nakon inkubacije, kolonije su prebačene na selektivne i diferencijalne hranjive podloge koje omogućuju identifikaciju i diferencijaciju različitih vrsta bakterija.

3.5. Dokazivanje indikatorskih mikroorganizama

3.5.1. Uzgoj i potvrda *Salmonella* spp.

Postupak dokazivanja prisutnosti bakterija iz roda *Salmonella* spp. proveden je u skladu sa zahtjevima norme ISO 6579-1:2017; EN ISO 6579-1:2017.

Analiza je započela pripravom inicijalne suspenzije koja se pripremila iz 25 g ispitnog uzorka u 225 ml medija za prednamnažanje (puferirana peptonska otopina). Slijedila je inkubacija inicijalne suspenzije na temperaturi od 37 °C/ 24h. Zatim se odpipetiralo 0,1 ml inkubirane suspenzije na RVS (Rappaport-Vassiliddis Soya) agaru i inkubiralo na 42 °C/ 24h. Potom su se ezom nanijela suspenzija s RVS medija na

XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) selektivnu čvrstu podlogu te je slijedila inkubacija na 37 °C / 24h. Porast crnih kolonija na crvenoj podlozi označavao je pozitivnu reakciju.

Postoje dobro uspostavljeni postupci potvrde i identifikacije za *Salmonella* spp. Preliminarna identifikacija temeljena na izgledu kolonija na selektivnim agar podlogama tradicionalno se potvrđuje klasičnim biokemijskim testovima na salmonelu. Ključni biokemijski testovi su fermentacija glukoze, negativna reakcija ureaze, lizin dekarboksilaza, negativan indol test i proizvodnja H₂S.

Odabrane su izolirane kolonije iz čiste kulture s agara i prenesene u sterilnu epruvetu koja sadrži 5 - 10 mL sterilne fiziološke otopine (0,85 % NaCl). Epruveta je lagano promiješana kako bi se stvorila suspenzija bakterija. Nakon inokulacije, sve podloge su inkubirane 37 °C/ 24h.

Za test trostruki šećer bilo je potrebno inokulirati suspenziju u dubinu i kosinu medija. Pozitivna reakcija rezultirala je time da jedna polovica medija ostala žute, dok je druga polovica roza boje.

SIM test proveden je tako što se nakon inkubacije dodalo nekoliko kapi Kovačevog reagensa, te su se promatrala tri različita parametra- redukcija sumpora, pokretljivost i nastanak indola. Pojava crvenog prstena, crnog taloga i difuznog rasta duž linije uboda znači da je test pozitivan.

Simmons citratni agar se proveo tako što se dobivena suspenzija inokulirana po kosini i dubini medija. Nakon inkubacije, plava boja medija označavala je pozitivnu reakciju, a zelena negativnu.

Kako bi se proveo lizin test, inokulirana suspenzija je dodana neposredno ispod površine tekućeg medija. Ljubičasto obojenje znači pozitivnu reakciju, a žuto obojenje negativnu.

Test ureaze se proveo tako što se ezom nacijepila suspenzija na kosinu. Ako je nakon inkubacije boja fenol crvena, znači da je reakcija pozitivna. Tipične salmonela vrste ne hidroliziraju ureu (agar ostaje ne promijenjene, žute boje).

Izgled testova biokemijskog niza u epruvetama, kao i pojedine promjene boja prikazan je niže u tekstu (Slika 3.5.1.1).



Slika 3.5.1.1 Biokemijski niz (slijeva nadesno): trostruki šećer, SIM medij, Simmons citratni agar, lizin test, ureaza test

3.5.2. Uzgoj i identifikacija bakterija porodice Enterobacteriaceae

Diferencijacija i identifikacija porodice Enterobacteriaceae uključuje kombinaciju fenotipskih testova, molekularnih metoda, a ponekad i seroloških testova. Analiza se proveda prema zahtjevima norme HRN ISO 21528-2:2008.

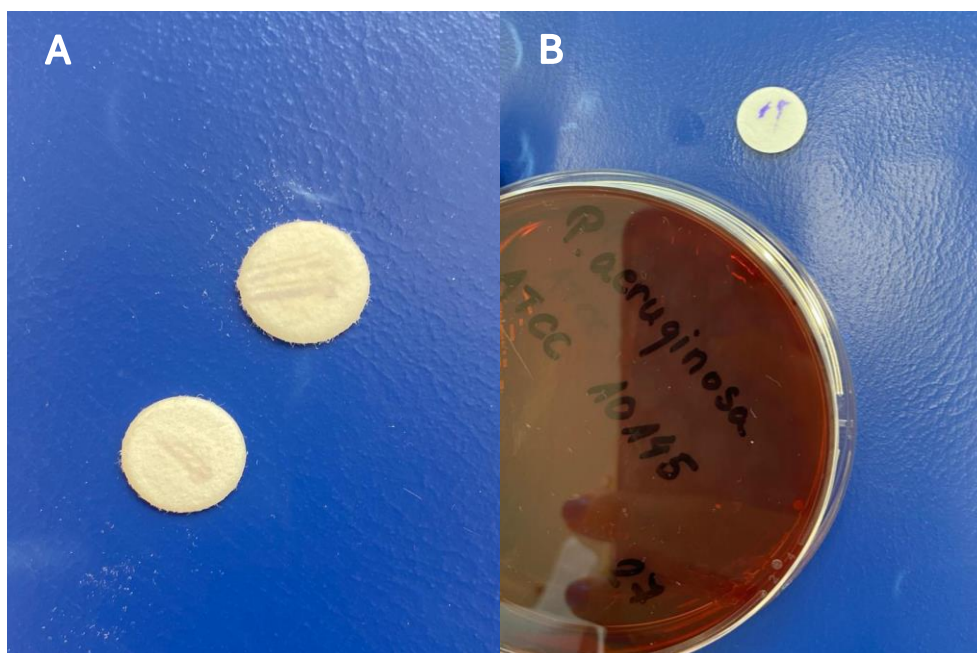
Uzorci su se pripremili za mikrobiološku pretragu uzimanjem određene količine uzorka (25 g) te homogeniziranjem u puferiranoj peptonskoj vodi u omjeru 1:9. Slijedi inkubacija inicijalne suspenzije na temperaturi od 37 °C / 24 h. Potom je odpipetirano 0,1 ml suspenzije na selektivnu VRBD podlogu.

Pojava ružičastih, crvenih, žarko ljubičastih ili bezbojnih sluzavih kolonija, prikazanih na Slika 3.5.2.1., označava rast potencijalnih enterobakterija. Zatim je pet suspektnih kolonija precijepljeno na VRBD agar i inkubirano na 37 °C / 24 h.



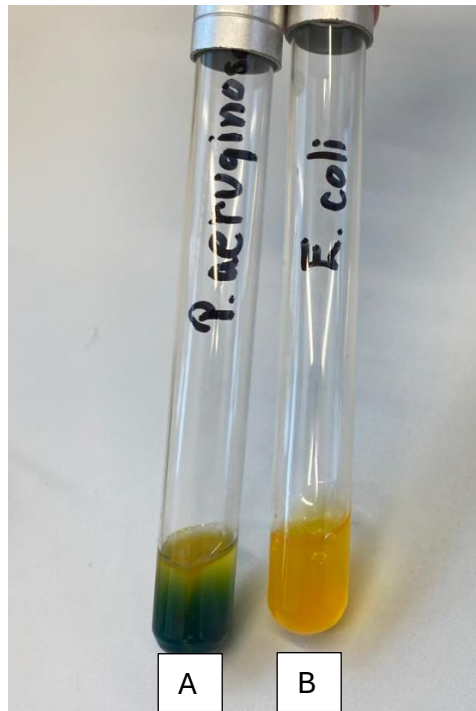
Slika 3.5.2.1. VRBD medij sa suspektnim kolonijama Enterobacteriaceae

Prvi biokemijski test kojim su validirane bakterije porodice Enterobacteriaceae je test oksidaze. Na filter papir stavljeno je nekoliko kapi reagensa oksidaze. Sterilnom ezom uzeta je jedna suspektna kolonija s VRBD podloge i razmazana po mokrom papiru. Pozitivan rezultat rezultira tamnoljubičastom ili plavom (prisutnost citokrom c oksidaze) bojom (Slika 3.5.2.2).



Slika 3.5.2.2. A) Negativan test oksidaze (žučkasto obojenje), B) Pozitivan test oksidaze (ljubičasto-plavo obojenje)

Oksidacijsko-fermentacijski test proveden je u anaerobnim uvjetima u dvije epruvete, tako što su se nakon inokulacije iste prebile mineralnim uljem. Epruvete su se inkubirale na odgovarajućoj temperaturi (37 °C/ 24 - 48h). Nakon inkubacije, promatrao se rast i promjena boje medija u epruveti (Slika 3.5.2.3).



Slika 3.5.2.3. A) *Pseudomonas aeruginosa* ne fermentira glukozu (plava boja), B) *Escherichia coli* fermentira glukozu (žuta boja)

3.5.3. Uzgoj i identifikacija *Staphylococcus aureus*

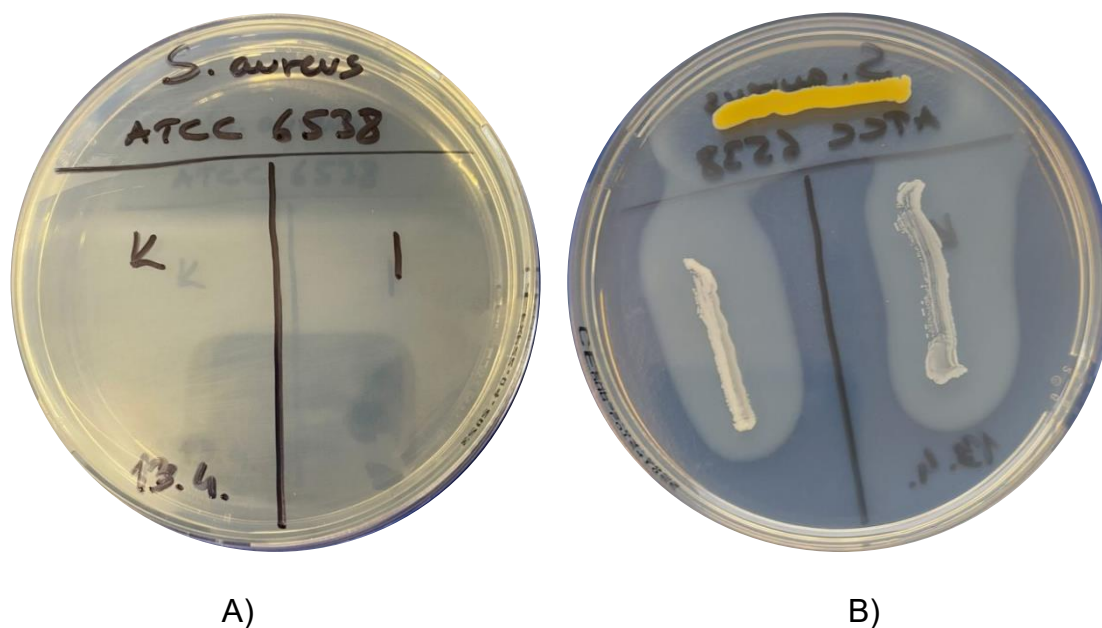
Uzgoj i identifikacija *Staphylococcus aureus* u laboratorijskim uvjetima provodi se prema određenim standardima i metodama, koje uključuju mikrobiološke, biokemijske, i molekularne tehnike. Postupak uzgoja *S. aureus* pratio je zahtjeve norme HRN EN ISO 6888-1:2021.

Analiza je započela pripravom inicijalne suspenzije koja se pripremala iz 25 g ispitnog uzorka u 225 ml medija za prednamnažanje (puferirana peptonska otopina). Slijedila je inkubacija inicijalne suspenzije na temperaturi od 37 °C/ 24 h. Potom se odpipetiralo 0,1 ml inkubirane suspenzije na Baird-Parker agar i inkubiralo na 37 °C/ 24 h. Nakon inkubacije, ploče su pregledane na suspektne kolonije sa crnim središtem.

Kako bi među poraslim kolonijama identificirali *Staphylococcus aureus*/ koagulaza pozitivni stafilokoki korišteni su biokemijski testovi (plazma test, DNAza test).

Za potrebe plazma testa u petrijevoj zdjelici je pomiješana suspektna kolonija s Baird-Parker agara s prethodno dodanom plazma kunića. Reakcija je negativna ako se pojavi mliječno-bijelo zamućenje. Bakterija je koagulaza pozitivna ako se pojavi mrvičasto-pahuljasto zamućenje.

DNAza test proveden je na način da je DNAza agar sa suspektnim kolonijama inkubiran na 37 °C/ 24 h te je nakon inkubacije ploča prelivena s 1 M klorovodične kiseline koja taloži polimeriziranu DNA, čineći medij neprozirnim. Organizmi koji razgrađuju DNA stvaraju čistu zonu oko područja rasta. Paralelno, kao pozitivna kontrola korišten je *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 koji je inokuliran na gornjem dijelu čvrste DNA podloge . Na ostatku podloge na dvije polovice su nanesen brisevi usne šupljine dviju osoba. Pozitivna reakcija potvrđena je čistom zonom oko područja rasta (Slika 3.5.3.1).



Slika 3.5.3.1. A) princip DNA testa (ATCC referentni uzorak, „K“ i „I“ uzorci brisa usne šupljine), B) Rezultat: čista zone oko referentnog soja i brisa usne šupljine

MALDI-TOF MS analiza za identifikaciju *Staphylococcus aureus* provedena je korištenjem standardiziranog protokola za mikrobiološku identifikaciju pomoću VITEK MS (bioMérieux, Francuska) sustava. Izolirane kolonije prikupljene su s BP medija i prenesene na vodljivu metalnu pločicu za analizu. Svaka pozicija na pločici označena

je za različite uzorke. Označavanje može uključivati numeričke ili alfanumeričke oznake, kako bi se osiguralo da se svaki uzorak može lako razlikovati nakon analize. Nakon nanošenja matrice, smjesa uzorka i matrice kristalizirala je na sobnoj temperaturi. Pločica je zatim uvedena u maseni spektrometar. Dobiveni spektri uspoređeni su s bazom podataka, čime je omogućena identifikacija *Staphylococcus aureus* na razini vrste. Dobiveni spektri uspoređeni su s referentnim spektromima u bazi podataka MALDI-TOF softvera. Softver identificira bakteriju na temelju usporedbe pikova i njihovih intenziteta s poznatim vrijednostima.

3.5.4. Uzgoj i identifikacija *Listeria monocytogenes*

Za izdvajanje listerija korištena je standardizirana horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti *Listeria monocytogenes* u mikrobiologiji hrane i hrane za životinje HRN EN ISO11290-1:2017. Norma propisuje primarno i sekundarno umnažanje u selektivnom bujonu te naciepljivanje i dokazivanje na selektivnim hranjivim podlogama, nakon čega slijedi potvrda prema morfološkim i biokemijskim osobinama.

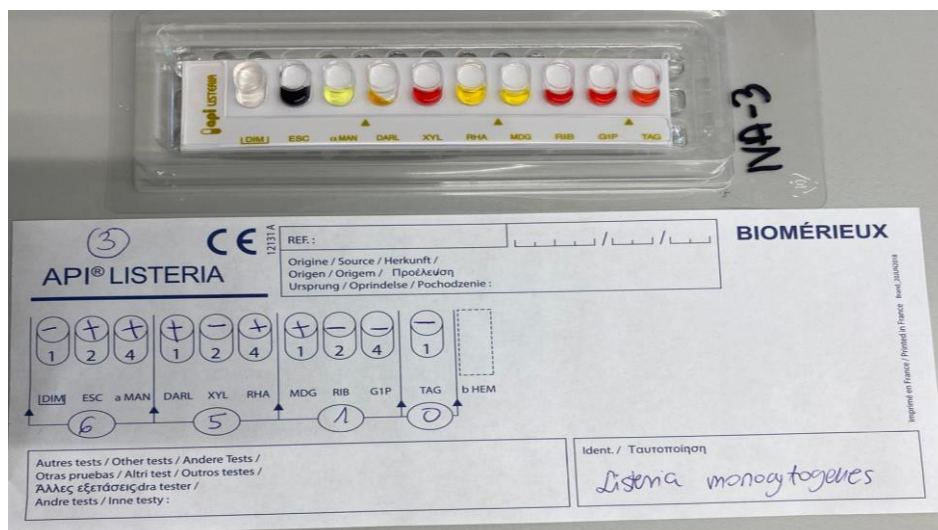
Uzorak (25 g) kobasica inkubiran je s primarnim medijom za prednamnažanje Half-fraser u omjeru 1:9, te je stavljen na inkubaciju na 37 °C/ 24 h. Nakon inkubacije, 0,1 ml uzorka je transferirano u sterilnu kivetu s 10 ml Fraser bujona. Poslije inkubacije na 24 h i 37 °C, uzorak je naciepljen ezom na hranjive čvrste selektivne podloge OAA (Ottaviani Agosti agar) u vidu linije, te se razvukao po površini hranjive ploče kako bi se dobile pojedinačne kolonije. Slijedila je inkubacija na 37 °C/24 h nakon koje su ploče pregledane kako bi se utvrdila prisutnost suspektne kolonije *Listeria* spp. Suspektne kolonije su zelenkasto-plave boje na žutoj podlozi. Kako bi mogli utvrditi prisutnost *L. monocytogenes*, norma nalaže da se suspektne kolonije precijepu na neselektivni krvni agar tijekom 24 h na 37 °C kako bi se mogli sprovesti daljnji potvrdni testovi.



Slika 3.5.4.1. Prikaz karakterističnih zeleno-plavih kolonija *Listeria* spp. na OAA agaru

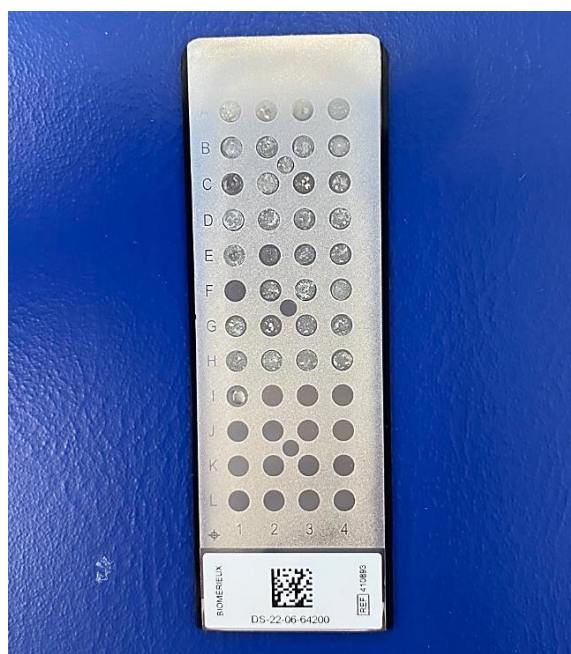
Neobavezni potvrdi test za dokazivanje *Listeria monocytogenes* provodi se testom katalaze. Test katalaza se proveo tako što se ezom prenijela izolirana kolonija na predmetno stakalce, te su na uzorak dodane 2-3 kapi 3%-tnog vodikovog peroksida.

Kao metoda za identifikacije *Listeria* spp. služio je standardizirani sistem API Listeria (Biomerieux, Francuska). Korištena je API suspenzija 2 ml (demineralizirana voda) kao medij i reagensi ZYM B 3 ml (Fast Blue BB, 2- metoksietanol), McFarland standard (etalon gustoće 1). Uzorci često sadrže mješavinu nekoliko *Listeria*, stoga se preporuča napraviti subkulturu (24h i 37 °C) na krvnom agaru pomoću jedne dobro izolirane kolonije. Inkubacijska komorica je poprskana s destiliranom ili demineraliziranom vodom, kako bi se stvorila vlažna atmosfera. Na stijenku epruvete se ezom razmazala svježa kolonija koja je potom homogenizirana u suspenziji. Bakterijska suspenzija korištena je kao radna otopina s vrijednošću od 1 McF. Jažice API Listeria testa su zatim ispunjene radnom suspenzijom pazeći pri tome da se se u jažice ne upuše zrak. Slijedila je inkubacija na 24h i 37 °C u aerobnim uvjetima. Identifikacija je izvršena pomoću numeričkog profila koji se određen zbrajanjem pozitivnih vrijednosti unutar svake grupe reakcija, čime se dobio četveroznamenkasti numerički profil. Slika 3.5.4.2 prikazuje listić za identifikaciju *Listeria monocytogenes* pomoću numeričkog profila API Listeria (BioMerieux, Francuska).



Slika 3.5.4.2. API Listeria- prikaz listića za identifikaciju *Listeria* spp.

Za identifikaciju izoliranih mikroorganizama korištena je MALDI-TOF MS analiza. Suspektna kolonija je sterilnim štapićem pomiješana s matricom na vodljivoj metalnoj ploči (Slika 3.5.4.3). Nakon sušenja i kristalizacije matrice i uzorka, metalna ploča je uvedena u maseni spektrometar. Ploča je potom bombardirana kratkim laserskim impulsima, što je uzrokovalo desorpciju i ionizaciju molekula uzorka. Za provjeru točnosti analize, na ploču je dodan i referentni soj *Escherichia coli* ATCC 25922.



Slika 3.5.4.3. Pločica za MALDI-TOF MS

3.5.5. Određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija

Određivanje ukupnog broja mikroorganizama prema normi HRN EN ISO 4833:2008 odnosi se na aerobne mezofilne bakterije, koje rastu na temperaturama između 20-45 °C uz prisutnost kisika. Optimalna temperatura rasta za većinu ovih bakterija je 37 °C, što znači da ova skupina uključuje i mnoge patogene mikroorganizme. Brojanje aerobnih mezofilnih bakterija provedeno je na krvnom agaru. Uzorci su prvo razrijeđeni serijskim decimalnim razrjeđenjima kako bi se postigla odgovarajuća koncentracija za brojanje kolonija. Sterilnom tehnikom, po 1 mL svakog razrjeđenja nanoseno je na površinu krvnog agara, te je inokulum ravnomjerno raspoređen po površini. Zatim je slijedila inkubacija u aerobnim uvjetima na temperaturi od 30 °C kroz 48 h te su izbrojane sve kolonije porasle na ploči.

Nakon inkubacije broj bakterija u uzorku izračunat je množenjem broja kolonija s odgovarajućim faktorom razrjeđenja, te je rezultat izražen kao logaritamska vrijednost broja poraslih kolonija (\log_{10} CFU po gramu uzorka) prema formuli:

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \left(\frac{\text{jed}}{\text{mL}} \right)$$

CFU= Colony- Forming Units (jedinice koje tvore kolonije)

4. Rezultati

U Tablici 4.1. prikazane su vrijednosti pH i aktiviteta vode uzoraka kobasica. pH vrijednosti su dobivene u rasponu između 6,71-6,92, sa srednjom vrijednošću od 6,81 i standardnom devijacijom 0,07. Najviša pH vrijednost zabilježena je u uzorku broj 8 (6,92), a najmanja u uzorku 11 (6,71).

Tablica 4.1. Prikaz rezultata pH vrijednosti i aktiviteta vode ($X \pm SD$)

Uzorak	Pokazatelj	
	pH	a_w
1	6,82	0,846
2	6,81	0,849
3	6,85	0,783
4	6,88	0,767
5	6,86	0,821
6	6,82	0,805
7	6,68	0,621
8	6,92	0,832
9	6,85	0,831
10	6,85	0,639
11	6,71	0,808
12	6,74	0,871
13	6,83	0,860
14	6,80	0,859
15	6,88	0,764
16	6,77	0,807
17	6,74	0,761
18	6,71	0,909
19	6,88	0,782
20	6,86	0,815
$X \pm SD^{**}$	6,81\pm0,07	0,80\pm0,07

*X- srednja vrijednost, **SD- standardna devijacija

Dobivene su vrijednosti aktiviteta vode u rasponu od 0,621 do 0,909, a srednja vrijednost iznosi 0,800 sa pripadajućom standardnom devijacijom 0,07. Najveći aktivitet vode zabilježen je u uzorku broj 18 (0,909), a najmanji u uzorku 7 (0,621).

U Tablici 4.2. prikazane su srednje vrijednosti ukupnog broja indikatorskih mikroorganizama. Srednja vrijednost ukupnog broja AMB iznosila je $5,82 \pm 1,02$. Najviši

broj AMB zabilježen je u uzorku 18 (6,58 log₁₀ CFU/g), a najniža vrijednost u uzorku broj 10 (1,86 log₁₀ CFU/g).

Tablica 4.2. Prikaz broja mikroorganizama (log₁₀ CFU/g, X±SD) u uzorcima kobasica

Uzorak (OPG*/DR**)	Mikrobna skupina				
	KA (aerobne mezofilne bakterije)	VRBD (Enterobacteriaceae)	BP (<i>Staphylococcus</i> spp.)	OAA (<i>Listeria</i> spp.)	ISA (Sulfireducirajuće klostridije)
1 (DR)	5,20	2,78	2,49	5,00	<1
2 (DR)	5,87	<1	2,78	<1	<1
3 (OPG)	6,05	<1	2,01	2,04	<1
4 (DR)	5,77	<1	2,33	<1	<1
5 (DR)	6,27	<1	2,42	<1	<1
6 (DR)	5,77	<1	2,95	<1	<1
7 (DR)	5,62	<1	2,38	<1	<1
8 (DR)	6,54	<1	2,60	2,00	<1
9 (DR)	5,88	<1	2,23	<1	<1
10 (DR)	1,86	<1	1,79	<1	<1
11 (DR)	6,32	<1	2,16	<1	<1
12 (DR)	6,35	<1	2,75	<1	<1
13 (DR)	6,01	2,00	2,82	<1	<1
14 (OPG)	6,54	<1	2,01	<1	<1
15 (OPG)	6,52	<1	2,23	<1	<1
16 (DR)	6,14	<1	1,79	<1	<1
17 (OPG)	6,1	<1	2,16	<1	<1
18 (DR)	6,58	<1	2,75	<1	<1
19 (DR)	5,72	<1	2,82	1,30	<1
20 (DR)	5,37	<1	2,10	<1	<1
X±SD	5,82±1,02	0,26±0,75	2,38±0,36	0,57±1,24	0

*OPG = obiteljsko-poljoprivredno gospodarstvo; ** DR = domaća radinost

Broj *Listeria* spp. iznosio je od 1,30 - 5 log₁₀ CFU/g. Suspektne kolonije (zelenkasto-plave, prozirni obrub) dalje su precijepljene na krvni agar i podrgnute biokemijskim testovima. U uzorcima 1, 3 i 8 identificirana je bakterija *Listeria monocytogenes* pomoću identifikacijskog sustava API Listeria, MALDI TOF analize i pozitivnog katalaza testa.

U većini uzoraka kobasica nisu detektirane enterobakterije, dok je rast suspektnih kolonija zabilježen u uzorcima 1 i 13. Izračunata je srednja vrijednost ukupnog broja (log₁₀ CFU/g) Enterobacteriaceae koja iznosi 0,26±0,75. Testom oksidaze suspektne kolonije s uzoraka 1 i 13 dokazane su kao oksidaza negativne (enterobakterije). Oksidacijsko-fermentacijski test je pokazao plavo-zeleno obojenje na uzorku 1, te žuto

obojenje na uzorku 13. S obzirom na plavo obojenje, na VRBD mediju su ponovno izolirane suspektne kolonije iz uzorka 1, te su dokazane kao oksidaza negativne. Dakle, u uzorcima 1 i 13 potvrđena je prisutnost enterobakterija.

Rast suspektnih kolonija *Salmonella* spp. uočen je na XDL podlozi na uzorcima 1, 7 i 14, te je napravljen biokemijski niz za iste uzorke.

Tablica 4.3. prikazuje rezultate biokemijskog niza za *Salmonella* spp. Očitanjem biokemijskog niza utvrđeno je kako u uzorcima nije prisutna *Salmonella* spp.

Tablica 4.3. Rezultati biokemijskog niza za *Salmonella* spp.

Biokemijski test	TROSTRUKI ŠEĆER	SIM	SIMMONS CITRATNI AGAR	LIZIN	UREAZA
Uzorak					
1	+	-	-	+	-
7	+	-	-	+	-
14	-	-	-	-	-

Legenda: + : pozitivna reakcija, - : negativna reakcija

Rast bakterija roda *Staphylococcus* zabilježen je u svim uzorcima kobasica. Dobivena je aritmetička sredina od 2,38 s pripadajućom standardnom devijacijom od $\pm 0,36$. U nijednom uzorku nije pronađen *Staphylococcus aureus*. MALDI-TOF MS analizom nije potvrđena prisutnost *S. aureus*, a biokemijskim testovima plazma i DNAza također nije detektirana prisutnost bakterije. Sulfitreducirajuće klostridije nisu detektirane niti u jednom uzorku.

5. Rasprava

U ovom radu ispitana je mikrobiološka ispravnost trajnih fermentiranih kobasica proizvedenih prema tradicionalnim recepturama na području grada Županje u domaćoj radinosti i na obiteljsko-poljoprivrednim gospodarstvima. Analizirano je 20 uzoraka kobasica prema Uredbi Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu i Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011). U svim uzorcima kobasica određeni su pH i aktivitet vode.

Vrijednosti aktivitet vode kretale su se od 0,621 do 0,909, a pH vrijednosti od 6,68 do 6,92. U istraživanju Lešić i sur. (2020) vrijednosti pH i a_w tradicionalnih fermentiranih kobasica iznosile od 5,06–6,3 za pH, što je nešto niže od vrijednosti dobivenih u ovom istraživanju, te od 0,82 do 0,92 za a_w , što je u skladu s našim rezultatima.

U ovom istraživanju srednja vrijednost broja aerobnih mezofilnih bakterija iznosila je $5,82 \pm 1,02$ (\log_{10} CFU/g). Prema Dalla Santa i sur. (2012), ukupan broj AMB u uzorcima kobasica iz domaće radinosti bio je većinom iznad $6 \log_{10}$ CFU/g, dok je u istraživanju 67 uzoraka tradicionalnih grčkih kobasica prosječan ukupan broj AMB iznosio $8 \log_{10}$ CFU/g (Ambrosiadis i sur., 2004). U Vodiču (2011) za kategoriju hrane „Trajne kobasice i drugi trajni suhomesnati proizvodi“ nije određeno koliko aerobnih mezofilnih bakterija može biti u toj kategoriji, no vrijednost veća od 10^6 CFU/g AMB obično je povezana s mješovitom mikrobiotom u kobasicama. Studija Moretti i sur. (2004) pokazuje kako se ukupan broj mikroorganizama povećava tijekom zrenja, te može dosegnuti vrijednost blizu $7 \log_{10}$ do $9 \log_{10}$ CFU/g u krajnjem proizvodu.

Broj enterobakterija je bio unutar zadovoljavajućih granica, dok je samo u jednom uzorku ($2,78 \log_{10}$ CFU/g) bio nešto iznad granične vrijednosti. Sulfitreducirajuće klostridije i *Salmonella* spp. nisu detektirane niti u jednom uzorku. Koagulaza pozitivni stafilocoki kao ni *Staphylococcus aureus* nisu detektirani u kobasicama analiziranim u ovom istraživanju, dok je ukupan broj stafilokoka iznosio $2,38 \pm 0,36 \log_{10}$ CFU/g i odnosi se na koagulaza negativne stafilokoke koji su tipična mikrobiota spontano fermentiranih kobasica (Heo i sur., 2020). Koagulaza negativni stafilocoki doprinose senzornim svojstvima fermentiranih kobasica, te se često koriste kao starter kulture za fermentaciju mesa i sira (Heo i sur., 2020). MALDI TOF analizom, API Listeria sustavom i biokemijskim testom katalaze identificirana je *Listeria monocytogenes* u uzorcima 1, 3 i 8 (15 %). Poznato je kako većina bakterija za svoj rast i metaboličku

aktivnost treba a_w od 0,95. Međutim, bakterija *Listeria monocytogenes* može preživjeti i u namirnicama koje imaju niži a_w . Detektirana je prisutnost bakterije *L. monocytogenes* u uzorku 1 ($a_w = 0,85$), u uzorku 3 ($a_w = 0,78$) i u uzorku 8 ($a_w = 0,83$). Dakle, *Listeria monocytogenes* detektirana je u uzorcima proizvedenim u kućnoj radinosti (uzorci 1 i 8), kao i u uzorku kobasica namijenjenih stavljanju na tržište (uzorak 3).

Slični rezultati mikrobioloških analiza dobiveni su u istraživanju fermentiranih kobasica od mesa divlje svinje i jelena (Žgomba Maksimović i sur., 2017). Autori navode kako je *S. aureus* sporadično prisutan u početnim fazama zrenja kobasica, ali u konačnom proizvodu nije pronađen. U gotovoj kobasici, detektirani broj bakterija porodice Enterobacteriaceae (3 log CFU/g) premašio je granične vrijednosti što ukazuje na lošu higijenu sirovog mesa, najvjerojatnije zbog fekalne kontaminacije prilikom odstrela (Žgomba Maksimović i sur., 2017). Još jedno istraživanje proveli su Yörük i Güner (2017) gdje je potvrđena kontaminacija vrstom *S. aureus* u 9 od 96 uzoraka fermentiranih kobasica i salama, a kontaminacija *L. monocytogenes* otkrivena je u 17 od 96 uzoraka (17,7%). Devet uzoraka proizvele su tvrtke s certifikatom ISO, a osam su proizvele tvrtke bez certifikata. Kontaminacija sa *Salmonella* spp. otkrivena je u tri od 96 uzoraka fermentiranih kobasica i salama (3,12%) i zbog toga predstavlja rizik za zdravlje potrošača u Turskoj (Yörük i sur., 2017). Istraživanje koje su proveli Colak i Hampikyan (2007) pokazala je kako od 300 sudžuk kobasica prikupljenih po Istanbulu, čak 11,6% je bilo pozitivno na *Listeria monocytogenes*. Prema Turkish Food Codexu, prisutnost *Listeria monocytogenes* u 25 g mesnih proizvoda nije prihvatljiva. Slično tome, u istraživanju prevalencije *Listeria monocytogenes* u trajnim fermentiranim talijanskim kobasicama, rezultati su pokazali kako je od 237 uzoraka fermentiranih kobasica čak 28,2% bilo pozitivnih na *Listeria monocytogenes* (De Cesare i sur., 2007). Brojni faktori kao što su početni broj patogena, pH, sadržaj soli i vode, mikroklimatski uvjeti zrenja i kompetitivnost prirodne mikrobiote uvjetuju sposobnost rasta *Listeria monocytogenes* u fermentiranim proizvodima. *Listeria* je razvila brojne mehanizme kojima se prilagođava na nepovoljne uvjete u okolišu, te je zbog toga potencijalna opasnost u tradicionalnoj proizvodnji. Nekoliko studija dokumentiralo je zastupljenost ovog patogena u fermentiranim kobasicama dosegnuvši razine prevalencije do čak 40–45% (Meloni, 2015).

6. Zaključak

Na temelju dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Srednja pH vrijednost kobasica iznosi $6,81 \pm 0,07$ dok je srednja vrijednost aktiviteta vode $0,80 \pm 0,07$
2. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (AMB) iznosi $5,82 \pm 1,02$ (\log_{10} CFU/g) te ukazuje na izostanak dominacije jedne populacije i na prisustvo mješovite mikrobiote kobasica.
3. *Salmonella* spp. i sulfireducirajuće klostridije nisu detektirane niti u jednom uzorku kobasica. Ukupan broj enterobakterija nalazi se u prihvatljivim granicama, osim u jednom uzorku ($2,78 \log_{10}$ CFU/g)
4. Plazma testom i MALDI TOF analizom nije utvrđena prisutnost koagulaza pozitivnih stafilocoka / *Staphylococcus aureus* niti u jednom od uzoraka kobasica, dok ukupan broj stafilocoka iznosi $2,38 \pm 0,36 \log_{10}$ CFU/g.
5. U tri uzorka kobasica (15 %) detektirana je *Listeria monocytogenes*, što znači da te kobasice nisu sukladne s kriterijima sigurnosti EU Uredbe 2073/2005.

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti kako je mikrobiološka ispravnost domaće proizvedenih trajnih fermentiranih kobasica uglavnom zadovoljavajuća. Izostanak *Salmonella* spp., sulfitreducirajućih klostridija, kao i koagulaza-pozitivnih stafilocoka/ *Staphylococcus aureus*, dodatno potvrđuje zadovoljavajuću higijensku kvalitetu uzoraka. Broj AMB u kobasicama također je u prihvatljivim vrijednostima za ovaj tip proizvoda.

Ipak, prisutnost *Listeria monocytogenes* u pojedinim uzorcima predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik i ukazuje na potrebu za poboljšanjem higijenskih uvjeta proizvodnje i kontrolnih mjera u domaćinstvima kako bi se osigurali zdravstveno ispravni proizvodi.

7. Literatura

1. Adams M.R., Moss M.O. (2008). Food Microbiology 3rd Edition. University of Surrey, Guildford. UK. The Royal Society of Chemistry. Stranica: 198-213. [Citirano 1.7.2024.]
2. Al-Mutairi M.F. (2011). The incidence of Enterobacteriaceae causing food poisoning in some meat products. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(2), 116-121.
3. American Society for Microbiology (2005). <https://asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba07-2aea25a43e76/protocol-28> (pristup: 01.07.2024.)
4. Anonimno (2005): Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu, dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=CELEX%3A32005R2073> (pristup: 03.06.2024.)
5. Bergey D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9. izdanje. Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp. 74.
6. Bredius M.W.J., de Ree E.M. (2003). Media for the detection and enumeration of clostridia in foods. *Progress in Industrial Microbiology*. Elsevier. Volume 37. 2003. Stranica 49-60. Dostupno na: [scihub.se/10.1016/s0079-6352\(03\)80006-1](https://scihub.se/10.1016/s0079-6352(03)80006-1)
7. Bredius M.W.J., de Ree E.M. (2003). Poglavlje 3: Media for the detection and enumeration of clostridia in foods. *Progress in Industrial Microbiology*. Elsevier. Volume 37. Stranica 49-60. Dostupno na: [scihub.se/10.1016/s0079-6352\(03\)80006-1](https://scihub.se/10.1016/s0079-6352(03)80006-1) (pristup: 18.6.2024.)
8. Coburn B., Grassl G. A., & Finlay B. B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology and cell biology*, 85(2), 112-118.
9. Colak H., Hampikyan H., Ulusoy B., Bingol E.B. (2007). Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk), *Food Control*, Volume 18, Issue 1, Pages 30-32, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.08.003>
10. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 36, Issue 2, Pages 380–407, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
11. De Cesare A., Mioni R., Manfreda G. (2007). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 120, Issues 1–2, Pages 124-130, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.009>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507003042>)

12. Foster T. J. (2002). *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*, pp. 839 – 888. doi:10.1016/b978-012677530-3/50258-0
13. Gherardi G., Di Bonaventura G., Savini V. (2018). *Staphylococcal Taxonomy. Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, pp. 1 – 10. doi:10.1016/b978-0-12- 813547-1.00001-7
14. Gray V. L., Müller C. T., Watkins I. D., Lloyd D. (2008). Peptones from diverse sources: pivotal determinants of bacterial growth dynamics. *Journal of applied microbiology*, 104(2), 554-565.
15. Güzin K., Mükerrerem K. (2006). Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk, *Food Control*, Volume 17, Issue 10, 2006, Pages 797-801, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.05.003>.
16. Hardy diagnostics (2020) dostupno na: <https://hardydiagnostics.com/media/assets/product/documents/SIMMedium.pdf> (pristup: 16.07.2024.)
17. Heo S., Lee J.H., Jeong D.W. (2020). Food-derived coagulase-negative *Staphylococcus* as starter cultures for fermented foods. *Food Sci Biotechnol.* 2020 Jul 4;29(8):1023-1035. doi: 10.1007/s10068-020-00789-5. Erratum in: *Food Sci Biotechnol.* 2020 Sep 5;32(11):1611. doi: 10.1007/s10068-020-00806-7. PMID: 32670656; PMCID: PMC7347722.
18. Hospital X. F., Hierro E., Stringer S., & Fernández M. (2016). A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 66-70.
19. Kadariya J., Smith T. C., Thapaliya D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, pp. 1 – 9. doi:10.1155/2014/827965
20. Kalenić S., Bedenić B., Bošnjak Z., (2013). *Enterobakterije // Medicinska mikrobiologija / Kalenić, Smilja (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, str. 182-200*
21. Laboratories Humeau (2022). dostupno na: https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_218661-Vrbg-Gelose_EN_110909.pdf (pristup: 16.6.2024.)
22. Lešić T., Vahčić N., Kos I., Zadravec M., Sinčić Pulić B., Bogdanović T., Petričević S., Listeš E., Škrivanko M., Pleadin J. (2020). Characterization of Traditional Croatian Household-Produced Dry-Fermented Sausages. *Foods.* 9(8):990. <https://doi.org/10.3390/foods9080990>
23. Liofilchem (2024). Buffered NaCl Peptone Solution pH 7.0. Diluent for detection and enumeration of microorganism according to USP/EP/JP and ISO 21149. Dostupno na: http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/402410_IFU.pdf (Pristup: 03.05.2024.)

24. McCusker M. (2019). 'Clean label rješenje za kontrolu bakterije Clostridium botulinum u kuhanom mesu - studija slučaja ', MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu, 21.(3.), str. 304-310. <https://doi.org/10.31727/m.21.3.1>
25. Micorbiologyinfo (2022). dostupno na: <https://microbiologyinfo.com/urease-test-principle-media-procedure-and-result/> (pristup: 20.07.2024.)
26. Morioka C.Y., Oliveira L., Crepaldim R., Pereira Nixon A. (2017). Salmonella in Sausage, Frankfurter and Meat Sausage, Not Only in Raw or Undercooked but Also Found in Smoked and Cooked Ones: An Alert for Public Health and Traveler's Health Problem, Including Aerospace Medicine: 2664. American Journal of Gastroenterology 112():p S1456
27. Mrkonjic Fuka M., Tanuwidjaja I., Zgomba Maksimovic A., Zunabovic-Pichler M., Kublik S., Hulak N., Domig K.J., Schloter M. (2020). Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures, Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie = Food science and technology, Volume 118, 108782, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108782>.
28. Ohi M.E., Miller S.I. (2001). Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. Annual review of medicine, 52(1), 259-274.
29. Pavičić Ž., Ostović M. (2008). Proizvodnja kobasica u kućanstvu za vlastite potrebe. MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu. (pristup: 15.09.2023) ;X(5.):369-373. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/4084>
30. Prevost S., Cayol J.L., Zuber F., Tholozan J.L., Remize F. (2013) . Characterization of clostridial species and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbial quality and safety, Food Control, Volume 32, Issue 1, Pages 222-227, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.030>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006329>)
31. Rašeta M., Vesković-Moračanin S., Borović B., Karan D., Vranić D., Trbović D., Lilić S. (2021). "Mikroklimatski uslovi tokom zrenja kobasica proizvedenih na tradicionalan način", Scientific journal "Meat Technology", 51(1), pp. 45-51. Dostupno na : https://journalmeattechnology.com/index.php/meat_technology/article/view/292 (pristup: 10.10.2024).
32. Solabia, Biokar Diagnostics, Iron-sulfite-agar-isa, dostupno na: <https://www.solabia.com/biokar-diagnostics/en/product/iron-sulfite-agar-isa-iso-15213-1/> (pristup: 10.05.2024.)
33. Swaminathan B., Gerner-Smidt P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, 9(10), pp. 1236 – 1243. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.011

34. ThermoFischer Scientific (2024). dostupno na: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0166&c=UK&lang=EN (pristup: 03.05.2024.)
35. Tong S. Y. C., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L., Fowler V. G. (2015). Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp. 603 – 661. doi:10.1128/cmr.00134-14
36. Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/HR/TXT/?uri=CELEX%3A02005R2073-20200308>, pristupljeno: 25.05.2024.
37. Vlaemyneck G., Lafarge V., Scotter S. (2000). Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 430-441.
38. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3.izmijenjeno izdanje). Dostupno na: <http://veterinarstvo.hr/default.aspx?id=4548>, pristupljeno 25.05.2024.
39. Yörük N.G., Güner A. (2017). "Control of fermented sausage, salami, sausage, and hamburger meatballs produced in meat production facilities applying the ISO Food Security System for food pathogens," *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*: Vol. 41: No. 3, Article 4. <https://doi.org/10.3906/vet-1606-97>, Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol41/iss3/4>
40. Zavod za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije. Sulfitoreducirajuće klostridije. Rječnik pojmova. [pristup: 1.7.2024.]. Dostupno na: <https://www.zzzjzdnz.hr/hr/o-nama/rjecnik-pojmova/9719>
41. Zdolec N. i sur. (2007). 'Fermentirane kobasice proizvedene u domaćinstvu - mikrobiološka kakvoća', *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, IX(6), str. 318-324. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/21259> (pristup: 29.03.2024.)
42. Zdolec N., Kozačinski L., Hadžiosmanović M., Cvrtila Ž., Filipović I. (2007). Inhibicija rasta bakterije *Listeria monocytogenes* u fermentiranim kobasicama. [pristup: 02.08.2023.] ;77(6):507-514. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/24355>