

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca GOSTEČNIK

**PRIMERJAVA KLASIČNIH IN ALTERNATIVNIH
MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV MINI PEKOVSKIH IZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF CONVENTIONAL AND ALTERNATIVE
MICROBIOLOGICAL ANALYSES OF MINI BAKERY PRODUCTS**

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Pekarne Pečjak d.o.o. v Trzinu.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana izr. prof. dr. Barbara Jeršek, za recenzentko izr. prof. dr. Lea Demšar.

Mentor: izr. prof. dr. Barbara JERŠEK

Recenzent: izr. prof. dr. Lea DEMŠAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mojca GOSTEČNIK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 579.67:579.2.083: 664.66 (043) = 163.6

KG živila / pekovski izdelki / klasične mikrobiološke metode / testi RIDA®COUNT / primerjava metod / enterobakterije / *Escherichia coli* / *Staphylococcus aureus* / skupno število mikroorganizmov /

AV GOSTEČNIK, Mojca

SA JERŠEK, Barbara (mentorica) / DEMŠAR, Lea (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2014

IN PRIMERJAVA KLASIČNIH IN ALTERNATIVNIH MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV MINI PEKOVSKIH IZDELKOV

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP IX, 60 str., 1 sl., 18 pregl., 80 vir.

IJ SI

JI sl / en

AI Pekovski izdelki so velik del naše prehrane, proizvajalec pa mora skrbno nadzorovati zdravstveno ustreznost izdelkov, ki vključuje tudi mikrobiološko ustreznost živil. Namen naše diplomske naloge je bila primerjava klasičnih mikrobioloških metod s testi RIDA®COUNT. Za preiskavo smo vzeli 11 različnih naravno kontaminiranih mini pekovskih izdelkov. Izvedli smo mikrobiološke preiskave s tristopenjskim planom vzorčenja za bakterije vrst *E. coli* in *S. aureus*, enterobakterije in skupno število mikroorganizmov (SŠMO). Vsa mikrobiološka gojišča smo pripravili po navodilih proizvajalcev, prav tako smo glede na navodila izvedli vse klasične in alternativne mikrobiološke preiskave. Rezultati kvantitativne določitve bakterij vrste *E. coli* so pokazali, da smo pri vseh vzorcih dobili enake rezultate ne glede na uporabljeno mikrobiološko metodo. Pri bakterijah vrste *S. aureus* so se rezultati ujemali pri 55 % vzorcev, medtem ko smo enako povprečno število SŠMO dobili pri 66 % vzorcev. Statistično višje povprečno število koliformnih bakterij smo dobili s klasično mikrobiološko preiskavo. Primerjava časa potrebnega za izvedbo posamezne mikrobiološke preiskave in zahtevnosti metod glede priprave in izvedbe preiskave je pokazala, da so testi RIDA®COUNT hitrejši in manj zahtevni. Ocena stroškov posamezne mikrobiološke preiskave z upoštevanjem le stroškov materiala za izvedbo posamezne mikrobiološke preiskave je pokazala, da so testi RIDA®COUNT dražji. Ob upoštevanju vseh dejavnikov primerjave so naši rezultati pokazali, da so bili testi RIDA®COUNT za določanje SŠMO in bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus* primerni za hitro, enostavno in stroškovno opravičeno mikrobiološko preiskavo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.67:579.2.083: 664.66 (043) = 163.6
CX foods / bakery products / traditional microbiological methods / RIDA@COUNT tests / method comparisment / enterobacteria / *Escherichia coli* / *Staphylococcus aureus* / plate count
AU GOSTEČNIK, Mojca
AA JERŠEK, Barbara (supervisor) / DEMŠAR, Lea (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2014
TI COMPARISON OF CONVENTIONAL AND ALTERNATIVE MICROBIOLOGICAL ANALYSES OF MINI BAKERY PRODUCTS
DT Graduation thesis (University study)
NO IX, 60 p., 1 fig., 18 tab., 80 ref.
LA SI
AL sl / en
AB Bakery products are a big part of our diet and during manufacturing process is essential to ensure microbiological safety. The aim of our thesis was to compare traditional microbiological methods with RIDA@COUNT tests. For the purpose of our research we analysed 11 different naturally contaminated mini bakery products. Quantitative testing was carried out with three stage plan of sampling for investigating microorganisms such as *E. coli*, *S. aureus*, enterobacteria and aerobic plate count (PC). All the microbiological media and procedures were prepared and carried out according to manufacturer's instructions. Quantative results for *E. coli*, showed the same average number in all the samples, no matter which method we used. For *S. aureus* we got the equivalent results in 55 % of samples and PC the same average number in 66 % of samples. Statistically higher results of average number showed only for enterobacteria using classical microbiological method. Time consumption regarding preparations needed to carry out each method, complexity of preparation and executions showed that RIDA@COUNT tests are quicker and less demanding. When compared prices of individual culture media and RIDA@COUNT test, results showed that RIDA@COUNT test are more expensive than traditional microbiological culture media. Our results showed, when considering all aspects of our research, were RIDA@COUNT tests for determinateing PC, *E. coli* and *S. aureus* suitable for rapid results with user friendly and cost justified microbiological analysis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKROORGANIZMI, ZNAČILNI ZA PEKOVSKÉ IZDELKE	3
2.1.1 Enterobacteriaceae	3
2.1.2 Bakterije vrste <i>Escherichia coli</i>	7
2.1.3 Bakterije vrste <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.1.4 Skupno število mikroorganizmov	10
2.2 MIKROBIOLOŠKA GOJIŠČA	10
2.2.1 Splošna gojišča	11
2.2.2 Obogatitvena gojišča	11
2.2.3 Selektivna gojišča	12
2.2.4 Diferencialna gojišča	13
2.2.5 Kromogena gojišča	13
2.3 METODE ODKRIVANJA MIKROORGANIZMOV	14
2.3.1 Klasične mikrobiološke metode	14
2.3.2 Testi RIDA®COUNT	16
2.3.3 Primerjava mikrobioloških metod	16
2.4 MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI	19
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 Testi RIDA®COUNT	23
3.1.2 Klasična mikrobiološka gojišča	23
3.1.3 Vzorci živil	24
3.1.4 Laboratorijski pribor in oprema	25
3.2 METODE	26
3.2.1 Načrt eksperimentalnega dela	26
3.2.2 Priprava gojišč	27
3.2.3 Vzorčenje izdelkov	27
3.2.4 Priprava vzorcev za mikrobiološke preiskave	27
3.2.5 Mikrobiološke preiskave s testi RIDA®COUNT	28
3.2.6 Klasične mikrobiološke preiskave	29
3.2.7 Statistična analiza	29
4 REZULTATI	30
4.1 KVANTIFIKACIJA RAZLIČNIH MIKROORGANIZMOV Z RAZLIČNIMI METODAMI	30
4.2 ČAS IZVEDBE KLASIČNIH IN ALTERNATIVNIH MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV	37
4.3 ZAHTEVNOST IZVEDBE KLASIČNIH IN ALTERNATIVNIH MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV	39

4.3.1	Zahtevnost priprave materiala, nanos in odčitavanje rezultatov	39
4.3.2	Zahtevnost glede materiala in aparatur	40
4.4	OCENA STROŠKOV MATERIALA PRI KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH GOJIŠČIH IN TESTIH RIDA®COUNT	42
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
5.1	RAZPRAVA	44
5.1.1	Primerjava kvantitativnih rezultatov	44
5.1.2	Čas izvedbe	45
5.1.3	Zahtevnost izvedbe	46
5.1.4	Ocena materialnih stroškov	47
5.2	SKLEPI	48
6	POVZETEK.....	49
7	VIRI.....	51

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Patogene bakterije družine Enterobacteriaceae (Baylis in sod., 2011).	6
Preglednica 2: Pregled mikrobioloških kriterijev različnih živil (ZZV, 2004, FDA, 2013)....	22
Preglednica 3: Določanje različnih mikroorganizmov v živilih s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT	30
Preglednica 4: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Čokoladna rulada s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT.....	31
Preglednica 5: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Francoski rogljiček s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT	32
Preglednica 6: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Temni francoski rogljiček z mareličnim nadevom s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT	32
Preglednica 7: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Linški piškoti s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT.....	33
Preglednica 8: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Navihanci s čokoladno - lešnikovim nadevom s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT	33
Preglednica 9: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Potica orehova – pečena s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT	34
Preglednica 10: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Rešetko jogurt - malina s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT	35
Preglednica 11: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Skutin burek s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT.....	35
Preglednica 12: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Skutin štrukelj s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT.....	36
Preglednica 13: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Sveže vlečeno testo s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT	36
Preglednica 14: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Zavitek jabolčni s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT.....	37
Preglednica 15: Čas za izvedbo klasične mikrobiološke metode in testa RIDA@COUNT.....	38
Preglednica 16: Prikaz elementov priprave materiala za mikrobiološko preiskavo pri klasični mikrobiološki metodi in testu RIDA@COUNT	40
Preglednica 17: Pregled aparaturne opreme in materiala uporabljenega pri klasičnih in alternativnih mikrobioloških preiskavah	41
Preglednica 18: Primerjava stroškov materiala za klasična mikrobiološka gojišča in teste RIDA@COUNT	42

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema eksperimentalnega dela	26

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a_w	vodna aktivnost
BP	gojišče Baird Parker
cfu	kolonijska enota (ang. Colony forming unit)
EPEC	enterotoksigene bakterije vrste <i>E. coli</i>
ETEC	enteroinvazivne bakterije vrste <i>E. coli</i>
EHEC	enteroagregativne bakterije vrste <i>E. coli</i>
GHP	dobra higienska praksa (ang. Good Hygiene Practice)
HACCP	analiza tveganj kritičnih kontrolnih točk (ang. Hazard Analysis Critical Control Point)
KV	koeficient variacije
MPN	najverjetnejše število mikroorganizmov (ang. Most Probable Number)
\bar{N}	povprečno število mikroorganizmov
n	število vzorcev
PCA	gojišče Plate Count Agar
SO	standardni odklon
znač.	raven statistične značilnosti
SŠMO	skupno število mikroorganizmov
t	stopnja tveganja/zaupanja t-testa
TCBS	gojišče Tiosulfatni agar s citratom, žolčnimi solmi in saharozo (ang. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar)
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolijev kolrid (ang. 2,3,5- triphenyltetrazoliumchloride)
t-vrednost	izračunana vrednost t-testa
VRBL	gojišče vijolično rdeči agar z laktozo (ang. Violet Red Bile Lactose Agar)
XLD	gojišče Ksilosa lizin deoksiholat (ang. Xylose Lysine Deoxycholate Agar)
Σ	seštevek

1 UVOD

Pomembna naloga živilskopredelovalne industrije je zagotavljanje visoke zdravstvene ustreznosti živil. Z uporabo mikrobioloških kriterijev določimo meje sprejemljivost proizvoda ali serije živil, na osnovni odsotnosti ali prisotnosti oziroma števila določenih mikroorganizmov, vključno s paraziti in/ali količino njihovih toksinov/metabolitov v določeni masi, volumnu, na določeni površini ali določeni seriji živil. Mikrobiološki kriteriji za živila nam omogočajo določiti ustreznost proizvoda ali cele proizvodnje serije živil. Z uporabo mikrobioloških kriterijev opredelimo mikrobiološko varnost živila glede na njegovo namembnost in upoštevanje roka uporabnosti, ugotovimo ali je bil nek planiran postopek pravilno izveden (toplotna obdelava živila) (Klun in Šedlbauer, 2004).

Z vse večjo svetovno oskrbo hrane so mikrobiološka preiskovanja živil v porastu. Ključni za to so številni dejavniki, med njimi tudi povečan obseg živilskih proizvodov, predvsem pa povečanje števila prebivalstva. Število mikrobioloških preiskav in s tem število vzorcev živil se povečuje tudi zaradi vedno novih predpisov o higieni živil (Gorris, 2005). S povečanim obsegom mikrobioloških preiskav, lahko klasične mikrobiološke metode postanejo neprimerne za preiskovanje živil, saj je njihova izvedba dolgotrajna. Zato se povečuje povpraševanje po alternativnih metodah, kot so testi, z že vnaprej pripravljenimi gojišči (López-Campos in sod., 2012).

Pekovski izdelki so pomembna osnovna živila v večini držav in kultur. Pekovski izdelki in žita so dragocen vir hranilnih snovi v naši prehrani. V zadnjih desetletjih se je povečala raznovrstnost in obseg prodaje kruha in drugih pekovskih izdelkov (Saranraj in Geetha, 2011). Pekovski izdelek je izdelek, ki je po ustreznem tehnološkem postopku izdelan iz žit in mlevskih izdelkov, vode oziroma druge ustrezne tekočine, pekovskega kvasa ali drugega sredstva za vzhajanje, dovoljenih aditivov ter drugih surovin, ki ustrezajo predpisani minimalni kakovosti (Pravilnik ..., 2008). Fini oziroma mini pekovski izdelki so izdelki narejeni iz različnih vrst moke, sladkorja, maščob in drugih sestavin, pod pogojem, da je v končnem izdelku vsebnost sladkorja oziroma maščobe večja od 5 odstotkov, računano na suho snov (Pravilnik ..., 2008).

1.1 CILJI NALOGE

Cilj naloge je bil primerjati postopke in rezultate mikrobioloških preiskav dobljene s testi RIDA@COUNT za določanje bakterij vrst *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, enterobakterije, ter skupno število mikroorganizmov (SŠMO) in enake parametre dobljene s klasičnimi mikrobiološkimi metodami. Primerjali smo posamezen postopek, čas in zahtevnost izvedbe ter material in stroške posamezne mikrobiološke preiskave. Primerjavo smo izvajali na naravno kontaminiranih vzorcih mini pekovskih izdelkov narejenih iz listnatega, listnato kvašenega, kvašenega in krhkega testa.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo naslednje delovne hipoteze:

- Rezultati testov RIDA@COUNT so primerljivi z rezultati klasičnih mikrobioloških metod.
- Izvedba mikrobiološke preiskave s testi RIDA@COUNT je hitrejša v primerjavi s klasično mikrobiološko metodo.
- Testi RIDA@COUNT so manj zahtevni za izvedbo glede opreme in prostora v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami.
- Testi RIDA@COUNT so dražji kot gojišča za klasične mikrobiološke metode.

2 PREGLED OBJAV

V živilu pri normalnih razmerah so prisotne naravno prisotne vrste mikroorganizmov in druge vrste mikroorganizmov, ki so iz zunanjega vira, kateremu so izpostavljena živila v času proizvodnje do uporabe (Ray in Bhunia, 2008).

Tradicionalno so pekovski izdelki obravnavani kot mikrobiološko stabilno živilo in varno za uživanje. Stabilnost teh živil je predvsem posledica nizke vsebnosti vode (a_w), kar otežuje rast in razmnoževanje mikroorganizmov (Craven in sod., 1975).

2.1 MIKROORGANIZMI, ZNAČILNI ZA PEKOVSKO IZDELKE

Mikroflora žit in žitnih izdelkov je raznolika in vključuje plesni, kvasovke, mlečnokislinske bakterije, bacile (*Bacillus* spp.), patogene bakterije, koliformne bakterije in enterokoke. Patogeni mikroorganizmi, ki so prisotni v žitnih zrnih in žitnih proizvodih so bakterije vrst *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, in *Staphylococcus aureus*. Koliformne bakterije in enterokoki so tudi kot kazalniki neustreznega ravnanja med procesi in možnost fekalne kontaminacije (Bullerman in Bianchini, 2009).

2.1.1 Enterobacteriaceae

Enterobakterije so velika skupina bakterij, ki spadajo v družino Enterobacteriaceae. So paličaste, fakultativno anaerobne, gramnegativne bakterije (Pandey in sod., 2000). Družina vključuje številne rodove kot so: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella* in druge. Nekatere enterobakterije kot na primer bakterije vrste *E. coli*, so del naravne mikroflore črevesja ljudi in živali (Brooks in sod., 2013).

Za družino Enterobacteriaceae je značilno, da so gibljive palčke, ki dobro rastejo na peptonu in na gojišču MacConkey. Poleg tega fermentirajo glukozo ob tvorbi kisline in plina in so katalaza pozitivne (Brooks in sod., 2013). Za enterobakterije so hranilne potrebe minimalne, kljub temu pa rodovi *Enterobacter*, *Proteus* in *Shigella* za optimalno rast potrebujejo nikotinsko kislino, bakterije rodu *Salmonella* pa triptofan (Pandey in sod., 2000). Patogene enterobakterije so bakterij rodov *Salmonella*, *Shigella* in *Yersinia*. Oportunistično patogene so: bakterije vrste *E. coli* in rodu *Proteus* (Nahberger Marčič,

2008). Bakterije vrste *E. coli* so naravno prisotne v črevesni mikroflori, medtem ko druge enterobakterije (*Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citobacter* in druge) so manj pogosto prisotne v zdravi črevesni mikroflori (AAP, 2009). Enterobakterije so pomemben vzrok za resne okužbe in mnogi izmed najpomembnejših članov te družine postajajo vedno bolj odporni na antibiotike (Paterson, 2006). Med higienskimi indikatorji v živilstvu se enterobakterije uporabljajo kot parameter določanja higiene (Jay in sod., 2005).

Bakterije rodu *Salmonella* so paličaste in gibljive, značilno za njih je, da fermentirajo glukozo in manozo brez tvorbe plina, vendar ne fermentirajo laktoze in saharoze. Večina bakterij rodu *Salmonella* proizvaja vodikov sulfid. Prenašajo se z mesom in živili živalskega izvora na človeka, kjer povzročajo enteritis, sistemsko okužbo črevesja in vročino. Znanih je več kot 2500 serotipov salmonel, vključno z več kot 1400 kateri so patogeni za ljudi. Štiri serotipe, ki povzročajo črevesna obolenja je mogoče prepoznati v kliničnem laboratoriju z biokemijskimi in serološkimi testi. Ti serotipi so *S. paratify* (iz serološke skupine A), *S. paratify B* (iz serološke skupine B), *S. choleraesuis* (serološka skupina C1) in *S. typhi* (serološka skupina D). Vir okužbe so kontaminirana hrana in pijača. Voda se kontaminira z blatom, mleko in drugi mlečni izdelki (sir, smetana, sladoled) zaradi neustrezne pasterizacije. Meso in mesni izdelki se kontaminirajo preko okužene živali ali s fekalijami glodavcev ali ljudi. Za preprečevanje in nadzor je treba sprejeti sanitarne ukrepe za preprečitev kontaminacije živil in vode (Brooks in sod., 2013).

Pri človeku povzročajo različne okužbe, kot so klicenoštvo brez simptomov, vnetje želodčne in črevesne sluznice z bljuvanjem in diarejo. Bolezni, ki jih povzročajo bakterije rodu *Salmonella* imenujemo salmoneloze (ZZV, 2013). Salmoneloza je ena izmed splošno razširjenih okužb s hrano, saj je po celem svetu pri ljudeh več kot deset milijoni primerov prijavljenih na leto (WHO, 2013). Bakterije rodu *Salmonella*, lahko povzročijo dve vrsti bolezni: netifusno salmonelozo in trebušni tifus. Netifusne salmoneloze so neprijetne vendar brez hujših težav (ZZV, 2013). Trebušni tifus, ki ga povzročajo bakterije vrste *S. typhi* je huda sistemska bolezen, ki poteka z vročino in trebušnimi težavami, smrtnost je deset odstotna. Trebušni tifus se prenaša s hrano ali pijačo, ki se kontaminirajo preko kužne osebe, ki ravna s hrano ali pijačo ali preko fekalne okužbe vode, ki se uporablja za pitje ali pranje živil (CDC, 2013).

Rod bakterij *Yersinia* ima 11 vrst in 4 so patogene vendar le bakterije vrst *Y. enterocolitica* in *Y. pseudotuberculosis*, povzročajo gastroenteritis. Bakterije rodu *Yersinia* so gramnegativne majhne paličice. So psihrotrofni mikroorganizmi (lahko živijo pri nizkih temperaturah) vendar je znano, da lahko preživijo tudi pasterizacijo. Tako bakterije vrst *Y. enterocolitica* in *Y. pseudotuberculosis*, lahko rastejo pri pH od 4 do 10, optimalen pH je 7,6. Najdemo jih v živilih, ki so hranjena v hladnih razmerah (okoli 4 °C), v atmosferi brez kisika, živilih živalskega izvora, v kuhanih jajcih, v kuhanih ribah, v pasteriziranemu mleku, skuti in drugje. Infektivni odmerek za človeka je med 10^4 in 10^6 celic. Inkubacijska doba je med 1 in 11 dnevi, je pa znano, da lahko ta doba traja tudi nekaj mesecev. Najbolj dovzetni za okužbo s to vrsto bakterij so otroci, bolni ljudje, starejši in ljudje s terapijo z imunosupresivi (FDA, 2012).

Bakterije rodu *Klebsiella* so paličaste, gramnegativne in negibljive, ki lahko rastejo ob prisotnosti amonijevih ionov ali soli nitratov. Dobro rastejo pri temperaturi 30–35 °C, dobro izkoriščajo sladkorje, tvorijo encim lizin dekarboksilazo (LDC) ali araginin dihidrolazo (ADH). Te bakterije pogosto najdemo v zemlji, vodi in na zelenjavi. So pogosto odgovorne tudi za mastitis pri živalih. Bakterije rodu *Klebsiella* so znane kot za človeka oportunistični patogeni. Prisotne so pri bolnišničnih pacientih, ki zastopajo 3–8 % vseh bolnišničnih okužb. Večinoma jim pripisujemo simptome okužbe sečil in dihalnih organov, kot tudi rane mehkega tkiva. V zadnjih desetletjih se je stopnja odpornosti na antibiotike pri bakterijah rodu *Klebsiella* povečala (Brisse in sod., 2006). Za preprečevanje okužb moramo skrbeti za osebno higieno pri pripravi živil, primerno kuhanje hrane ter dobro shranjevanje živil (Pandey in sod., 2000).

Družina Enterobacteriaceae vključuje nekatere bolj pogosto preiskovane mikroorganizme, saj so patogeni in pogosto odgovorni za okužbe s hrano. Poznanih je veliko patogenih bakterij te družine, med drugimi tudi bakterije vrste *E. coli* O157: H7, velikokrat odgovorne za okužbe s hrano. V Preglednici 1 so povzete patogene bakterije družine Enterobacteriaceae (Baylis in sod., 2011).

Preglednica 1. Patogene bakterije družine Enterobacteriaceae (Baylis in sod., 2011).

Vrsta bakterij	Klinični znaki
<i>Cronobacter</i> spp.	Neonatalni meningitis (možganski absces/ oblikovanje ciste).
Enterovazivne <i>E. coli</i> (EIEC)	Razjede črevesja, vodena diareja, okuženo blato (griža).
Enterotoksigene <i>E. coli</i> (ETEC)	Akutno vodena diareja, po navadi brez krvi, ob prisotnosti sluzi ali gnoja.
Enteroagregativne <i>E. coli</i> (EAEC)	Dolgotrajna diareja.
Enteropatogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Akutna diareja (še posebej dovzetni otroci pod 1 letom starosti).
Enterohemoragične <i>E. coli</i> (EHEC)	Diareja ob prisotnosti krvi, hemolitično uremični sindrom (HUS).
<i>Salmonella</i> (netifusna salmoneloza)	Slabost, diareja, bruhanje, trebušne bolečine in povišana telesna temperatura.
<i>Salmonella</i> (trebušni tifus /paratifus)	Povišana telesna temperatura, zaprtje, izpuščaji, lahko različna nevropsihotična stanja, ...
<i>Shigella</i> spp.	Diareja, vročina, slabost, bruhanje, krči v trebuhu, vrtoglavica,...
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Široka paleta simptomov, odvisni od seva, odmerka in dovzetnosti in starosti gostitelja. Lahko tudi diareja z vročino, vnetjem bezgavk,...

2.1.2 Bakterije vrste *Escherichia coli*

Bakterije vrste *E. coli* najdemo v črevesju človeka in živali. So gramnegativne paličice, ki sodijo v družino Enterobacteriaceae. Bakterije vrste *E. coli* so najpogosteje uporabljene kot indikatorski mikroorganizem sveže fekalne kontaminacije. Tvorijo plin in kislino iz laktoze pri temperaturi 44–45,5 °C in sodijo med fekalne koliformne bakterije. Bakterije vrste *E. coli* lahko najdemo tako v surovih živilih, kot so mleko, smetana, ribe, zelenjava kot tudi pri slabi toplotni obdelavi mesa (Pandey in sod., 2000). Na mesu, ribah in v mleku se hitro razmnožujejo in povzročajo zakisanje ter kvar (Adamič in sod., 2003). Bakterije vrste *E. coli* so komenzali, saj fermentirajo za nas neprebavljive snovi, v prebavilih ščitijo pred vdorom patogenih bakterij in sintetizirajo vitamin K in biotin (Madigan in sod., 2003).

Leta 1940 so ugotovili, da določeni sevi bakterij vrste *E. coli* povzročajo drisko, predvsem pri otrocih in tako označili to skupino z EPEC. Danes je tako poznanih pet tipov bakterije vrste *E. coli*. Delijo se na enteropatogene *E. coli* (EPEC), enterotoksigene *E. coli* (ETEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), enterohemoragične *E. coli* (EHEC) in enteroagregativne *E. coli* (EAEC/EAggEC). Vrsta okužbe in prisotni simptomi delno nakazujejo značilnosti posameznih tipov bakterij vrste *E. coli* (Jay in sod., 2005; Ray in Bhunia, 2008).

- Bakterije EPEC ne tvorijo enterotoksinov, čeprav lahko povzročajo diarejo. Izločajo proteine (Esp), ki zavirajo fagocitozo.
- Bakterije ETEC so prisotne v tankem črevesu pritrjene s CFAs plazmidi, to so kodirani enterotoksini. Poznamo štiri tipe CFA – I, II, III in IV, ki so bili DNK sekvencirani. Odgovorni so za diarejo tako pri otrocih kot pri odraslih, redko z povišano telesno temperaturo.
- Bakterije EIEC ne tvorijo enterotoksinov imajo pa enteroinvazivne plazmide (pINV), ki so odgovorni za invazivnost. Prisotne so v tankem črevesju človeka in živali. Najpogosteje so odgovorne za diarejo, ki je lahko tudi krvava, griža pa je zelo redka. Inkubacijski čas je med 2 in 48 urami. Tip bakterij EHEC tvori Šigove toksine (SLT) in navadno ne okužijo človeka.

- Nekateri sevi tipa bakterij EHEC tvorijo fimbrije, za pritrjevanje na površino celic. V nasprotju z ostalimi sevi ta ne razgraja sorbitola, uniči jih pasterizacija, medtem ko lahko preživi temperaturo pri -20 °C (Ray in Bhunia, 2008).
- Bakterije EAEC lahko tvorijo toplotno stabilna enterotoksina (ST/EAST1 in STa). Ni še jasno ali so ti sevi odgovorni za okužbo z živili. Okužbi s tem sevom pripisujejo simptome, kot so dolgo trajajoča diareja, ki traja do 14 dni, še posebno pri otrocih (Jay in sod., 2005).

Prenos okužbe na človeka je največkrat z okuženo hrano ali vodo, prek stika z živalmi (Adamič in sod., 2003). Za človeka najnevarnejši sev je *E. coli* O157:H7, čeprav v živilih lahko najdemo več različnih sevov (Pandey in sod., 2000). Splošno znano je, da za preprečevanje okužb s hrano zaradi bakterij vrste *E. coli* lahko dosežemo s hladnim režimom shranjevanja živil, dobro osebno higieno, primernim kuhanjem (čas in dovolj visoka temperatura) in podobno (Jay in sod., 2005).

2.1.3 Bakterije vrste *Staphylococcus aureus*

Bakterije rodu *Staphylococcus* naseljujejo kožo in sluznico ljudi in živali. To so grampozitivni, aerobni ali fakultativno anaerobni koki, družine *Microcaceae* (Martin in Iandolo, 2000). Razmnožujejo se pri temperaturah $6,8\text{--}40\text{ °C}$, pri vrednosti pH od 4,2 do 9,3 ter pri minimalni a_w 0,86 (Adamič in sod., 2003). Nepatogeni sevi rodu so redno prisotni na koži, laseh, nosni votlini in sluznici ljudi in živali (Kapun-Dolinar, 2001). Za živilsko industrijo je pomembnejša vrsta *S. aureus* (Adamič in sod., 2003).

Bakterije vrste *S. aureus* so grampozitivni, katalaza pozitivni koki, ki rastejo pri temperaturi od $7\text{--}48\text{ °C}$, optimalna temperatura je med $35\text{--}40\text{ °C}$ in pri 15 % koncentraciji soli. Razgrajajo glukozo ob tvorbi kisline in plina (Harvey in Gilmour, 2000). Poleg enterotoksinov lahko sintetizirajo še koagulazo, DNazo in hemolizin (FDA, 2012). Bakterije vrste *S. aureus* so sicer fakultativno anaerobne vendar je najboljšo rast opaziti pri aerobnih razmerah. Bakterije vrste *S. aureus* lahko preko bakteriofagov, plazmidov in transporta med celicami pridobijo elemente oz. lastnosti, s katerimi lažje odgovarjajo na spremembe v okolju (Martin in Iandolo, 2000). Te bakterije niso toplotno odporne in jih uničimo že s pasterizacijo, medtem ko so njihovi toksini termostabilni in jih uničimo šele s sterilizacijo (ICMSF, 1996). Toksini stafilokokov so preprosti proteini. Poznamo več kot

dvajset različnih toksinov, imenujemo jih enterotoksini: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU, SEU2, SEV (Argudin in sod., 2010).

Pri proizvodnji živil prihaja do rasti stafilokokov in tvorbe enterotoksinov najpogosteje zaradi neprimerne hlajenja oziroma hranjenja živil pri temperaturi primerni za rast bakterij, zaradi priprave jedi dlje časa pred serviranjem, zaradi slabe osebne higiene in zaradi neprimerne toplotne obdelave (Milohnoja, 2003). Stafilokokne okužbe se pojavljajo posamično ali epidemično in se prenašajo neposredno (z dotikom okužene osebe) ali posredno (preko kontaminiranih predmetov, živil). Največji problem so predvsem bolnišnične okužbe, ki naraščajo po vsem svetu (Kapun-Dolinar, 2001). V veliki meri je za okužbe kriva navzkrižna kontaminacija preko zdravstvenega osebja in zdravih klicenoscev. Pri človeku so primarni izvor stafilokokov nosna votlina, gnojne rane, vneto grlo, lahko so na koži, v očeh, prebavnem traktu. Od tod prehajajo v zrak, prah, na obleko in pripomočke (Jeršek, 2008). Stafilokoki lahko kontaminirajo skoraj vsa živila, najbolj kritična pa so kremna živila (solate, kremne rezine, sladoledi, namazi,...). Veliko je okužb zaradi navzkrižne kontaminacije gotovih jedi (perutninsko meso, kuhano meso, pogrete jedi), ki niso bila shranjene pri dovolj nizki (pod 10 °C) ali dovolj visoki temperaturi (nad 60 °C) (FDA, 2012).

Infekcijska doza je 10^6 cfu/g živila, saj pride pri tej koncentraciji celic do zadostne količine izločenih enterotoksinov. Znaki zastrupitve se pokažejo v času od ene do šestih ur po zaužitju kontaminirane hrane. Simptomi se kažejo v obliki diareje, slabosti, utrujenosti, bruhanja, trebušnih bolečin, glavobola in povišane telesne temperature (Kapun-Dolinar, 2001). Za bakterije vrste *S. aureus* so že leta 1961 v Veliki Britaniji objavili novico o izolatu s pridobljeno odpornostjo na meticilin ali MRSA (ang. Methicilin resistant *S. aureus*) (Gibbons, 2008). Za ta sev bakterij velja, da je odporen na penicilin zaradi encima β -laktamaze (ali penicilinaze), ki razgrajuje ta antibiotik. MRSA je odporna na vse t. i. beta-laktamske antibiotike, kamor poleg meticilina in penicilina sodi tudi amoksicilin (Hemaiswarya in sod., 2008).

2.1.4 Skupno število mikroorganizmov

V to skupino vključujemo mikroorganizme, ki so aerobni mezofilni, to pomeni, da rastejo ob prisotnosti kisika in v temperaturnem območju od 20–40 °C, optimalna temperatura rasti in razmnoževanja pa je med 35–37 °C. Skupno število mikroorganizmov vključuje tako bakterije, plesni in kvasovke, ki so odgovorne za razkroj živil, kot so kruh, mleko in meso (da Silva in sod., 2012).

Nekatere vrste bakterij povzročajo kvar živil, druge vrste bakterij pa povzročijo zastrupitev s hrano, so patogene. Skoraj vsi patogeni mikroorganizmi so mezofili, tako s hlajenjem pod 10 °C nudimo dobro zaščito pred njimi. Ena pomembnejših vrst bakterij, ki so kvarljivci živil so aerobni *Pseudomonas* spp. (FAO, 1991).

Skupno število živih oziroma za reprodukcijo sposobnih mikroorganizmov določimo z metodo štetja kolonij na ploščah (ang. Plate Count). Pri preiskavah živil sta izbira ustreznega gojišča in izbira razmer za inkubacijo težavni, saj živila vsebujejo raznovrstne mikroorganizme (Harrigan, 1998). Na splošno velja, da čim bolj je sestava gojišča zapletena, več različnih mikroorganizmov bo zrastle na/v gojišču. Določitev skupnega števila mikroorganizmov pri temperaturah inkubacije 20–30 °C je lahko indikator higiene živilskega obrata ali pri temperaturah inkubacije 30–37 °C indikator potencialnega zdravstvenega tveganja (Jeršek, 2008). Povečano skupno število pri gotovih jedeh, ki so toplotno obdelane, pri živilih iz skupin slaščic in delikatesnih jedi kaže tudi na nehigienske postopke in razmere v končni pripravi živila in na sekundarno kontaminacijo. Vzrok za preseženo skupno število mikroorganizmov lahko predstavlja tudi dodatek začimb in sladke smetane pri slaščicah s kremo ter neprimerni pogoji shranjevanja že gotovih jedi na temperaturi, ki ni zadosti visoka ali ni zadosti nizka in zato pospešuje razmnoževanje mikroorganizmov (Smernice..., 2005).

2.2 MIKROBIOLOŠKA GOJIŠČA

Ob poznavanju okoljskih dejavnikov in prehranskih potreb, ki vplivajo na rast mikroorganizmov, jim lahko priskrbimo optimalne razmere za rast in razmnoževanje v

laboratoriju. Le-ti vključujejo medij na katerem mikroorganizmi rastejo ter primerno atmosfero (Nester in sod., 2009). Komercialno je poznanih veliko število različnih vrst mikrobioloških gojišč. Poznamo splošna gojišča, na katerih raste več vrst in rodov mikroorganizmov (PCA) in selektivna gojišča, kjer raste le ena vrsta mikroorganizma (VRBL). Nekatera mikrobiološka gojišča vsebujejo različna barvila, druga imajo različno vrednost pH, s sestavo gojišč pa se poskušamo čim bolj približati naravnim razmeram za posamezne vrste bakterij (Pelczar in sod., 2010).

Mikrobiološka gojišča je mogoče opredeliti vsaj na tri načine (Sridhar, 2004):

- glede na agregatno stanje gojišč: tekoče, trdno in pol trdno gojišče,
- glede sestave gojišč (vsebnost hranilnih snovi): splošna gojišča, kompleksna gojišča in sintetična gojišča,
- glede na namembnost: splošna gojišča, obogatitvena, selektivna, diferencialna, kromogena in druga gojišča.

2.2.1 Splošna gojišča

Glede na raznolikost mikroorganizmov, se uporablja širok spekter različnih gojišč za kultivacijo (Nester in sod., 2009). Mikroorganizmi potrebujejo hranila, vir energije in nekatere okoljske dejavnike, ki so potrebni za rast in razmnoževanje (Arulanantham in sod., 2012). Splošna gojišča se uporabljajo za rutinske preiskave živil in vode (Nester in sod., 2009). Komponente takšnih gojišč so določene in gojišče je kemijsko definirano. Sestavni del splošnih gojišč je navadno pepton in goveji ekstrakt (Arulanantham in sod., 2012).

2.2.2 Obogatitvena gojišča

Obogatitvena gojišča so največkrat tekoči medij, ki so namenjena za pospeševanje rasti in razmnoževanje posameznih vrst bakterij. Osnovno načelo je, da z nadzorom hranilnih snovi (gojišče) in ostalih dejavnikov (temperatura, zrak, svetloba, vrednost pH) ustvarimo

ustrezne razmere za posamezne vrste mikroorganizmov. Takšne razmere lahko delujejo na tri načine:

- iskana vrsta mikroorganizmov se tako namnoži, da preraste ostale prisotne vrste mikroorganizmov in jo tako lažje izoliramo,
- z inhibicijo neželenih vrst mikroorganizmov,
- z omogočanjem iskani vrsti mikroorganizmov, da se namnoži ali presnavlja na tak način, da jih je mogoče razlikovati od drugih vrst mikroorganizmov (Aaronson, 1989).

Ob predhodni predpostavki, da je v živilu majhna količina potencialno patogenih mikroorganizmov, jih je potrebno namnožiti. Obogatitveno gojišče vsebuje vrsto sestavin kot so mesni sokovi in proteini, pripravljene kot bogato gojišče za hitro rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Kljub specifični količini sestavin v mediju, je kemijska sestava zelo variabilna (Sridhar, 2004).

2.2.3 Selektivna gojišča

Mnoga mikrobiološka gojišča vsebujejo sestavine, ki zavirajo rast neželenih vrst mikroorganizmov in podpirajo rast iskani vrsti mikroorganizmov. Selektivna gojišča so še posebej uporabna pri izolaciji posameznih vrst mikroorganizmov iz mešane populacije. V številnih selektivnih mikrobioloških gojiščih, ki se uporabljajo za proučevanje mikroorganizmov v naravi, so v gojišče vključene sestavine, ki zagotavljajo samo vir ogljika ali samo vir dušika, tako da v takšnem gojišču lahko raste le nekaj vrst mikroorganizmov. Selektivne spojine, ki so strupene za posamezne vrste mikroorganizmov, se uporabljajo tudi za izolacijo posameznih vrst mikroorganizmov iz vzorcev blata ljudi. Pogosto se v selektivna gojišča vključuje antimikrobne ali strupene snovi, ki zavirajo rast mikroorganizmov, ki jih ne želimo, medtem ko dovoljujejo rast in razmnoževanje iskane vrste mikroorganizmov. Žolčne soli, selenit, telurit, in različna barvila, kot so eozin, kristal vijolično in metilen modro se uporabljajo kot selektivni dodatki (Atlas, 2006). Na primer, selektivno gojišče Thayer-Martin agar, ki je čokoladni agar z dodatkom vsaj treh antibiotikov in se uporablja za izolacijo bakterij vrste *Neisseria*

gonorrhoeae, povzročiteljico gonoreje. Ti antibiotiki zavirajo rast gliv, grampozitivnih bakterij in gramnegativnih bacilov. Ker ti antibiotiki ne zavirajo rasti bakterij vrste *N. gonorrhoeae*, jih lahko izoliramo iz vzorcev v katerih so prisotni drugi mikroorganizmi (Nester in sod., 2009).

2.2.4 Diferencialna gojišča

Diferencialna gojišča vsebujejo snov, ki jo določene bakterije razgradijo. Na primer krvni agar, poleg tega, da je hranilo, je tudi sestavina, ki se jo uporablja za detekcijo mikroorganizmov, ki proizvajajo hemolizin, ki lizira rdeče krvne celice. Lizo vidimo kot čisto ali zeleno cono okoli kolonije na krvnem agarju. Tip hemolize pa se uporablja za identifikacijo mikroorganizmov. Na primer bakterije rodu *Streptococcus*, povzročajo hemolizo, ki jo imenujem alfa hemoliza, okarakterizirana z zeleno cono okoli kolonije (Nester in sod., 2009). Nekatera diferencialna gojišča so zasnovana tako, da se različne vrste bakterij in njihove kolonije na gojišču različno obarvajo. To omogočajo dodana barvila, ki jih mikroorganizmi presnavljajo in tako se kolonije obarvajo. Taka mikrobiološka gojišča so MacConkey agar, TCBS, XLD in drugi (Sridhar, 2004).

2.2.5 Kromogena gojišča

Ena izmed novejših gojišč za hitro odkrivanje patogenih mikroorganizmov v vodi in živilih so kromogena gojišča. Študije v različnih državah so pokazale, da so kromogena gojišča zelo priročna za hitro izolacijo in kvantifikacijo, saj so zaradi encimskih substratov na katere so vezana barvila, kolonije posameznih vrst mikroorganizmov različno obarvane. Študije so pokazale tudi dobro občutljivost kromogenih mikrobioloških gojišč. Za identifikacijo izolatov ni potrebna nova kultivacija in serije biokemijskih testov, kar pomeni, da se z uporabo kromogenih gojišč skrajša čas preiskave ter prihrani material in delo (Tavakoli in sod., 2008). Interakcije med mikroorganizmi in kemijskimi sestavinami gojišč so različne in večinoma odvisne od strukture kromoforov (Jeršek, 2003). Kromofor je brezbarvna spojina, ki po encimski reakciji spremeni barvo (Budzynski, 2001). Kromogeni encimski substrati so v vodi topni in neobčutljivi na temperaturo. So snovi za

specifične encime z vezano kromogeno sestavino. Večina kromogenih encimskih substratov vsebuje derivate fenola; o- in p-nitrofenoli (ONP, PNP), p-nitroanilin (PNA), indoksil (Y) in 5-bromo-4-kloro-3-indlil (X) (Jeršek, 2003).

2.3 METODE ODKRIVANJA MIKROORGANIZMOV

Mikrobiološka preiskava živil je sestavni del zagotavljanja mikrobiološke varnosti v živilski verigi. Za testiranje ustreznosti živil se uporabljajo zakonsko določena mikrobiološka merila oziroma mikrobiološki kriteriji, ki temeljijo na analizi tveganj in kritičnih kontrolnih točkah (ang. Hazard Analysis Critical Control Point HACCP) (Jasson in sod., 2010). Preiskava živil in vzorcev okolja, v katerem se živila predelujejo in hranijo omogoča, da ugotovimo prisotnost patogenih in nepatogenih bakterij, ki kvarijo živila, plesni in toksinov. Interpretacija rezultatov v živilski mikrobiologiji je veliko bolj težavna kot se pričakuje, zato je uporaba načrtov vzorčenja in statističnih izračunov nujna (Pokorn, 1990). Za zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti živil skrbijo različni standardi in predpisi, katere nadzorujejo različne organizacije. Nekatere mednarodne organizacije, ki izvajajo nadzor so Food and Agricultural Organization (FAO), World Health Organization (WHO) in druge (Pelczar in sod., 2010).

V mikrobiološki preiskavi živil določamo mikroorganizme kvantitativno in kvalitativno. Kvantitativno določanje uporabljamo za tri namene in skupine mikroorganizmov: osnovno štetje skupnega števila bakterij, ki opozarja na vse mikroorganizme, prisotnost fekalnih koliformnih mikroorganizmov in enterobakterij, ki opozarja na morebitno nepopolno toplotno obdelavo ali naknadno kontaminacijo in specifične patogene mikroorganizme, ki lahko preživijo toplotno obdelavo, so prisotni v surovih dodatkih živila ali se živila naknadno kontaminirajo (Pokorn, 1990).

2.3.1 Klasične mikrobiološke metode

Standardizirane metode (na primer metode opisane v standardih ISO) so priznane kot referenčne metode za uradni nadzor. Te metode sodijo največkrat med klasične

mikrobiološke metode in se uporabljajo v številnih laboratorijih, zlasti v državnih agencijah. V zadnjih desetletjih se je povečalo zanimanje v razvoju hitrejših metod (Jasson in sod., 2010). Klasične mikrobiološke metode za ugotavljanje prisotnosti in števila mikroorganizmov so kombinacija mikrobioloških in kemijskih reakcij med gojiščem in posamezno vrsto mikroorganizmov. Največkrat se uporabljajo za rast in namnožitev preučevanih mikroorganizmov selektivna, diferencialna ali kromogena gojišča, ki so trdna ali poltrdna in tekoča. Rast mikroorganizmov ugotavljamo s štetjem kolonij na trdnih gojiščih in motnostjo v tekočih gojiščih v kombinaciji z različnimi indikatorji. Štetje kolonij je kvantitativna metoda, ki z različnimi biokemijskimi testi identificiramo različne mikroorganizme in preštujemo nastale kolonije (Houghtby in sod., 1992). Gojišča za klasične mikrobiološke preiskave so cenejša od alternativnih tako imenovanih hitrih metod, ki uporabljajo že vnaprej pripravljena gojišča. Čeprav imajo gojišča pri klasični mikrobiološki preiskavi dovolj nizko mejo detekcije, zahtevajo veliko ročnega dela (Miller, 2009). Tako so Jasson in sod. (2010) naredili obsežno primerjalno raziskavo med klasičnimi mikrobiološkimi metodami in alternativnimi mikrobiološkimi metodami, med drugimi tudi vnaprej pripravljenimi kromogenimi gojišči. Primerjali so različne parametre posamezne mikrobiološke metode, prvi parameter je ustreznost posamezne mikrobiološke metode, glede na zahteve predpisov in zakonov oziroma validacija metode. Drugi parameter uspešnost metode (specifičnost in meje detekcije metode), operativne zahteve (zahteve po opreми in količini dela) in infrastrukturne oziroma prostorske potrebe za posamezno metodo. Ugotovili so da imajo vse metode posamezne prednosti in slabosti in da je potrebno priznati, da nobena metoda ne zagotavlja stodontnih rezultatov. Izziv je, da se izbere metodo, ki izpolnjuje večino zahtev, ki jih ima izvajalec mikrobioloških preiskav. Metode, kot že vnaprej pripravljena kromogena gojišča, so uporabnikom prijazna, saj za branje in interpretacijo rezultatov ne potrebujejo dodatne opreme (mikroskopa, števca kolonij) in ne dodatnih biokemijskih preiskav. Pomembno dejstvo pa je, da so takšne mikrobiološke preiskave hitro končane. Stroškovna učinkovitost se tako odrazi v zmanjšani količini dela, z manj opreme in hitreje pridobljenimi rezultati. Tako so lahko za posamezne laboratorije oziroma izvajalce mikrobioloških preiskav dobra izbira za mikrobiološke preiskave.

2.3.2 Testi RIDA@COUNT

Zahtevnost in dolgotrajnost postopka priprave mikrobioloških gojišč spodbuja izvajalce mikrobioloških preiskav k uporabi vnaprej pripravljenih gojišč (ang.: ready to use media). Čas in delo, namenjeno temu opravilu, izkoristijo izvajalci mikrobioloških preiskav za izpolnjevanje drugih zahtev. Uporaba pripravljenih gojišč omogoča boljšo učinkovitost, ponovljivost in produktivnost laboratorija: večje število testov, opravljenih v krajšem času (Mihovec, 2006).

Poznamo različne alternativne metode, ki so pretežno usmerjene v zmanjševanje obremenitve dela, olajšano delo, zmanjševanje manipulacije vzorcev in skrajšan čas preiskave. Mnoge alternativne metode, ki so trenutno na trgu, so dokazano enakovredne klasičnim mikrobiološkim metodam (Jasson in sod., 2010). Zato je pomembno razumeti, kakšne so tehnične zahteve, kot so občutljivost in specifičnost metode na ravni zaznavanja, tip vzorca, avtomatizacija ter zahtevana stopnja izobraževanja za uporabnika (Miller, 2010).

Testi RIDA@COUNT so sistem že pripravljenih gojišč za štetje posameznih vrst ali skupin mikroorganizmov v živilih. To so že pripravljene sterilni lističi, na katerih so nanosena gojišča, ki omogočajo dobro absorpcijo vzorca in so prekrita s plastično folijo, ki preprečuje kontaminacijo in izsušitev gojišča (Alonso in Poveda, 2008). Testi RIDA@COUNT so gojišča za kvantitativno ugotavljanje mikroorganizmov. R-Biopharm AG (Nemčija) nudi hitre teste za določanje skupnega števila mikroorganizmov, kvasovk in plesni, enterobakterij, koliformnih bakterij, bakterij vrst *E. coli*, *S. aureus* in kombinacije skupin; *E. coli*/ koliformne bakterije in bakterije rodu *Salmonella* / enterobakterije. Princip vseh različnih testov RIDA@COUNT temelji na vključevanju kromogenih snovi v spremenjena klasična gojišča (R-Biopharm, 2012).

2.3.3 Primerjava mikrobioloških metod

Glede na to, da so klasične mikrobiološke metode dolgotrajne, je potreba po hitrejših mikrobioloških metodah, ki bi dale ekvivalentne rezultate, vedno večja. Še posebej to velja za živilskopredelovalno industrijo za spremljanje higiene v obratih in ugotavljanje patogenih bakterij v živilih (Jeršek, 2004).

Raziskave so pokazale, da so kromogena gojišča, ki so pripravljena za takojšnjo uporabo, učinkovitejša, izvedba metod je hitrejša in imajo možnost določanja več vrst bakterij na eni vrsti gojišča, v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi gojišči. Tako je agencija AFNOR testirala 2500 vzorcev vode in ugotovila, da so kromogena gojišča oziroma hitri testi, kot so vnaprej pripravljena gojišča, v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi gojišči enako občutljiva, s hitreje pridobljenim rezultatom (Tavakoli in sod., 2008).

Validacija mikrobiološke metode je postopek ugotavljanja ali metoda ustreza svojemu namenu. Validacijo lahko razdelimo na primarno in sekundarno validacijo. Primarna validacija je postopek za ugotavljanja uspešnosti nove ali spremenjene metode brez operativnih omejitev (optimizacija in organizacija postopka). Sekundarna validacija pa je postopek zbiranja podatkov in so zapisani v specifikaciji metode (EPA, 2009). Specifičnost in občutljivost sta najbolj kritična parametra validacije, vendar robustnost in natančnost zahtevajo svojo ceno (Dugid in sod., 2011).

Uporaba alternativnih mikrobioloških metod v akreditiranih laboratorijih je možna, če so le-te validirane glede na referenčno metodo in jih potrdi tretja stran npr. Slovenska akreditacija ali tuja nacionalna akreditacijska služba, v skladu s protokolom, določenim v standardu ISO 16140 (2003). Če alternativne mikrobiološke metode niso validirane in potrjene, morajo biti te metode validirane v skladu z drugimi mednarodnimi sprejetimi protokoli in je njihovo uporabo potrdil pristojni organ (Smernice, 2009). Kjer se na ustaljen način za interno uporabo v laboratoriju uporablja alternativna mikrobiološka metoda, brez zahtev za izpolnitev zunanjih meril zagotavljanja kakovosti, je lahko primerna manj strožja primerljiva validacija alternativne metode, kot je tista, podana v standardu (ISO 16140, 2003).

Testi RIDA@COUNT se uspešno uporabljajo v živilski industriji, za iskanje kritičnih kontrolnih točk, kjer je potrebna posebna pozornost ali izboljšano čiščenje. Testi RIDA@COUNT so opisani kot kromogena gojišča. Kromogena gojišča imajo veliko prednosti pred klasičnimi mikrobiološkimi gojišči za hitro odkrivanje iskanih mikroorganizmov, z visoko občutljivostjo in možnostjo avtomatizacije (Salo in sod., 2006).

Za določitev aerobnih mezofilnih mikroorganizmov (SŠMO) na 108 mlečnih vzorcih se je metoda z uporabo vnaprej pripravljenih gojišč, Petrifilm™, izkazala za enako uspešno v primerjavi s klasično mikrobiološko metodo štetja kolonij in se je izkazala za primerno alternativo. V primerjavi z vijolično-rdečim agarjem z laktozo (VRBL) za kvantitativno določitev koliformnih bakterij na 120 vzorcih surovega mleka se je metoda z uporabo gojišč Petrifilm™ izkazala za boljšo, obe metodi pa sta primerljivi z rezultati MPN (ang. Most Probable Number). Za razliko od klasičnih mikrobioloških gojišč, metoda z uporabo gojišč Petrifilm™ ne omogoča karakterizacije lastnosti kolonij (Jay in sod., 2005).

Lakmini in Madhujith (2012) sta prav tako primerjala metodo z vnaprej pripravljenimi gojišči Petrifilm™ s klasično mikrobiološko metodo štetja kolonij za bakterije vrste *E. coli*, koliformne bakterije in skupno število mikroorganizmov (SŠMO). V študijo je bilo vključenih 24 vzorcev treh različnih skupin živil, perutninsko meso, sokovi in mleko v prahu. Rezultati so pokazali, da sta metodi z uporabo vnaprej pripravljenih gojišč Petrifilm™ za kvantifikacijo bakterij vrst *E. coli* in SŠMO učinkoviti in glede na pridobljene rezultate primerljivi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami.

Testi RIDA@COUNT se uporabljajo v svetu z dokazano zanesljivostjo. Na Kubi so tako naredili študijo, v kateri so primerjali klasične mikrobiološke metode, za ugotavljanje koliformnih bakterij in enterobakterij in teste RIDA@COUNT. V vzorce sterilnega mleka so cepili bakterije vrst *E. coli*, *S. enterica* Typhimurium in *S. aureus* in jih kvantitativno določali. Rezultati so pokazali, da testi RIDA@COUNT predstavljajo dobro alternativo za laboratorije z omejenimi viri, saj se zmanjša čas in delo v laboratoriju. Kvalitativni rezultati so bili primerljivi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in s tem so pokazali ustreznost testov RIDA@COUNT (Vasallo in sod., 2013).

de Boer in Beumer (1999) sta zapisala, da je pri uvajanju alternativnih metod pomembno, da se upošteva določene zahteve za nove metode, kot so visoka občutljivost in specifičnost metode, ovrednotenje metode, hitra izvedba, možnost avtomatizacije metode, neodvisnost izvedbe metode glede na vrsto živila, nizka cena, enostavna izvedba in hitra dostopnost potrebnih kemikalij.

2.4 MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI

Že pred 30 leti je mednarodna komisija za mikrobiološke specifikacije za živila (ang. International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF) zapisala pravila in navodila za uporabo načrtov vzorčenja in mikrobiološke kriterije za živila. ICMSF je pri zagotavljanju varnosti hrane uvedla koncept verjetnosti in vzorčenja po mikrobioloških kriterijih. Mikrobiološki kriteriji so odvisni od pogojev v katerih so živila, nujno je, da vzorce hranimo na primerni temperaturi, v originalni in zaprti embalaži (Dahms, 2004). Postavitev smiselnih in logičnih mikrobioloških kriterijev je kompleksen proces.

Mikrobiološki kriteriji opredeljujejo sprejemljivost živila, ki temelji na prisotnosti/odsotnosti ali števila mikroorganizmov (in/ali njihovih toksinov) na enoto mase, površine, prostornine ali serije (Cordier in Nestec 2004). Mikrobiološki kriterij je merilo, ki določa sprejemljivost živila, serije živil ali proizvodnega postopka na podlagi odsotnosti, prisotnosti ali števila mikroorganizmov in/ali količine njihovih toksinov/metabolitov na enoto mase, prostornine, površine ali serije.

Mikrobiološki kriteriji so:

- mikrobiološki standardi, so obvezno merilo, in so vključeni v zakone in uredbe, glede skladnosti rezultatov. V primeru neskladnosti, so potrebni točno določeni ukrepi.
- mikrobiološke smernice, so kot vodilo in pomoč pri prepoznavanju situacije, ki zahteva ukrepe.
- mikrobiološki tehnični podatki oziroma specifikacije živil ali surovin, ki so del trgovskega sporazuma med kupcem in dobaviteljem (FAO, 2003).

Obvezni mikrobiološki kriteriji se uporabljajo na določenih točkah v prehranski verigi kjer se pričakuje, da lahko izboljšajo stopnjo varnosti potrošnikov. V primeru živilske industrije, mikrobiološki kriteriji lahko pomagajo pri preverjanju skladnosti z obstoječimi predpisi ter pri preverjanju in/ali potrditvi učinkovitosti svojih preventivnih ukrepov, ti so:

dobra higienska praksa (ang. Good Hygiene Practice GHP) in analiza tveganj kritičnih kontrolnih točk (HACC) (Cordier in Nestec, 2004).

Komponente mikrobioloških kriterijev so (Stannard, 1997):

- mikroorganizmi in njihovi toksini, ugotavljanje kontaminacije s patogenimi mikroorganizmi, s fekalnimi mikroorganizmi in z indikatorskimi mikroorganizmi ali njihovimi toksini. Tu je potrebno paziti na učinkovitost metode glede na ceno mikrobiološke metode, saj je ceneje, lažje in hitreje določati in identificirati indikatorske mikroorganizme kot posamezne patogene mikroorganizme.
- tip živila; mikrobiološki kriterij mora zavzemati živilo v vseh stopnjah proizvodnje, analizirati je potrebno tako surovine, polizdelke kot tudi končne izdelke. Ter merila oziroma kriterije določamo na podlagi stanja v katerem so živila. Kriterij za izdelke, ki so zamrznjeni je drugačen kot za hlajene izdelke ali sveže izdelke.
- mikrobiološke meje; vrednosti mikrobioloških mej morajo biti realne in se določijo s pomočjo znanja iz mikrobiologije surovin, učinkov obdelave živil, namena uporabe živila in skladiščenje živila. Meje lahko določimo pri živilih, kjer so znane razmere obdelave, shranjevanja in značilnosti živila. Da posameznega mikroorganizma ni v živilu ne moremo dokazati, odsotnost mikroorganizmov v živilu pa moramo zapisati kot ni najdeno v 20 oziroma 25 g živila. Za kvantitativne teste, kjer ni vidne rasti, se rezultat zabeleži kot: je manjše (npr. <10 cfu/ g) od meje zaznavnosti.
- plan vzorčenja; je strategija vzorčenja, ki se uporablja za presojo prisotnosti iskanega mikroorganizma in ukrepi, ki jih je potrebno sprejeti na odziv dobljenih rezultatov. ICMSF je opisala dva tipa plana vzorčenja, dvostopenjski in tristopenjski plan vzorčenja, ki se pogosto uporabljata v živilski industriji.
 - Dvostopenjski plan vzorčenja plan je največkrat uporabljen pri določanju prisotnosti patogenih mikroorganizmov. Rezultat takega plana je prisotno/odsotno.
 - Tristopenjski plan vzorčenja je kadar vzorec sestavlja pet vzorčnih enot, je posamezen parameter ocenjen kot skladen (kar pomeni zadovoljiv,

ustrezen), ko so rezultati mikrobiološkega preskušanja manjši ali enaki kot mejna vrednost »m« ($\leq m$) ali n.n. V primeru ko je maksimum dovoljenih rezultatov (c) med »m« in »M« in so ostali rezultati manjši ali enaki mejni vrednosti »m«, je vzorec glede preiskanega parametra sprejemljiv. Če eden ali več rezultatov presežejo mejno vrednost »M« ali n.n. (iskan parameter je najden) ali če je število rezultatov med »m« in »M« večje, kot to dopušča kriterij (c), je vzorec glede preiskanega parametra neskladen (kar pomeni nezadovoljiv, neustrezen, lahko varen ali ne varen). V primeru ocenjevanja parametra za vzorec, ki ga sestavlja samo ena vzorčna enota, je treba upoštevati, da je parameter skladen (kar pomeni zadovoljiv, ustrezen), če so rezultati skladni z zahtevami »m« ali n.n. Kadar je rezultat večji od »m« ali n.n. (iskan parameter je najden), je vzorec glede preiskanega parametra neskladen kar pomeni da je vzorec nezadovoljiv oziroma neustrezen (ZZV, 2004).

**Preglednica 2: Pregled mikrobioloških kriterijev različnih živil (ZZV, 2004, FDA
 Phillippines, 2013)**

Živilo	Nabor priporočenih parametrov	Plan vzorčenja		Kriterij
		n	c	
Moka in mlevski izdelki	Plesni in kvasovke	5	2	m = 10 ² cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g
	SŠMO	5	2	m = 10 ² cfu/g M = 10 ⁶ cfu/g
	Enterobakterije	5	2	m = 10 ² cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g
	<i>E. coli</i>	5	1	m = 10 ² cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g
Peciva, pite in drugi pekovski izdelki z nadevom iz mlečne osnove	SŠMO.	5	2	m = 10 ⁴ cfu/g M = 10 ⁵ cfu/g
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	n.n v 25g
	Enterobakterije	5	2	m = 10 ² cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g
	<i>S. aureus</i>	5	2	m = 2x10 cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g
	<i>E. coli</i>	5	2	m = 2x 10 cfu/g M = 10 ² cfu/g
Peciva, pite in drugi pekovski izdelki brez nadeva iz mlečne osnove	SŠMO	5	2	m = 10 ⁵ cfu/g M = 10 ⁶ cfu/g
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	n.n v 25g
	Enterobakterije	5	2	m = 10 ² cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g
	<i>S. aureus</i>	5	2	m = 2x10 cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g
	<i>E. coli</i>	5	2	m = 2x 10 cfu/g M = 10 ² cfu/g
Zamrznjeni pekovski izdelki z nadevom, ki ima visok a_w	<i>S. aureus</i>	5	1	m = 10 ² cfu/g M = 10 ⁴ cfu/g

n.n – ni najdeno, n – št. vzorčnih enot, c – št. vzorčnih enot, kjer je št. bakterij med »m« in »M«, m – mejna vrednost, pod katero se vse rezultate šteje za zadovoljive, M – mejna dopustna vrednost, nad katero se rezultati ne štejejo več za zadovoljive.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Testi RIDA@COUNT

- Test RIDA@COUNT Enterobacteriaceae (R-Biopharm AG, R1009, Nemčija): Gojišče je namenjeno določanju bakterij družine Enterobacteriaceae. Suha srednja plošča je gojišče za kvantitativno ugotavljanje mikroorganizmov. Test RIDA@COUNT je izdelan iz filmske plasti s suhim gojiščem zajetim v tkanino, ki omogoča popolno absorpcijo raztopine vzorca, spodnje plasti, ki služi kot podpora in vrhnji prosojni film preprečuje nezaželeno onesnaženje z mikroorganizmi iz zraka.
- Test RIDA@COUNT *Escherichia coli* (R-Biopharm AG, R1006, Nemčija): Gojišče je namenjeno določanju bakterij vrste *E. coli*.
- Test RIDA@COUNT *Staphylococcus aureus* (R-Biopharm AG, R1005, Nemčija): Gojišče je namenjeno določanju bakterij vrste *S. aureus*.
- Test RIDA@COUNT Total (R-Biopharm AG, R1001, Nemčija): Gojišče je namenjeno določanju skupnega števila bakterij (SŠMO), ki rastejo na tem neselektivnem gojišču pri 35 °C (AOAC-RI approved, Certifi cate-No.: 011001).

3.1.2 Klasična mikrobiološka gojišča

- Gojišče Vijolično rdeči žolčni agar z laktozo (VRBL; ang.: Violet Red Bile Glucose Agar w/o Lactose) (Himedia Laboratories, M581, Indija); je selektivno gojišče za izolacijo koliformnih bakterij. Gojišče je sestavljeno iz: peptidov, ekstrakt kvasa, natrijev klorid, mešanica žolčnih soli, glukoza barvilo nevtrarno redeče, barvilo kristal vijolično in agar.
- Gojišče za določanje bakterij vrste *E. coli* (Hi Crome, ang.: HiCrome *Escherichia coli* Agar) (Himedia Laboratories, M1295, Indija): je priporočeno gojišče za določanje bakterij vrste *E. coli* v živilih brez nadaljnjih potrditvenih testov. To gojišče je sestavljeno iz sledečih komponent; kazeinski hidrolizat, pepton, mešanica

žolčnih soli, dinatrijev hidrogen fosfat, natrijev dihidrogen fosfat, natrijev klorid, X-glukuronid in agar.

- Gojišče za določanje bakterij vrste *S. aureus* (BP, ang.: Baird Parker Agar Base) (Himedia Laboratories, M043, Indija): z dodatki; je selektivno gojišče za izolacijo in identifikacijo domnevno koagulaza pozitivnih stafilokokov. Sestavljen je iz izvlečka kazeinskega hidrolizata, ekstrakta govedine, ekstrakta kvasa, litijevega klorida, glicina, natrijevega piruvata in agarja.

Dodatki k gojišču:

- Koncentriran jajčni beljak (ang.: Concentrated Egg Yolk Tellurite Emulsion) (FD046) in
 - Kalijev telurit (ang.: Potassium Tellurite solution) (FD052);
- Gojišče za določanje skupnega števila mikroorganizmov (PCA; ang: Plate count agar) (Himedia Laboratories, M091, Indija): je gojišče, ki ga proizvajalec priporoča za določanje mikroorganizmov v hrani, vodi in odpadnih vodah. Sestavljeno je iz encima kazein hidrolizat, ki zagotavlja aminokislino in druge dušikove kompleksne snovi, kvasnega ekstrakta, ki zagotavlja potrebe po vitaminih kompleksa B, dekstroze in agarja.

3.1.3 Vzorci živil

Vzorci so bili izbrani na podlagi najbolj prodajanih izdelkov Pekarne Pečjak d.o.o.:

- Čokoladna rulada
- Francoski rogljiček
- Temni francoski rogljiček z mareličnim nadevom
- Linški piškoti
- Navihanci s čokoladno - lešnikovim nadevom
- Potica orehova – pečena
- Rešetko jogurt - malina
- Skutin burek
- Skutin štrukelj
- Sveže vlečeno testo

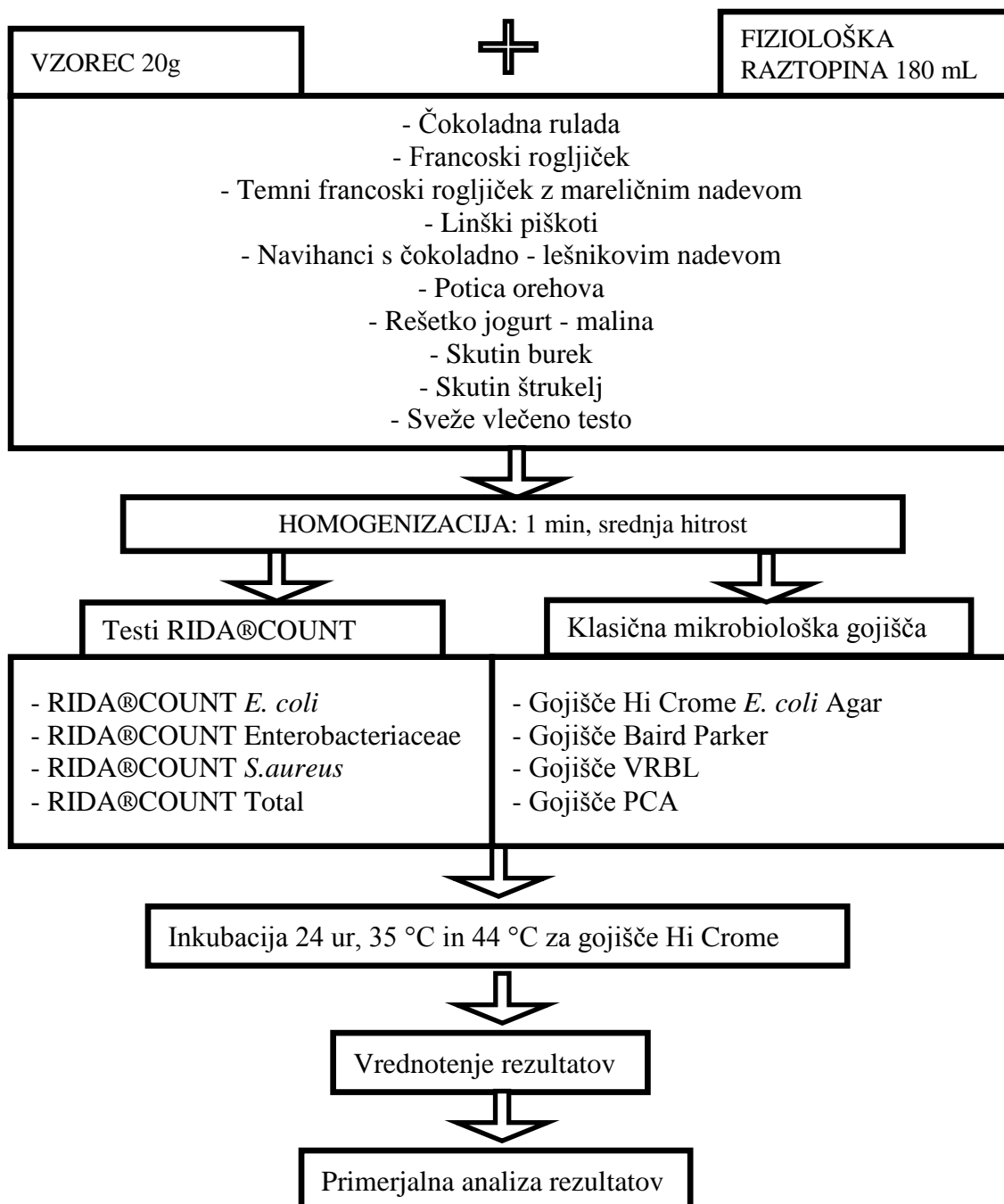
- Zavitek jabolčni

3.1.4 Laboratorijski pribor in oprema

- Osebna varovalna oprema:
 - halja
 - kapa
 - rokavice
- Oprema:
 - tehtnica (Satorius BL1500, ZDA)
 - homogenizator (IUL Masticator, Španija)
 - inkubator (Binder 115BD, Nemčija)
 - avtoklav (Kambič A-21, Slovenija)
 - grelnik z magnetnim mešalom (Stuart UC152, Velika Britanija)
 - plinski gorilnik (Bunsen erdgas DIN 30665, Nemčija)
- Pribor:
 - petrijeve plošče
 - steklena čaša
 - steklena palčka
 - pincete
 - škarje
 - avtomatska pipeta (1 μ l)
 - polnilna pipeta (50mL)
 - sterilni nastavki za pipeto (1mL)
 - homogenizirne vrečke
 - NaCl
 - pisalo (alkoholni marker)

3.2 METODE

3.2.1 Načrt eksperimentalnega dela



Slika 1: Shema eksperimentalnega dela

3.2.2 Priprava gojišč

Klasična mikrobiološka gojišča smo pripravili po navodilih proizvajalca gojišč. Testi RIDA@COUNT so že vnaprej pripravljena gojišča.

Za pripravo vzorca živil smo uporabili fiziološko raztopino, ki smo jo pripravili tako, da smo zatehtali 9 g NaCl v stekleno čašo in ji dodali 1000 mL destilirane vode, vsebino smo premešali ter razdelili v erlenmajerice po 180 mL. Erlenmajerice smo pokrili s folijo in jih 15 minut avtoklavirali pri 121° C. Po končani sterilizaciji smo erlenmajerice ohladili na sobno temperaturo nato do uporabe hranili v hladilniku. Pred začetkom mikrobiološke preiskave smo erlenmajerice s sterilno fiziološko raztopino vzeli iz hladilnika in jih ponovno segreli na sobno temperaturo.

3.2.3 Vzorčenje izdelkov

Posamezne vzorce smo vzorčili na pakirni liniji. Vzorec smo vzeli aseptično (rokavice in sterilna posoda) in prenesli do laboratorija. Nekateri vzorci so bili zamrznjeni (Navihanci s čokoladno - lešnikovim nadevom, Temni francoski rogljiček z mareličnim nadevom, Rešetko jogurt - malina, Skutin burek, Skutin štrukelj in Zavitek jabolčni; -20 °C), drugi hlajeni (sveže vlečeno testo in Čokoladna rulada; 4 °C) ter sobne temperature (Potica orehova, Linški piškoti; 25 °C).

3.2.4 Priprava vzorcev za mikrobiološke preiskave

Zamrznjene izdelke smo odtajali, tako da smo jih za 4 ure postavili na sobno temperaturo (25 °C). Hlajene izdelke smo segreli na sobno temperaturo tako, da smo jih za 2 uri postavili iz hladilnika na sobno temperaturo.

Vsak posamezen vzorec smo zatehtali (20 g) v homogenizirno vrečko, dodali 180 mL fiziološke raztopine in homogenizirali 1 minuto pri srednji hitrosti.

3.2.5 Mikrobiološke preiskave s testi RIDA®COUNT

- Testi RIDA®COUNT:

Pred samo izvedbo smo najprej vse teste RIDA®COUNT primerno označili. Najprej smo označili kontrolo; to je test z 1 mL sterilne fiziološke raztopine, kar smo uporabili za primerjavo z ostalimi testi. Nato smo po pet testov RIDA®COUNT označili z zaporednim številom enote vzorca (od 1 do 5), imenom izdelka, lotom izdelka in datumom izvedbe preiskave. Nato smo iz homogenizirne vreče (3.2.4) prenesli po 1 mL homogeniziranega vzorca na test RIDA®COUNT.

Po 24 urni inkubaciji pri 35 °C smo odčitali rezultate. Na testu RIDA®COUNT smo prešteli število kolonij, ki so zrasle na testu RIDA®COUNT in se obarvale, glede na izbrano gojišče in preiskovan mikroorganizem. Število mikroorganizmov (\tilde{N}) smo izračunali po enačbi 1.

3.2.6 Klasične mikrobiološke preiskave

Pred samo izvedbo smo najprej vse petrijeve plošče z gojišči primerno označili. Najprej smo označili kontrolo; to je petrijeva plošča z ustreznim gojiščem na katerega smo dodali 1 mL sterilne fiziološke raztopine. Nato smo po pet petrijevk z gojiščem označili z vrsto gojišča, zaporednimi številom enote vzorca (od 1 do 5), imenom izdelka, lotom izdelka in datumom izvedbe preiskave. Nato smo iz homogenizirne vreče (3.2.4) po 1 mL homogeniziranega vzorca prenesli na ustrezno gojišče v petrijevki. Vzorec smo s stekleno sterilno stekleno palčko razmazali po celotnem gojišču. Po 24 urni inkubaciji pri 35 °C in 44 °C za gojišče HiCrome *E. coli* Agar smo odčitali rezultate. Na gojišču smo prešteli število kolonij. Število mikroorganizmov (\bar{N}) smo izračunali po enačbi 1.

Za enterobakterije so značilne rožno-rdeče kolonije na gojišču VRLB. Za bakterije vrste *E. coli* so značilne svetlo modre kolonije na gojišču HiCrome *E. coli* Agar in za bakterije vrste *S. aureus* so značilne črne-svetleče in relativno velike kolonije gojišču BP. Za SŠMO so značilne blede rumene kolonije na gojišču PCA.

3.2.7 Statistična analiza

Vrednosti opazovanih parametrov, smo vnesli v računalnik s programom Microsoft Excel 2000, nato smo s programskim paketom SAS/STAT (SAS Software, 1999) izračunali osnovne statistične parametre, kot povprečje, standardna deviacija, najmanjša in največja vrednost ter statistično obdelali podatke za posamezno opazovano lastnost. Za vrednotenje razlik med klasično metodo in testi RIDA@COUNT pa smo uporabili postopek PROC TTEST (t-test v paru).

4 REZULTATI

4.1 KVANTIFIKACIJA RAZLIČNIH MIKROORGANIZMOV Z RAZLIČNIMI METODAMI

Za kvantifikacijo mikroorganizmov smo uporabili dve metodi. Prva je bila klasična mikrobiološka metoda, katera uporablja klasična gojišča in druga testi, to so testi RIDA@COUNT.

Preglednica 3: Določanje različnih mikroorganizmov v živilih s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA@COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 11)	Klasična metoda	Testi RIDA@COUNT
SŠMO (cfu/g)	Ñ	656	127
	SO	1081	185
	KV	165	145
	t-vrednost 2,12 (znač. 0,052)		
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	501	190
	SO	629	276
	KV	126	145
	t-vrednost 3,71 (znač. 0,0005)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
	SO	0	0
	KV	0	0
	t-vrednost 1 (znač. 0,322)		
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	56	64
	SO	76	126
	KV	136	196
	t-vrednost 0,46 (znač. 0,645)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, SŠMO: skupno število mikroorganizmov, znač: raven statistične značilnosti

V Preglednici 3 so prikazana povprečna števila mikroorganizmov v testiranih živilih in sicer smo določali skupno število mikroorganizmov, število enterobakterij, ter število bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*. Povprečna števila mikroorganizmov smo določili vzporedno s klasično mikrobiološko metodo in s testi RIDA@COUNT v različnih vzorcih živil. Razlika med povprečnim številom dobljenim s klasično mikrobiološko metodo in testom RIDA@COUNT je statistično značilna pri enterobakterijah, medtem ko so

povprečna števila bakterij vrst *E. coli*, *S. aureus* ter SŠMO enaka oziroma je razlika med njimi statistično neznačilna.

V Preglednici 4 so prikazana povprečna števila mikroorganizmov, enterobakterij, bakterij vrste *E. coli* in bakterij vrste *S. aureus*, določenih v izdelku Čokoladna rulada. Statistično značilno višje povprečno število enterobakterij in bakterij vrste *S. aureus* smo določili s klasično mikrobiološko metodo.

Povprečno število bakterij vrste *E. coli* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testu RIDA®COUNT.

Preglednica 4: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Čokoladna rulada s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
SŠMO (cfu/g)	Ñ	1950	364
	SO	975	122
	KV	50	34
	t-vrednost 3,29 (znač. 0,0301)		
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	472	34
	SO	153	11
	KV	32	34
	t-vrednost 6,73 (znač. 0,030)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	28	9
	SO	15	0
	KV	54	0
	t-vrednost 3,29 (znač. 0,05)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, SŠMO: skupno število mikroorganizmov, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 5 so povprečna števila enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določena v izdelku Francoski rogljiček.

Statistično značilno višje povprečno število bakterij vrste *S. aureus* smo določili s klasično mikrobiološko metodo. Povprečno število bakterij vrste *E. coli* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 5: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Francoski rogljiček s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	494	452
	SO	74	73
	KV	15	16
	t-vrednost 1,44 (znač. 0,224)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	104	32
	SO	53	17
	KV	51	53
	t-vrednost 2,69 (znač. 0,054)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 6 so povprečne vrednosti enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Temni francoski rogljiček z mareličnim nadevom. Statistično značilno višje povprečno število enterobakterij smo določili s klasično mikrobiološko metodo. Statistično značilno višje povprečno število bakterij vrst *S. aureus* določili s testom RIDA®COUNT. Povprečno število bakterij vrst *E. coli* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 6: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Temni francoski rogljiček z mareličnim nadevom s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	1300	306
	SO	274	60
	KV	21	20
	t-vrednost 8,52 (znač. 0,001)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	50	358
	SO	21	217
	KV	42	61
	t-vrednost 3,03 (znač. 0,039)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v Preglednici 7 so povprečna števila mikroorganizmov, enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Linški piškoti.

Povprečno število SŠMO, enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 7: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Linški piškoti s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
SŠMO (cfu/g)	Ñ	9	9
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	9	9

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SŠMO: skupno število mikroorganizmov.

Rezultati v preglednici 8 so povprečna števila enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Navihanci s čokoladno - lešnikovim nadevom.

Statistično značilno višje povprečno število enterobakterij smo določili s klasično mikrobiološko metodo. Povprečno število bakterij vrst *E. coli* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 8: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Navihanci s čokoladno - lešnikovim nadevom s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	374	46
	SO	104	21
	KV	28	45
	t-vrednost 7,74 (znač. 0,002)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	152	150
	SO	168	141
	KV	111	94
	t-vrednost 0,03 (znač. 0,981)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 9 so povprečna števila mikroorganizmov, enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Potica orehova – pečena.

Statistično značilno višje povprečno število enterobakterij smo določili s klasično mikrobiološko metodo.

Povprečno število SŠMO, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 9: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Potica orehova – pečena s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
SŠMO (cfu/g)	\bar{N}	9	9
Enterobakterije (cfu/g)	\bar{N}	68	9
	SO	13	0
	KV	19	0
	t-vrednost 10,12 (znač. 0,005)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	\bar{N}	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	\bar{N}	9	9

Legenda: n: število vzorcev, \bar{N} : povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 10 so povprečna števila enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Rešetko jogurt - malina.

Razlika med povprečnim številom je statistično neznačilna pri enterobakterijah, medtem ko so povprečna števila bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus* enaka oziroma je razlika med njimi statistično neznačilna.

Preglednica 10: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Rešetko jogurt - malina s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	252	13
	SO	240	9
	KV	95	68
	t-vrednost 2,28 (znač. 0,085)		
E. coli (cfu/g)	Ñ	7	9
	SO	4	0
	KV	56	0
	t-vrednost 1 (znač. 0,374)		
S. aureus (cfu/g)	Ñ	82	75
	SO	79	57
	KV	96	75
	t-vrednost 0,21 (znač. 0,842)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 11 so povprečna števila enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Skutin burek.

Statistično značilno višje povprečno število bakterij vrst *S. aureus* smo določili s klasično mikrobiološko metodo, medtem ko so povprečna števila enterobakterij enaka oziroma je razlika med njimi statistično neznačilna. Povprečno število bakterij vrst *E. coli* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 11: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Skutin burek s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	340	200
	SO	200	50
	KV	59	25
	t-vrednost 1,51 (znač. 0,206)		
E. coli (cfu/g)	Ñ	9	9
S. aureus (cfu/g)	Ñ	142	9
	SO	40	1
	KV	28	6
	t-vrednost 7,42 (znač. 0,002)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 12 so povprečna števila enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Skutin štrukelj.

Razlika med povprečnim številom je statistično neznačilna pri enterobakterijah. Povprečno število bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 12: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Skutin štrukelj s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	614	912
	SO	460	192
	KV	75	21
	t-vrednost 1,92 (znač. 0,127)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	9	9

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 13 so povprečna števila enterobakterij, bakterij vrste *E. coli* in bakterij vrste *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Sveže vlečeno testo.

Razlika med povprečnim številom je statistično neznačilna pri enterobakterijah.

Povprečno število bakterij vrste *E. coli* in bakterij vrste *S. aureus* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 13: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Sveže vlečeno testo s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	13	9
	SO	9	0
	KV	69	0
	t-vrednost 1,06 (znač. 0,349)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	9	9

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečno število mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

Rezultati v preglednici 14 so povprečna števila enterobakterij, bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus*, vzporedno določenih v izdelku Zavitek jabolčni.

Razlika med povprečnim številom je statistično neznačilna pri enterobakterijah. Povprečno število bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus* je enako pri klasični mikrobiološki preiskavi in testom RIDA®COUNT.

Preglednica 14: Določanje različnih mikroorganizmov v izdelku Zavitek jabolčni s klasičnimi mikrobiološkimi metodami in testi RIDA®COUNT

Skupina MO	Parameter (n = 5)	Klasična metoda	Testi RIDA®COUNT
Enterobakterije (cfu/g)	Ñ	13	9
	SO	9	0
	KV	69	0
	t-vrednost 2,53 (znač. 0,064)		
<i>E. coli</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
<i>S. aureus</i> (cfu/g)	Ñ	9	9
	t-vrednost 1,22 (znač. 0,291)		

Legenda: n: število vzorcev, Ñ: povprečna vrednost števila mikroorganizmov (cfu/g), SO: standardni odklon, KV: koeficient variacije, znač.: raven statistične značilnosti

4.2 ČAS IZVEDBE KLASIČNIH IN ALTERNATIVNIH MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV

Primerjali smo čas izvedbe klasične mikrobiološke preiskave in testa RIDA®COUNT. Za pregledno primerjavo smo izvedbo preiskave razdelili na pet elementov: priprava gojišč, označitev gojišč, nanos vzorca na gojišče, inkubacija in odčitavanje rezultatov.

Za vzorčenje smo upoštevali čas aseptičnega odvzema vzorca iz linje in prenos do laboratorija. Priprava vzorca za mikrobiološko preiskavo zavzema tajanje zamrznjenih izdelkov (4 ure na sobni temperaturi (25 °C)). V pripravo gojišč je zajeto tehtanje suhega gojišča, ustrezna razredčitev z destilirano vodo, mešanje in gretje, da se gojišče raztopi in homogenizira, avtoklaviranje, hlajenje gojišč na 45 °C in prelivanje gojišč v petrijeve plošče in hlajenje gojišč na 25 °C. Označitev gojišč, to je napis na petrijevo ploščo gojišča oziroma napis na test RIDA®COUNT, ki vključuje ime gojišča, za klasično mikrobiološko metodo, ime nanosenega vzorca, zaporedno število enote vzorca (od 1 do 5), lot vzorca in datum izvedbe mikrobiološke preiskave. Nanos vzorca vključuje prenos 1 mL vzorca za hitre teste, ter prenos vzorca in razmaz po gojišču v petrijevi plošči pri klasičnih

mikrobioloških metodah. Odčitavanje rezultatov je štetje kolonij, ki je pri testih RIDA@COUNT hitrejše zaradi že vnaprej odtisnjene centimetrske mreže čez celotno gojišče kot pri odčitavanju na gojiščih v petrijevih ploščah.

Preglednica 15: Čas za izvedbo klasične mikrobiološke metode in testa RIDA@COUNT

Element postopka	Čas (min)	
	Klasična metoda	Testi RIDA@COUNT
Vzorčenje	5	5
Priprava vzorca za mikrobiološko preiskavo	240	240
Priprava gojišč	120	0
Označitev gojišč	5	2
Nanos vzorca na gojišče	7	5
Inkubacija	1440	1440
Odčitavanje rezultatov	10	7
Σ	1837	1709

V Preglednici 15 smo predstavili elemente izvedbe mikrobiološke preiskave za en vzorec v petih ponovitvah, za časovno enoto smo vzeli minuto. Za izvedbo klasične mikrobiološke metode smo potrebovali 30,6 ur, medtem ko smo za teste RIDA@COUNT potrebovali 28,5 ur kar pomeni, da smo pri klasični mikrobiološki metodi potrebovali 2,1 ure več časa.

4.3 ZAHTEVNOST IZVEDBE KLASIČNIH IN ALTERNATIVNIH MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV

Zahtevnost mikrobioloških metod smo razdelili na zahtevnost priprave materiala za mikrobiološko preiskavo, zahtevnost izvedbe ter zahtevnost glede potrebnega materiala in aparatur.

4.3.1 Zahtevnost priprave materiala, nanos in odčitavanje rezultatov

Za pregledno primerjavo smo izvedbo mikrobioloških preiskav razdelili na štiri elemente; priprava gojišč, označitev gojišč, nanos vzorca na gojišče in odčitavanje rezultatov.

Za pripravo gojišč smo upoštevali tehtanje suhega gojišča, ustrezno razredčitev z destilirano vodo, mešanje in gretje, da se gojišče raztopi in homogenizira, avtoklaviranje, hlajenje gojišča na 45 °C in prelivanje gojišča v petrijeve plošče nato hlajenje gojišč na sobno temperaturo (25 °C). Označitev gojišč, to je napis na gojišče, ki vključuje ime gojišča pri klasični mikrobiološki metodi, ime nanesenega vzorca, zaporedno število enote vzorca (od 1 do 5), lot vzorca in datum izvedbe mikrobiološke preiskave. Nanos vzorca vključuje prenos 1 mL vzorca in razmaz po gojišču v petrijevi plošči pri klasičnih mikrobioloških metodah. Odčitavanje rezultatov je štetje kolonij, pri testih RIDA@COUNT je hitrejše zaradi že vnaprej odtisnjene centimetske mreže čez celotno gojišče.

V Preglednici 16 smo predstavili zahtevnost elementov za izvedbo mikrobiološke preiskave za en vzorec v petih ponovitvah. Predstavljeni posamezni elementi so bili vzeti zaradi njihove specifičnosti glede na izbrano mikrobiološko metodo, zato so izvzeti elementi, kot so vzorčenje, priprava vzorca za mikrobiološko preiskavo, inkubacija in vrednotenje rezultatov. Rezultate smo vrednotili z ocenami od 1 do 3, tako so pokazali, da je zahtevnost testov RIDA@COUNT 2,5-krat manjša oziroma lažja kot pri klasičnih mikrobioloških preiskavah.

Preglednica 16: Prikaz elementov priprave materiala za mikrobiološko preiskavo pri klasični mikrobiološki metodi in testu RIDA®COUNT

Element postopka	Klasična mikrobiološka metoda	Ocena zahtevnosti	Testi RIDA®COUNT	Ocena zahtevnosti
Priprava gojišč	Tehtanje suhega gojišča, raztapljanje v destilirani vodi, avtoklaviranje, hlajenje gojišč, prelivanje gojišč, hlajenje gojišč	3	/	0
Označitev gojišč	Pisanje ime gojišča, zaporedno št. enote vzorca, ime vzorca, lot vzorca in datuma preiskave	2	Pisanje zaporednega št. enote vzorca, ime vzorca, lot vzorca in datuma preiskave	1
Nanos vzorca	Nanos in razmaz vzorca	2	Nanos vzorca	1
Odčitavanje rezultatov	Štetje kolonij	3	Štetje kolonij	2
Σ		10/12		4/12

Legenda: ocena 1 je nezahtevno, 2 je zahtevno, 3 je zelo zahtevno.

4.3.2 Zahtevnost glede materiala in aparatur

V temu delu smo naredili pregled vsega uporabljenega materiala in aparatur potrebnih za izvedbo preiskav in primerjali uporabo le teh pri klasični mikrobiološki metodi in testih RIDA®COUNT.

Preglednica 17: Pregled aparatur in materiala uporabljenega pri klasičnih in alternativnih mikrobioloških preiskavah

Pribor	Klasična mikrobiološka metoda	Ocena zahtevnosti	Testi RIDA®COUNT	Ocena zahtevnosti
Tehtnica	da	2	da	1
Homogenizator	da	1	da	1
Inkubator	večji	2	manjši	1
Avtoklav	da	2	da	1
Grelnik z magnetnim mešalom	da	2	ne	0
Plinski gorilnik	da	1	da	1
Petrijeve plošče	da	1	ne	0
Steklena čaša	da	1	ne	0
Steklena palčka	da	1	ne	0
Nastavki za pipeto	da	1	da	1
Avtomatska pipeta z nastavki	da	1	da	1
Polnilna pipeta	da	1	ne	0
Pinceta in škarje	da	1	da	1
Homogenizirne vrečke	da	1	da	1
Pisalo (označitev)	da	2	da	1
Σ		20/30		10/30

Legenda: ocena 0 ni potrebno, 1 je manj zahtevno in 2 je bolj zahtevno.

Kot prikazuje preglednica 17 je klasična mikrobiološka metoda glede materiala in aparatur zahtevnejša metoda kot test RIDA®COUNT.

Tehtnica je aparat, ki je zahtevan pri obeh metodah, vendar zaradi priprave gojišč, je pri klasični mikrobiološki metodi višja ocena zahtevnosti kot pri testu RIDA®COUNT. Avtoklav in inkubator sta aparaturi, ki sta prav tako nujni pri obeh vrstah mikrobioloških preiskav, vendar je ocena zahtevnosti pri klasični mikrobiološki metodi višja zaradi večkratne uporabe avtoklava in pri inkubatorju zaradi velikost aparature, saj je velikost ključnega pomena tako pri ceni aparature kot tudi prostor, ki ga zavzame v laboratoriju.

Petrijeve plošče, steklena čaša, steklena palčka in polnilna pipeta so material potreben le pri izvedbi klasične mikrobiološke metode, zaradi priprave gojišč. Pisalo je tudi material, ki je pri klasični mikrobiološki metodi ocenjen z večjo zahtevnostjo, zaradi večjega števila informacij, ki so potrebne pri označitvi gojišč.

4.4 OCENA STROŠKOV MATERIALA PRI KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH GOJIŠČIH IN TESTIH RIDA@COUNT

V preglednici 18 smo prikazali cene klasičnih mikrobioloških gojišč ter testov RIDA@COUNT. Stroški so ocenjeni za en vzorec v petih ponovitvah. Cene prikazane v preglednici 18 so brez davka na dodano vrednost.

Preglednica 18: Primerjava stroškov materiala za klasična mikrobiološka gojišča in teste RIDA@COUNT

Preiskovani mikroorganizmi	Ime gojišča	Klasično mikrobiološko gojišče (5 kom)	Ime testa	Testi RIDA@COUNT (5 kom)
SŠMO	PCA	0,15 €	RIDA@COUNT Total	3 €
Enterobakterije	VRBL	0,22 €	RIDA@COUNT Enterobacteriaceae	4 €
<i>E. coli</i>	Hi Crome	0,6 €	RIDA@COUNT <i>Escherichia coli</i>	4 €
<i>S. aureus</i>	Baird Parker	0,65 €	RIDA@COUNT <i>Staphylococcus aureus</i>	4 €
Petrijeve plošče		2 €		0 €
Σ		3,6 €		15 €

Kot prikazuje preglednica 18 so klasična mikrobiološka gojišča skoraj 4-krat cenejša kot testi RIDA@COUNT. Pri tem pa je potrebno upoštevati še dejavnike, ki dodatno vplivajo na končno ceno klasične mikrobiološke metode. Pri klasični mikrobiološki metodi je potreben večji inkubator, magnetno mešalo ter dodatna steklovina, kar predstavlja višji začetni strošek. Prav tako je pri klasični mikrobiološki metodi potrebno 0,9-krat več časa, kar ravno tako zviša končni strošek.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V našem eksperimentalnem delu smo se osredotočili na primerjavo klasičnih mikrobioloških metod s testi RIDA@COUNT. Določali smo enterobakterije, bakterije vrst *E. coli* in *S. aureus* in skupno število mikroorganizmov (SŠMO) v mini pekovskih izdelkih. Poskusili smo dokazati, da testi podajo primerljive rezultate, da so časovno hitrejši in so manj zahtevni. Kvantitativne rezultate smo statistično primerjali tako, da smo izračunali povprečno število mikroorganizmov in nato primerjali rezultate s t-testom. Zahtevnost mikrobioloških metod smo razdelili na zahtevnost priprave materiala za mikrobiološko preiskavo, zahtevnost izvedbe preiskave in zahtevnost glede potrebe materiala in aparatur. Čas izvedbe preiskav smo razdelili na pet elementov: priprava gojišč, označitev gojišč, nanos vzorca na gojišče, inkubacija in odčitavanje rezultatov. Inkubacija je pri klasični mikrobiološki metodi, po navodilih proizvajalca Himedia Laboratories (Indija) za vse mikroorganizme 24 ur pri 35 °C za gojišče HiCrome *E. coli* Agar pa 44 °C. Inkubacija je pri testih RIDA@COUNT, po navodilih proizvajalca R-Biopharm AG (Nemčija), tudi 24 ur pri 35 °C.

Testi lahko pomenijo pomembne izboljšave glede pravočasnosti v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi metodami. Čeprav se klasične mikrobiološke metode uporabljajo za izolacijo mikroorganizmov v proizvodnem okolju, te predstavljajo omejitve, ki postajajo vse bolj očitne. Zahteve za velike količine vzorcev, ročni pregled kultur, ter odkrivanjem rasti, ki temeljijo na vizualnem opazovanju, so nekatere omejitve, ki so bistvene za klasične mikrobiološke metode (FAO, 2008). Pierce (2012) navaja, da se bo v naslednjih letih uporaba tradicionalne mikrobiološke metodologije zmanjšala, čeprav je še vedno prevladujoč mehanizem za testiranje, medtem ko se bo povpraševanje po hitrih testih povečalo.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Primerjava kvantitativnih rezultatov

Z eksperimentalnim delom smo pokazali, da pri bakterijah vrst *E. coli* in *S. aureus* in SŠMO dobimo primerljive rezultate. V 100 % vzorcev, ne glede na izbrano mikrobiološko metodo, so bili rezultati enaki za bakterije vrst *E. coli*. V 55 % vzorcev smo dobili enako povprečno število bakterij vrst *S. aureus*. V 66 % vzorcev pa smo dobili enako povprečno skupno število mikroorganizmov SŠMO. Rybal in sod. (2012) so primerjali klasične mikrobiološke metode s testi RIDA@COUNT. Za detekcijo bakterij vrste *Paenibacillus larvae* so uporabili teste RIDA@COUNT Total z dodatkom TTC v inokulumu. Kvantitativna primerjava med klasično mikrobiološko metodo in testi RIDA@COUNT je pokazala enaka števila inokuliranih spor bakterij vrste *P. larvae*. Ellis in Meldrum (2002) sta primerjala hitri metodi, Compact Dry TC in Petrifilmi™, s klasično mikrobiološko metodo. V 236 naključno izbranih in naravno kontaminiranih vzorcih živil in mleka sta določila SŠMO. Ob primerjavi rezultatov vseh treh metod, sta ugotovila, da sta povprečna logaritemska vrednost in standardni odklon primerljiva za vse tri metode. V 86 % rezultatov so le-ti podali enako oceno v skladu z angleškimi smernicami za mikrobiološko varnost živil. Tako kot Rybal in sod. (2012) ter Ellis in Meldrum (2002) smo tudi mi dobili primerljive kvantitativne rezultate primerjave testov s klasično mikrobiološko metodo. Rezultati so bili različni le pri enterobakterijah, višje povprečno število bakterij smo dobili s klasično mikrobiološko metodo. Vzrokov za razlike med metodami je lahko več. Najprej so tehnični, kot neumerjena pipeta ali tehtnica, saj delo je bilo opravljeno aseptično, istočasno in brez razlik med temperaturo in časom inkubacije posamezne preiskave. Nato je to lahko le naključje in bi za realnejšo oceno bilo potrebno izvesti več preiskav, možnost je tudi ob upoštevanju, da smo primerjali dve mikrobiološki metodi med seboj brez metode po standardih ISO, da tako nimamo osnovne oziroma standardizirane metode za primerjavo določitve, katera metoda je natančnejša oziroma je rezultat metode bližje standardizirani.

5.1.2 Čas izvedbe

Izraz »hitri test« lahko razlagamo tako, da do rezultatov pridemo v krajšem času, ali pa se nanaša tudi na boljši pretok dela med rokovanjem z več vzorcev naenkrat in se torej nanaša na udobje in avtomatizacijo v laboratoriju (Pierce, 2012).

Čas izvedbe metod smo razdelili na posamezne elemente, pri katerih nastane časovna razlika. Priprava gojišč za klasično mikrobiološko metodo je dolgotrajen in zahteven postopek (Smittle in Okrend, 2001). V našem eksperimentalnem delu smo pokazali, da priprava klasičnih mikrobioloških gojišč vzame 15 % časa celotne izvedbe klasične mikrobiološke metode. To predstavlja 2 uri, ročnega dela, avtoklaviranje, ... medtem ko pri testih RIDA@COUNT ni tega zamudnega dela.

Označitev gojišč pri klasični mikrobiološki metodi je nekoliko dolgotrajnejše, saj je poleg vseh označb, kot so ime preiskovanega vzorca, zaporedno število enote vzorca, datum izvedbe preiskave, potrebno še dopisati ime gojišča oz. vrsto preiskovanega mikroorganizma, medtem ko imajo testi RIDA@COUNT različne barvne trakove za vsak preiskovan mikroorganizem oziroma skupino mikroorganizmov. Pri klasični mikrobiološki metodi se vzorec vmešava ali razmazuje po površini gojišča, pri testih RIDA@COUNT to ni potrebno, saj za to poskrbi delno vpojna netkana tkanina delno pa zaščitna folija s katero prekrijemo gojišče in z njo tudi razmažemo vzorec po gojišču. Odčitavanje rezultatov je pri testih RIDA@COUNT zelo poenostavljeno zaradi že vnaprej odtisnjene centimetrske mreže na zgornji prekrivni foliji ter vedno bele podlage. Medtem ko pri klasični mikrobioloških gojiščih barva gojišča variira od blede rumene za SŠMO do vijolične pri enterobakterijah. Čas, ki je bil potreben za izvedbo klasične mikrobiološke metode, je bil v našem primeru 30,6 ur, medtem ko za teste RIDA@COUNT 28,5ur. Kot je navedel že Miller (2009), je klasična mikrobiološka preiskava poceni, vendar zahteva veliko časa in med tem časom lahko izdelek čaka, da opravijo pregled na preiskovane mikroorganizme. Avtomatizacija pri mikrobioloških metodah je lahko zelo koristna, tako se da zmanjšati čas potreben za pripravo medijev, serijskih razredčitev, preštevanja kolonij, itd. (Glynn in sod., 2006).

5.1.3 Zahtevnost izvedbe

Pregledali smo zahtevnost posameznih elementov mikrobiološke preiskave, kot so priprava gojišč, označba gojišč, nanos vzorca na gojišče in odčitavanje rezultatov. V eksperimentalnem delu naloge smo ocenili zahtevnost od 1 do 3, pri čemer je 1 nezahtevno in 3 zelo zahtevno. Pri klasični mikrobiološki metodi je postopek priprave gojišča dolgotrajen, vsebuje pripravo razmerja gojišča in destilirane vode, mešanje oz. kuhanje gojišča, avtoklaviranje, hlajenje na 45 °C, prelivanje v petrijeve plošče in hlajenje na 25 °C (García-Armesto in sod., 1993). Medtem ko pri testih RIDA®COUNT vse to ni potrebno, saj so testi pripravljene za takojšnjo uporabo.

Označba gojišč se pri klasični mikrobiološki metodi podaljša, saj je poleg imena vzorca, lot, datuma izvedbe preiskave, zaporedno število enote vzorca, potrebno vpisati tudi ime gojišča, medtem ko so testi RIDA®COUNT barvno označeni po skupini mikroorganizmov. Nanos vzorca se pri klasični mikrobiološki metodi podaljša zaradi razmaza po petrijevi plošči (Koch, 1994) medtem, ko pri testu RIDA®COUNT to ni potrebno zaradi vpojne netkane tkanine in zaščitne zgornje plasti testa (R-Biopharm AG, 2011).

Za inkubacijo pri klasični mikrobiološki metodi potrebujemo inkubator z večjo prostornino, zaradi prostornega razmerja med petrijevimi ploščami in testi RIDA®COUNT. Petrijeve plošče v višino merijo 1 cm, medtem ko so testi RIDA®COUNT tanki kot list papirja. Prostorninsko razmerje med petrijevimi ploščami in testi RIDA®COUNT je 1:10. Odčitavanje rezultatov je pri testu RIDA®COUNT olajšano zaradi že vnaprej odtisnjene števne mreže ter zaradi bele barve tkanine, katera omogoča boljši kontrast med gojiščem in obarvanimi kolonijami preiskovanih mikroorganizmov.

Ocenili smo, da je klasična mikrobiološka metoda zelo zahtevna glede priprave materiala za mikrobiološko preiskavo z oceno 10 in testi RIDA®COUNT z oceno 4 od možnih 12.

Naša ocena zahtevnosti vsebuje tudi zahtevnost metode glede aparatur in potrebnega materiala. Klasična mikrobiološka metoda potrebuje večji inkubator, grelnik z magnetnim mešalom, petrijeve plošče, stekleno čašo, stekleno palčko in polnilno pipeto z razliko od testov RIDA®COUNT, ki vsega naštetega ne potrebujejo. Glede aparatur in materiala smo zahtevnost ocenili od 0, ki pomeni, da je nepotrebno, 1 manj zahtevno in 2 bolj zahtevno.

Od skupaj 30 možnih točk težavnosti je klasična mikrobiološka metoda dosegla 20 točk, medtem ko so testi RIDA®COUNT bili ocenjeni s težavnostno stopnjo 10 točk od 30.

Ob upoštevanju vseh ocen zahtevnosti metode lahko rečemo, da je klasična mikrobiološka metoda zelo zahtevna glede ročnega dela, aparaturne in materialne. Skupaj smo ocenili, da je klasična mikrobiološka metoda dosegla skupno oceno zahtevnosti 70 %, medtem ko so testi RIDA®COUNT dosegli le 33 % možne zahtevnosti metode.

5.1.4 Ocena materialnih stroškov

V eksperimentalnem delu smo ugotovili, da so testi RIDA®COUNT 4-krat dražji kot klasične mikrobiološke metode. Miller (2009) predlaga, da pred uporabo alternativne metode, ki izpolnjuje zastavljene cilje, da razvijemo poslovni primer, ki vključuje uporabo finančnih modelov, s katerimi lahko primerjamo skupne stroške povezane z nakupom, usposabljanje in izvajanje ukrepov za obvladovanje tveganja med prehodom na alternativno metodo. Prvi cilj je ekonomska upravičenost nakupa alternativne metode. Klasične mikrobiološke preiskave so po navadi drage tudi zaradi veliko ročnega dela (Huss, 1994). V ceno stroškov potem ne moremo vključiti le cene gojišč in čas izvedbe, ki ga metodi zahtevata temveč tudi višji začetni strošek. Višji začetni strošek pri klasični mikrobiološki metodi predstavlja nakup večjega inkubatorja, magnetnega grelnega mešala in dodatno steklovino. Pokazali smo že, da je za izvedbo klasične mikrobiološke metode potrebno 14,6 % več časa kot testi RIDA®COUNT. Baylis (2011) je zapisal, da rezultat z uporabo hitre metode, lahko močno pospeši sproščanje izdelkov. To lahko upoštevamo kot prednost hitrih metod, ko upoštevamo stroške metode.

5.2 SKLEPI

- Klasične mikrobiološke metode in testi RIDA®COUNT so pokazali primerljive rezultate pri bakterijah vrst *E. coli* in *S. aureus* in pri skupnem številu mikroorganizmov.
- Izvedba mikrobiološke preiskave je s testi RIDA®COUNT hitrejša kot pri klasični mikrobiološki metodi.
- Testi RIDA®COUNT so manj zahtevni kot klasične mikrobiološke metode.
- Materialni stroški so višji pri testih RIDA®COUNT kot pri klasičnih mikrobioloških gojiščih.

6 POVZETEK

V današnjem času so pekovski izdelki velik del naše prehrane. Pekovski izdelki so postali tudi velik del prehrane v bolnišnicah, šolah in vrtcih. Mikroorganizmi imajo pomembno vlogo pri proizvodnji pekovskih izdelkov, vendar lahko povzročijo tudi kvar izdelkov, največkrat zaradi neprimerne rokovanja, neustrezne priprave, neustrezne hrambe ali transporta izdelkov od proizvodnje do potrošnika. Kvar živil povzroča gospodarsko škodo za proizvajalce in potrošnike.

Zagotavljanje varnosti živil je globalni izziv. S porastom svetovne oskrbe s hrano in številom prebivalstva je posledično v porastu tudi število mikrobioloških preiskav živil. Zaradi tega je pomembna izbira mikrobiološke metode, s katero bomo lahko hitro, učinkovito in kar se da poceni preiskovali vzorce živil.

Klasične mikrobiološke metode se uporabljajo v številnih laboratorijih, zlasti v državnih agencijah, ker so metode usklajene z zakonskimi predpisi. V zadnjih desetletjih se je povečalo zanimanje za razvoj hitrejših metod.

Cilj naše naloge je bil primerjati postopke in rezultate mikrobioloških preiskav dobljene s testi RIDA®COUNT in klasičnimi mikrobiološkimi metodami. Primerjali smo kvantitativne rezultate, čas potreben za izvedbo, zahtevnost posamezne mikrobiološke metode, ter potreben material in stroške posamezne mikrobiološke preiskave na naravno kontaminiranih vzorcih mini pekovskih izdelkov.

Poznamo različne alternativne metode, ki so pretežno usmerjene v zmanjševanje obremenitve dela, olajšano delo, zmanjševanje manipulacije vzorcev in skrajšan čas preiskave. Mnoge alternativne metode, ki so trenutno na trgu, so dokazano enakovredne klasičnim mikrobiološkim metodam (Ferrati in sod., 2005).

Rezultati naših eksperimentov so pokazali, da pri kvantitativnem določanju bakterij vrst *E. coli*, *S. aureus* in SŠMO obe metodi podata primerljive rezultate. Rezultati so bili različni le pri enterobakterijah, višje povprečno število bakterij smo dobili s klasično mikrobiološko metodo. Primerjava časa potrebnega za izvedbo mikrobiološke preiskave je pokazala, da s testi RIDA®COUNT prihranimo veliko časa, saj so gojišča že vnaprej

pripravljena. Medtem ko je pri klasičnih mikrobioloških preiskavah potrebna priprava gojišč, ki zajema tehtanje suhega gojišča, ustrezno razredčitev, mešanje in gretje, da se gojišče raztopi in homogenizira, avtoklaviranje, hlajenje gojišč na 45 °C, prelivanje v petrijeve plošče in hlajenje na 25 °C. Poleg same priprave klasičnih mikrobioloških gojišč se pri tej metodi podaljšuje čas izvedbe zaradi potrebnega razmaza vzorcev po gojiščih, kar pri testih RIDA@COUNT ni potrebno, saj prekrivna folija razmaže vzorec po gojišču. Zahtevnost mikrobiološke metode smo razdelili na posamezne elemente mikrobiološke preiskave. Priprava gojišč je glavni dejavnik, ki razlikuje mikrobiološki metodi glede zahtevnosti izvedbe mikrobiološke metode poleg načina nanosa vzorca na gojišče, odčitavanja rezultatov in potrebe glede materiala in aparatur. Saj je pri klasični mikrobiološki metodi postopek priprave gojišča dolgotrajen in zahteva izobražen kader za izvedbo. Testi RIDA@COUNT so že vnaprej pripravljena gojišča in poleg tega imajo prekrivno folijo, na kateri je odtisnjena centimetrska mreža, ki olajša štetje kolonij po končani inkubaciji. Medtem ko petrijeve plošče pri klasičnih mikrobioloških metodah nimajo števne mreže, ter zaradi različnih barv gojišč so lahko mikroorganizmi, ki rastejo na njih slabše vidni in posledično je štetje bolj zahtevno. Glede potreb materiala in aparatur so klasične mikrobiološke preiskave tudi bolj zahtevne kot testi RIDA@COUNT. Kot smo že pri času potrebnem za pripravo mikrobioloških gojišč našteali korake priprave mikrobioloških gojišč, so za to potrebne aparature, kot so tehtnica, grelni mešalnik, za raztapljanje in homogenizacijo klasičnih mikrobioloških gojišč, avtoklav, petrijeve plošče, steklena palčka za razmaz vzorca in večji inkubator, saj klasična mikrobiološka gojišča v petrijevih ploščah zavzamejo veliko več prostora kot testi RIDA@COUNT. Ocena stroškov materiala pa je pokazala, da so klasična mikrobiološka gojišča cenejša kot testi RIDA@COUNT. Vendar pri oceni stroškov posamezne mikrobiološke preiskave ne moremo upoštevati le stroškov materiala kot so cene posameznih mikrobioloških gojišč, temveč tudi začetne stroške in čas, ki je potreben za pridobitev rezultatov mikrobioloških preiskav. Tako ob upoštevanju vseh dejavnikov naše primerjave so naši rezultati pokazali, da so bili testi RIDA@COUNT za določanje SŠMO in bakterij vrst *E. coli* in *S. aureus* primerni za hitro, enostavno in stroškovno upravičeno mikrobiološko preiskavo.

7 VIRI

- AAP-American Academy of Pediatric. 2009. Enteric gram-negative rods (enterobacteriaceae). V: Red book. Pickering L.K., Baker D.W., Long K., Long S.S. (eds.). Elk Grove Village, American Academy of Pediatrics: 248 - 261
- Aaronson S. 1989. Enrichment culture. V: Practical handbook of microbiology. O'Leary M.W. (ed.). New York, CRC Press LLC: 337-348
- Adamič J., Smole-Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45
- Alonso N.L.X., Poveda S.J.A. 2008. Estudio comparativo en técnicas de rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3M™ para el análisis de alimentos. Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial: 192 str.
- Argudin M. C., Mendoza M. C., Rodicio M. R. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 7: 1751-1773
- Arulanantham R., Pathmananthan S., Ravimannan N., Niranjana K. 2012. Alternative culture media for bacterial growth using different formulation of protein sources. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2,6: 679-700
- Atlas R.M. 2006. Handbook of microbiological media for the examination of food. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press: 446 str.
- Baylis C., Uyttendaele M., Joosten H., Davies A. 2011. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. Bursel, ILSI Europe: 49 str.

- Brisse S., Grimont F., Grimont P. 2006. The genus *Klebsiella*. V: The Prokaryotes. 3rd ed. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 159-196
- Brooks G.F., Carroll K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A. 2013. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. 26th ed. New York, McGraw-Hill Companies: 818 str.
- Budzynski A.Z. 2001. Chromogenic substrates in coagulation and fibrinolytic assays. *Laboratory Medicine*, 32, 7: 365-368
- Bullerman L. B., Bianchini A. 2009. Cereals and cereal products. V: Production of microbiologically safe foods. Heredia N., Wesley I., Garcia S. (eds.). New York, John Wiley and Sons: 315-330
- CDC. 2013. Typhoid fever. Clifton Rd, Centers for Disease Control and Prevention: 4 str. www.cdc.gov (januar 2014)
- Cordier J.L., Nestec S.A. 2004. Microbiological criteria – purpose and limitations. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95, 1: 28-31
- Craven P.C., Mackel D.C., Baine W.B., Barker W.H., Gangarosa E.J. 1975. International outbreak of *Salmonella* eastbourne infection traced to contaminated chocolate. *Lancet*, 305, 7910: 788-792
- Dahms S. 2004. Microbiological sampling plans – Statistic aspects. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95 1: 32-44
- da Silva N., Taniwaki Hirotimi M., Junqueira C.V., da Silva do Nascimento M., Gomes Romeiro R.A. 2012. Microbiological examination methods of food and water: A laboratory manual. London, Taylor & Francis Group CRC Press: 484 str.

de Boer E., Beumer R.R. 1999. Methodology for typing and detection of food home microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-2: 119-130

Dugid J., Balkovic E., du Moulin G.C. 2011. Rapid microbiological methods: Where are they now? *American Pharmaceutical Review*, 14, 7: 8 str.
www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/37220-Rapid-Microbiological-Methods-Where-Are-They-Now/ (april 2012)

EPA. 2009. Method validation of U.S. Environmental Protection Agency. Microbiological method of analysis. Washington, United States Environmental Protection Agency: 20 str.
www.epa.gov (januar 2014)

Ellis P., Meldrum R. 2002. Comparison of the compact dry TC and 3M ACP dry sheet media methods with the spiral plate method for examination of randomly selected foods for obtaining aerobic colony counts. *Journal of Food Protection*, 22, 2: 423-425

FAO. 1991. Guidelines for slaughtering meat cutting and further processing. Rome, Food and Agriculture Organization: 170 str.
www.fao.org. (december 2013)

FAO. 2003. Assessment and management of seafood safety and quality. Rome, Food and Agriculture Organization: 230 str.
www.fao.org (januar 2014)

FAO. 2008. Guidance for industry. Validation of growth-based rapid microbiological methods for sterility testing of cellular and gene therapy products. Rome, Food and Agriculture Organization: 12 str.
www.fao.org (januar 2014)

- FDA. 2012. Bad bug book. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. 2nd ed. Lampel K.A., Al-Khalidi S., Cahill S.M. (eds.). New Hampshire, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration: 352 str.
www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm (januar 2013)
- FDA Philippines. 2013. FDA Circular No. 2013-010: Revised guidelines for the assessment of microbiological quality of processed foods. Muntinlupa City, Food and Drug Administration Philippines: 11 str.
www.fda.gov.ph (januar 2013)
- Ferrati A.R., Tavolaro P., Destro M.T., Landgraf M., Franco B.D.G.M. 2005. A comparison of ready-to-use systems for evaluating the microbiological quality of acidic fruit juices using non-pasteurized orange juice as an experimental model. *International Microbiology*, 8, 1: 49-53
- García-Armesto M.R., Prieto M., García-López M.L., Otero A., Moreno B. 1993. Modern microbiological methods for foods: Colony count and direct count methods. *Microbiologia*, 9, 1: 1-13
- Gibbons S. 2008. Phytochemicals for bacterial resistance-strength, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*, 74: 594-602
- Glynn B., Lahiff S., Wernecke M., Barry T., Smith T.J., Maher M. 2006. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 2: 126-139
- Gorris L.G.M. 2005. Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control*, 16, 9: 801-809
- Harrigan W.F. 1998. Laboratory methods in food microbiology. 3rd ed. London, Academic Press Limited: 532 str.

Harvey J., Gilmour A. 2000. *Staphylococcus: Staphylococcus aureus*. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 3. Robinson R., Batt C., Patel P. (eds.). London, Academic Press: 2066-2071

Hemaiswarya S., Doble M., Kumar Kruthiventi A. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15: 639-652

Houghtby G.A., Maturin L.J., Koenig E.K. 1992. Microbiological count methods. V: Standard methods for examination of dairy products. 16th ed. Marshall R.T (ed.). Washington, American Public Health Association: 213-216

Huss H.H. 1994. Assurance of seafood quality. Technical Paper. No. 334., Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 169 str.

ICMSF-International Commission on Microbiological Specification for Foods. 1996. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 513 str.

ISO 13843. Water quality – Guidance on validation of microbiological methods. 2000: 47 str.

ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. 2003: 74 str.

Jasson V., Jacxsens L., Luning P., Rajkovic A., Uyttendaele M. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology Journal*, 27, 6: 710-730

Jay M.J., Loessner M.J., Golden D.A. 2005. Modern food microbiology. 7th ed. New York, Springer: 790 str.

- Jeršek B. 2003. Higiena živi. Laboratorijske vaje za predmet higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Jeršek B. 2004. Metodologija odkrivanja mikrobiološke kontaminacije živil. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99-108.
- Jeršek B. 2008. Navodila in delovni zvezek za vaje pri predmetu Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 44 str.
- Kapun-Dolinar A. 2001. Mikrobiologija. Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 104-198
- Koch A.C. 1994. Growth measurement. V: Methods for general and molecular bacteriology. Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., Krieg N.R. (eds.). Washington, ASM Press: 254-257
- Klun N., Šedlbauer M. 2004. Mikrobiološka kakovost živil in standardi. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor. P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 27-35
- Lakmini N.K.A., Madhujith T. 2012. Comparison of performance of rapid Petrifilm test method and standard test method for enumeration of aerobic microorganisms, coliforms and *E.coli* in food. Tropical Agricultural Research, 23, 4: 363-369
- López-Campos G., Martínez-Suárez J.V., Aguado-Urda M., López-Alonso V. 2012. detection, identification, and analysis of foodborne pathogens. V: Microarray detection and characterization of bacterial foodborne pathogens. London, Springer: 126 str.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Pearson Education, Inc: 1019 str.

- Martin S.E., Iandolo J.J. 2000. *Staphylococcus*: Introduction. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 3. Robinson R., Batt C., Patel P. (eds.). London, Academic Press: 2062-2065
- Mihovec P. 2006. Ugotavljanje mikrobiološke kakovosti surovega mleka s standardnimi metodami in postopkom Rida®Count. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 43 str.
- Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije povzročene z živili živalskega izvora. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Možina Smole S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117-40
- Miller M.J. 2009. Breaking the rapid microbiological method financial barrier: A case study in return on investment and economic justification. BioPharm International: 6 str.
www.license.icopyright.net/3.7443?icx_id=624451 (april 2012)
- Miller M.J. 2010. Developing a validation strategy for rapid microbiological methods. American Pharmaceutical Review, 13, 3: 6 str.
www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/36926-Developing-a-Validation-Strategy-for-Rapid-Microbiological-Methods/ (maj 2013)
- Nahberger Marčič V. 2008. Živilska mikrobiologija in biotehnologija. 1.del: Živilska mikrobiologija. Ljubljana, Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije: 49 str.
- Nester E.W., Anderson, D.G., Roberts, C.E., Nester M.T. 2009. Microbiology: A human perspective. 6th ed. New York, McGraw-Hill Companies: 884 str.

Pandey A., Joshi V.K., Poonam N., Soccol C.R. 2000. Enterobacteriaceae, coli-form and *E.coli*. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 1. Robinson R., Batt C., Patel P. (eds.). London, Academic Press: 604-610

Paterson D.L. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. American Journal of Infection Control 34,5, suppl.1: S20-S28

Pelczar M.J.Jr., Chan E.C.S., Krieg N.R. 2010. Microbiology: Application based approach. New Delhi, Tata McGraw Hill: 959 str.

Pokorn J. 1990. Mikrobiologija v živilskih procesih. 1. izdaja. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo: 120 str.

Pravilnik o kakovosti pekovskih izdelkov. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 45: 4965-5033

Pierce K.D. 2012. Rapid microbiological test and reagents. Medical Laboratory Observer, 44, 7: 64-66

Ray B., Bhunia A. 2008. Fundamental food microbiology. 4th ed. New York, Taylor & Francis Group LLC: 492 str.

R-Biopharm. 2012. RIDA@COUNT-testne ploščice, ki štejejo za vas. Katalog proizvodov, Murska Sobota, VIA d.o.o.: 28 str.
www.viams.net/pdf/RCbrosura.pdf (marec 2012)

Rybal S., Kristufek V., Titera D. 2012. The use of RIDA@COUNT for monitoring the American fowlbrood pathogen. Open Journal of Veterinary Medicine, 2, 4: 233-236

Saranraj P., Geetha M. 2011. Microbial spoilage of bakery products and its control by preservatives. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 3, 1: 38-48

SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute INC.: software

Salo S., Ehavald H., Raaska L., Vokk R., Wirtanen G., 2006. Microbial surveys in Estonian dairies. *LWT – Food Science and Technology*, 39, 5: 460-471

Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjena končnemu potrošniku. 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 38 str.
www.zzv-ms.si/si/varnost-zivila/documents/SMERNICEZAMIKROBIOLOSKOVARNOSTZIVILKISONAMENJENAKONCNEMUPOTROŠNIKU.pdf (februar 2012)

Smittle R.B., Okrend A J. 2001. Laboratory quality assurance. V: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Downes F. P., Ito K. (eds.). Washington, American Public Health Association: 1-10

Sridhar R.P.N. 2004. My microbiology notes: Bacterial culture media. Davangere, J.J.M Medical College, Department of Microbiology: 6 str.
www.microrao.com/micronotes/culture_media.pdf (oktober 2013)

Stannard C. 1997. Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology*, 11, 3: 137-176

Tavakoli H., Bayat M., Kousha A., Panahi P. 2008. The application of chromogenic culture media for rapid detection of food and water borne pathogen. *American-Euroasian Journal of Agriculture & Environment Science*, 4, 6: 693-698

Uredba Evropske komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15 november 2005 o mikrobioloških merilih za živila. 2005. Uradni list Evropske Unije, 18, L338: 1-26

Vasallo A.M., Reyes D.G., Villoch A. 2013. Performace assessment of the RIDA COUNT method for the enumeration of bacteria in milk. *Revista de Salud Animal*, 35, 1: 64-68

ZZV. 2004. Katalog preiskav za mesno – predelovalno industrijo. Novo Mesto, Zavod za zdravstveno varstvo Novo Mesto: 70 str.

www.zzv-nm.si (avgust 2012)

ZZV. 2013. Salmonela (*Salmonella*) v živilih. Murska Sobota, Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota: 5 str.

www.zzv-ms.si (januar 2014)

WHO. 2013. *Salmonella* (non-typhoidal). Fact sheet N°139. Geneva, World Health Organization: 1 str.

www.who.int/en/ (april 2013)

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici izr. prof. dr. Barbari Jeršek za pomoč, strokovne nasvete, pregled in popravke diplomskega dela.

Izr. prof. dr. Lei Demšar se zahvaljujem za hiter, strokoven in natančen pregled diplomske naloge, ki ga je opravila v vlogi recenzenta.

Pekarni Pečjak d.o.o. za uspešno sodelovanje med eksperimentalnim delom naloge, za uporabo laboratorija in vsega potrebnega materiala.

Zahvalila bi se tudi dr. Sebastjanu Filipu za pomoč in strokovne nasvete med eksperimentalnim delom v laboratoriju in Pekarni Pečjak d.o.o.

Posebna zahvala je namenjena družini in prijateljem, še posebej sestri Barbari in možu Marku, za spodbudo, podporo in pomoč v času študija.

Ter hvala vsem, ki jih nisem naštela, pa so mi vseeno pomagali tako ali drugače.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca GOSTEČNIK

**PRIMERJAVA KLASIČNIH IN ALTERNATIVNIH
MIKROBIOLOŠKIH PREISKAV MINI PEKOVSKIH
IZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014