

Ispitivanje mikrobiološke čistoće dijelova ambalaže nekih konzumnih pića

Šprem, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:471924>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



image not found or type unknown

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Antonela Šprem

**ISPITIVANJE MIKROBIOLOŠKE ČISTOĆE DIJELOVA
AMBALAŽE NEKIH KONZUMNIH PIĆA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za mikrobiologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Opća mikrobiologija
Tema rada Je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća
Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 27.05.2014.
Mentor: Dr. sc. Lidija Lenart, docent
Pomoć pri izradi: Ana Škorvaga, tehnički suradnik

ISPITIVANJE MIKROBIOLOŠKE ČISTOĆE DIJELOVA AMBALAŽE NEKIH KONZUMNIH PIĆA *Antonela Šprem, 207-DI*

Sažetak: U ovom radu, ispitana je mikrobiološka populacija dijelova ambalaže nekih konzumnih pića koji dolaze u dodir sa ustima prilikom konzumacije. Analiziran je 51 uzorak iz pet različitih trgovačkih centara u Osijeku. Svrha ovog rada je bila odrediti broj i/ili prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, plijesni, kvasaca, bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* te bakterije vrste *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* glede mogućnosti zaraze na taj način. U analiziranim uzorcima je utvrđena najveća prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija (do 1×10^3 po cm^2) i plijesni (do $4,7 \times 10^2$ po cm^2). Bakterije porodice *Enterobacteriaceae*, i bakterija vrste *Escherichia coli* su bile manje zastupljene. Nije utvrđena prisutnost kvasaca niti bakterije vrste *Staphylococcus aureus*.

Ključne riječi: ambalaža, mikrobiološka ispravnost, bakterije, gljive

Rad sadrži: 48 stranica
31 slika
5 tablica
- priloga
48 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---|---------------|
| 1. red. prof.dr. sc. <i>Mirjana Sabo</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Lidija Lenart</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek</i> | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Vinko Krstanović</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 16. rujna 2014.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food and Nutrition Research
Subdepartment of Mikrobiology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: General Mikrobiology
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. VIII. held on May 27, 2014.
Mentor: *Dr. sc. Lidija Lenart*, docent
Technical assistance: *Ana Škorvaga*, technical associate

EXAMINATION OF MICROBIAL PURITY OF CERTAIN BEVERAGES PACKAGING PARTS

Antonela Šprem, 207-DI

Summary: In this work, microbial population of certain beverages packaging parts that gets in touch with the mouth during consumption, were assessed. Total number of 51 samples collected from five supermarkets in Osijek were analysed. The main purpose of this research was to evaluate number and/or presence of aerobic mesophilic bacteria, molds, yeasts, bacteria of *Enterobacteriaceae* family, and specie of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* concerning ability of infection. Highest contamination of analysed samples were observed by aerobic, mesophilic bacteria ($1 \times 10^3/\text{cm}^2$), and fungi ($4,7 \times 10^2/\text{cm}^2$). *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* were present in lower counts. The presence of yeasts and *Staphylococcus aureus* were not observed in analysed samples.

Key words: package, microbial safety, bacteria, fungi

Thesis contains: 48 pages
31 figures
5 tables
- supplements
48 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Mirjana Sabo</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Lidija Lenart</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Lidija Jakobek</i> , PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Vinko Krstanović</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: September 16, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Lidiji Lenart i teh. suradnici Ani Škorvaga, na strpljenju, pomoći i trudu uloženom pri izradi ovog diplomskog rada, kao i na vrlo ugodnoj suradnji.

Hvala svim djelatnicima Prehrambeno - tehnološkog fakulteta Osijek koji su mi svojim radom pomogli u stjecanju znanja, te na mnogobrojnim savjetima za daljnje učenje.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su me nasmijavali i učinili vrijeme provedeno na fakultetu lakšim i zabavnim.

Hvala Matiji što je bio uz mene te za iskazanu podršku tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Najveće hvala mami Ljubici, tati Damiru i bratu Stjepanu, cijeloj svojoj obitelji za omogućavanje studiranja, na svim savjetima koji su pomogli da izgradim svoj karakter, za pružanje beskrajne podrške i ljubavi tijekom cijelog školovanja.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. MIKROBIOLOGIJA POVRŠINE AMBALAŽE	4
2.1.1. Limena ambalaža konzumnih pića.....	5
2.2. BAKTERIJE NA AMBALAŽI	6
2.2.1. Aerobne, mezofilne bakterije.....	6
2.2.2. Bakterije vrste <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.2.3. Bakterije iz porodice <i>Enterobacteriaceae</i>	8
2.2.4. Bakterije vrste <i>Escherichia coli</i>	9
2.3. GLJIVE	10
2.3.1. Opće osobine plijesni	10
2.3.2. Značenje plijesni.....	12
2.3.3. Pojedine vrste plijesni.....	15
2.3.4. Kvasci	23
3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. ZADATAK	27
3.2. MATERIJAL I METODE	27
3.2.1. Materijal	27
3.2.2. Metode.....	29
3.3. OBRADA REZULTATA	30
4. REZULTATI	31
4.1. REZULTATI ISPITIVANJA ONEČIŠĆENJA AMBALAŽNOG MATERIJALA	32
4.2. ZASTUPLJENOST PLIJESNI PO RODOVIMA	37
5. RASPRAVA	40
5.1. MIKROBIOLOŠKA POPULACIJA ANALIZIRANIH DIJELOVA AMBALAŽE	41

6. ZAKLJUČCI.....	43
7. LITERATURA	45

Popis oznaka, kratica i simbola

Al	aluminij
Al ₂ O ₃	aluminij(III)-oksid
a _w	aktivitet vode
CFU	colony forming unit (broj živih stanica koje formiraju kolonije)

1. UVOD

Konzumna pića sadržavaju na površini ambalaže određeni broj mikroorganizama. Mikroorganizmi dospjevaju na ambalažu tijekom transporta, skladištenja ili u samom trgovačkom centru za vrijeme čuvanja u hladnjacima ili na policama.

Cilj ovoga rada bio je utvrditi stupanj onečišćenja dijelova ambalaže bakterijama, kvascima i plijesnima, kako bi se utvrdila moguća opasnost pri konzumaciji takvih pića za zdravlje ljudi, jer potrošači rijetko obrišu površinu ambalaže prije konzumacije pića u limenkama.

Kontrola mikrobiološke čistoće provodi se sukladno Zakonu o zaštiti pučanstva od zaraznih bolesti (NN 79/07; NN 113/08; NN 43/09), a u svrhu provjere djelotvornosti i učestalosti čišćenja, pranja i dezinfekcije u objektima u kojima se namirnice proizvode, poslužuju i stavljaju u promet. Normativ mikrobiološke čistoće, prema navedenom pravilniku jest normativ kojim se propisuje granica prihvatljivosti uzorka obzirom na prisutnost, vrstu i broj mikroorganizama. Prema navedenom Pravilniku normativi mikrobiološke čistoće uključuju: aerobne mezofilne bakterije i *Enterobacteriaceae*. Metode određivanja mikrobiološke čistoće koje se primjenjuju su u skladu s međunarodnom normom ISO 18593. Radi se metodom otiska ili metodom brisa.

Metodama određivanja mikrobiološke čistoće podrazumijevaju se postupci uzimanja uzoraka brisa, otiska ili ispirka za određivanje broja i vrste bakterija na površinama postrojenja, opreme, uređaja, pribora, prijevoznih sredstava i ruku osoba koje u tijeku proizvodnje i prometa dolaze u dodir sa hranom i predmetima opće uporabe u čistom stanju pripremljenim za uporabu ili za početak rada. Metode se provode u skladu s međunarodnom normom ISO 18593 ili odgovarajućom hrvatskom normom kao referentnom metodom.

Uzorak je prihvatljive mikrobiološke čistoće i ako sadrži do 50% veći broj aerobnih mezofilnih bakterija (cfu/mL) navedenih u Prilogu I. ovoga Pravilnika uz uvjet da ne sadrži patogene bakterije.

Mikrobiološka čistoća objekta je zadovoljavajuća kada je < 25% ispitanih uzoraka neprihvatljive mikrobiološke čistoće. Mikrobiološka čistoća objekta je nezadovoljavajuća kada je 25% i više ispitanih uzoraka neprihvatljive mikrobiološke čistoće (Narodne novine, 79/07, 113/08 i 43/09.).

Boce ili ambalaža za tekućine cfu*/mL smije imati aerobnih mezofilnih bakterija i *Enterobacteriaceae* u količini od 0-1. Tanjuri, zdjelice, pribor za jelo i manje posuđe; posuđe i pribor koje dolazi u kontakt s hranom smije imati $\leq 1 \times 10^2$ po cm² aerobnih mezofilnih bakterija i *Enterobacteriaceae* u količini od 0-1.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROBIOLOGIJA POVRŠINE AMBALAŽE

Rezultati mikrobioloških ispitivanja ovise o načinu uzimanja, pripreme, pohranjivanja, prijevoza, dopreme i ispitivanja uzoraka. Rezultati mikrobioloških ispitivanja ovise o načinu uzimanja uzoraka, uvjetima i trajanju transporta do laboratorija, kao i postupaka s uzorcima u samom laboratoriju (Duraković 2001.).

U svrhu osiguranja preciznosti ispitivanja, ukoliko se izričito zahtjeva treba omogućiti praćenje temperature za vrijeme prijevoza uzoraka. Naime, osim sterilnog rada pri uzimanju uzoraka, na mikrobiološki status namirnice najviše mogu utjecati temperaturni uvjeti u transportu uzoraka do laboratorija (Mioković i sur, 2004.).

Temperatura ima izravan utjecaj na rast mikroorganizama, jer je brzina biokemijskih reakcija koja uključuje mikrobni metabolizam povezana s povećanjem ili smanjivanjem temperature. Zbog toga, optimalni razvoj određenih mikroorganizama događa se blizu optimalne temperature na kojoj mikroorganizam raste. Ako se temperatura smanjuje, rast je usporen i prestaje kada je temperatura ispod granice minimalne temperature rasta (Sperber i Doyle, 2009.).

Uzimanje uzoraka za mikrobiološko ispitivanje pri službenoj kontroli se provodi u svrhu verifikacije poštivanja mikrobioloških kriterija propisanih Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu, provjere mikrobiološke ispravnosti hrane, ocjene učinkovitosti sustava samokontrole ali i sukladnosti serije proizvoda u odnosu na važeće propise o hrani. Službene kontrole naročito se pažljivo provode u slučaju trovanja ili u sudske svrhe, te radi identifikacije ili dobivanja podataka o novim mikrobiološkim opasnostima u svrhu procjene rizika (Anonim, 2008.).

Na površini tijela čovjeka, životinja, biljaka i drugih predmeta koji nas okružuju, mnoge vrste mikroorganizama su redovni stanovnici. Njihovo prisustvo se bilježi svuda osim u zatvorenim biološkim sistemima kao što su krvotok i fiziološki aktivna tkiva životinja i biljaka. Također ih nema u dubokim slojevima zemlje i užarenoj vulkanskoj lavi.

Bakterije su glavni uzrok bolesti trovanja hranom na većinu ljudi . To je zato što se nalaze u količini od milijardu bakterija na bilo kojoj površini . Naravno , koliko dugo žive ovisi o samoj površini. Različite površine mogu dopustiti bakterijama da žive od samo nekoliko sati do nekoliko dana, ili čak mjeseci.

Sirovine i proizvodi prehrambene industrije su za vrijeme prerade u stalnom kontaktu sa opremom, instrumentima, ambalažom i zrakom koji ih mogu kontaminirati. Zato je neophodno izvršiti mikrobiološku kontrolu ovih elemenata. Izučavanje vrste zagađivača i

porijeklo kontaminacije je preporučljivo da bismo primijenili efikasnu metodu dezinfekcije i ustanovili učestalost primjene sredstava za dezinfekciju (Brčina, 2013.).

2.1.1. Limena ambalaža konzumnih pića

Ambalažu čine posude različitog oblika (načinjene od različitih materijala, u kojima se roba drži tijekom transporta) i tanji fleksibilni materijali koji su izrezani na odgovarajuće dimenzije i eventualno grafički obrađeni a služe za zamatanje roba. Ambalaža prati robu od proizvodnje, tijekom transporta, skladištenja, prodaje, do uporabe. Podjela ambalaže prema ambalažnom materijalu: papirna i kartonska, metalna, staklena, drvena, tekstilna, ambalaža od polimernih materijala, te ambalaža od višeslojnih materijala (laminat) (Vukovi i sur., 2007.).

Svojstva namirnice moguće je očuvati jedino pakiranjem. O kvaliteti ambalaže ovisi i kvaliteta proizvoda, a kvaliteta je odgovorna za uspjeh na tržištu. U SAD-u 1817. god. počela proizvodnja metalnih kutija-limenki namijenjenih pakiranju namirnica konzerviranih toplinom (Jakobek, 2014.).

Više od jednog stoljeća limenka služi kao ambalažni materijal koji osigurava dobro čuvanje, ali i pohranjivanje viška proizvoda uz jednostavnu uporabu. Kao i svaki materijal koji dolazi u neposredan dodir s namirnicom, zahtjeva pozornost zbog mogućih štetnih tvari koje iz materijala mogu migrirati u proizvod. Limenke u kojima se čuva hrana, razvijale su se tijekom desetljeća sukladno razvoju znanosti. Tako će ostati i u budućnosti sve do trenutka dok drugi, lakši, manje skupi materijali zamjene postojeće. Bez obzira na to, može se s pravom reći da limenke imaju slavnu prošlost koja je uvijek bila neposredno vezana za dobrobit čovjeka (Katalenić, 2004.).

Metalni ambalažni materijali su: kromirani lim, čelični lim presvučen Al, i aluminij. Zahvaljujući mnogim dobrim svojstvima, aluminij i njegove legure našle su primjenu u mnogim područjima. 1902. godine je dobivena prva Al folija, 1909. g. prva Al bačva, 1920. g. prve Al tube, >1945. g. Al limenke. Aluminij, poslije O₂ i Si, je najrašireniji element u Zemljinoj kori (sastavni dio gline i mnogih stijena). Aluminijski spojevi su rasprostranjeni, dostupni su, te se Al može izdvojiti iz njih. Komercijalno se koriste samo boksiti (visok postotak Al-najmanje 50 % aluminijevog (III) - oksida (Al₂O₃)). Al se dobiva iz boksita žarenjem, pri čemu se dobiva glinica (Al₂O₃ čisti), koja se rastali i iz nje se elektrolitski dobiva Al. Fizikalna svojstva Al: lagan ($\rho=2,7 \text{ g/cm}^{-3}$) (važno pri transportu), velika mehanička otpornost, metalni sjaj, bijele boje s slabim plavkastim odsjajem daje privlačan izgled ambalaži, dobra svojstva prerade (prave se limenke, folije, lim), može se bojati ili se podaci o proizvodu nanose, dobar vodič topline (bitno kod sterilizacije i pasterizacije), nepropustan je za plinove, svjetlost, paru (pakiranje higroskopičnih, aromatičnih proizvoda). Kemijska svojstva: podložan koroziji jer se

Iako oksidira pri čemu na površini nastaje zaštitni sloj aluminij-oksida ili hidratiziranog oksida ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) (samooksidacija). Sloj oksida sprečava oksidaciju dubljih slojeva Al, ne otapa se u vodi, a otporan je prema svim otopinama u području pH-vrijednosti 4,5-8,5, štiti aluminij od korozije. Al otapaju jače kiseline i lužine. Zaštita aluminijske površine od korozije provodi se eloksiranjem te lakiranjem. Eloksiranje (anodna oksidacija aluminijske površine) - umjetno se izaziva korozijom, stvara se porozni film, u pore se unose inhibitori korozije, a vrućom parom se zatvore pore. Lakiranje se provodi tako da se Al presvlači slojem laka, time se zatvore pore. Upotrebljava se zlatnožuti lak koji se sastoji od epoksi-fenolnih smola. Mehanička svojstva: mekan, žilav, relativno male čvrstoće i tvrdoće. Tehnološka svojstva: Al i njegove legure u rastaljenom su stanju vrlo žitke pa dobro ispunjavaju kalupe.

Valjanjem, prešanjem, izvlačenjem-dobivanje limova različite debljine, traka, folija, a iz lima se rade limenke (debljina lima 0,3-0,4 mm). Fiziološka svojstva: ne mijenja okus, boju i miris namirnica.

Limenke i poklopci se steriliziraju parom (toplinom). Metalna ambalaža (limenke) su uglavnom od Al-dvodijelne limenke. Tijekom skladištenja piva u Al limenke dolazi do relativno slabog otapanja Al sa stijenke limenke (prelazak metalnih iona) (Jakobek, 2014.).

2.2. BAKTERIJE NA AMBALAŽI

Normativi mikrobiološke čistoće ambalaže uključuju: aerobne mezofilne bakterije i bakterije porodice *Enterobacteriaceae*.

2.2.1. Aerobne mezofilne bakterije

Riječ "aerobne" znači da bakterije rastu u prisustvu zraka, a "mezofilne" da im je optimalna temperatura za razvoj od 20 do 45 °C. One se inače nalaze u zraku, vodi, ljudskom organizmu. Većini ovih bakterija je optimalna temperatura 37 °C (čovjekova tjelesna temperatura), što znači da skupini aerobnih mezofilnih bakterija pripada većina patogenih bakterija. Povećan broj aerobnih mezofilnih bakterija u hrani indikator je starosti i lošije mikrobiološke kakvoće (kontaminacije i/ili početka kvarenja). Kod mikrobioloških briseva broj aerobnih mezofilnih bakterija predstavlja količinu bakterija koje se nalaze na površinama, rukama i priboru, koja ako je povećana ukazuje na nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju (Hukić, 2005.).

2.2.2. Bakterije vrste *Staphylococcus aureus*

U rodu *Staphylococcus* identificirane su 23 vrste. Samo *Staphylococcus aureus* posjeduje enzim koagulazu i naziva se koagulaza pozitivni *Staphylococcus*, dok se svi ostali nazivaju grupno koagulaza negativni *Staphylococcus* i označava se kao KNS (Hukić, 2005.).

Staphylococcus aureus formiraju karakteristične kolonije na površini selektivne podloge oblika koka u grozdovima. Gram su + pozitivne bakterije, nepokretne, ne proizvode spore, a ponekad proizvode kapsule.

Fakultativno je anaerobna bakterija. Bolje raste u uvjetima povećanog parcijalnog tlaka CO² (5-10 %). Optimalna temperatura rasta je 35 °C, a optimalni pH je 7,4. Raste dobro na jednostavnim hranjivim podlogama koje sadrže 7-10 % NaCl (slani bujon). Ova karakteristika se koristi u diferencijaciji i izolaciji *Staphylococcus* iz materijala koji sadrži više vrsta bakterija. Kolonije su obično neprozirne, okrugle, glatke, uzdignute. Mogu biti pigmentirane, tako da se razlikuju zlatno-žute, svijetlo žute (boje krema) i bijele. Na krvnom agaru se oko kolonije stvara uža ili šira zona β-hemolize. Samo mali postotak sojeva je nehemolitičan.

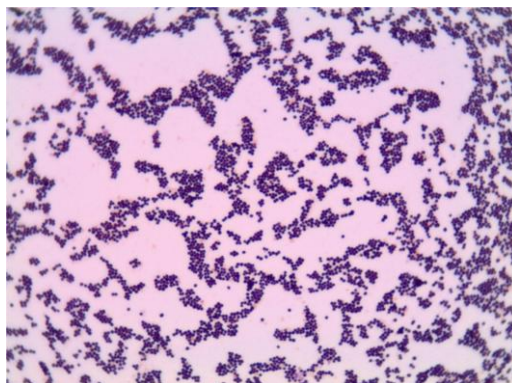
Ukoliko je *Staphylococcus aureus* prisutan u nekoj prehrambenoj namirnici moguće je da potječe iz kože, usta ili nosa osobe koja je radila sa hranom. Njeno prisustvo ili prisustvo njenih termostabilnih toksičnih supstanci u prehrambenoj namirnici je znak nedovoljne higijene. Neke izolirane vrste su enterotoksične i samim tim predstavljaju veliki rizik za zdravlje (Brčina, 2013.).

Prirodno stanište joj je koža i sluzokoža toplokrvnih životinja. Kod čovjeka je pronađena u nosnoj sluznici, čak u 20% do 50% populacije. Također se može izolirati iz fecesa, a pronađena je i skoro svugdje u prirodnom okolišu, zemlji, prašini, vodi i zraku (Adams i Moss, 2008.).



Slika 1 Bakterija vrste *Staphylococcus aureus* na Baird Parker agaru

(http://foodmicrobiologee.blogspot.com/2012_08_01_archive.html, 2014.)



Slika 2 Mikroskopska slika bakterije vrste *Staphylococcus aureus*

(http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html, 2014.)

2.2.3. Bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*

Bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* čine gram - negativni, uglavnom pokretni štapići koji ne stvaraju spore, a u odnosu na kisik oni su fakultativni anaerobi. Porodica obuhvaća veliki broj (oko 100) srodnih vrsta bakterija, koje su razvrstane u 22 roda. Svega oko 25 vrsta, međutim, mogu uzrokovati bolest u čovjeka. Među njima su najvažnije *Salmonella* i *Shigella*, koji su glavni uzročnici akutnog proljeva širom svijeta. Ostale vrste predstavljaju uglavnom oportunističke patogene bakterije, koje uzrokuju različite bolesti izvan probavnog sustava ili u osoba oslabljenog imuniteta. Pripadnici ove vrste naročito su značajni kao uzročnici bolničkih infekcija. U čovjeka enterobakterije čine oko 5% ukupne normalne crijevne flore.

Enterobakterije dobro rastu na različitim jednostavnim te na selektivnim i diferencijalnim podlogama. Kolonije su velike, sjajne i glatke površine i obično glatkih rubova. Boja kolonija na običnim je hranjivim podlogama sivkasta, a na selektivnim i diferencijalnim ovisi o podlozi i indikatoru, te biokemijskoj aktivnosti pojedine vrste (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* ili crijevne bakterije su normalna mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja. Obitelj *Enterobacteriaceae* obuhvaća rodove; *Salmonella* (patogen), *Escherichia* (potencijalni patogen), *Shigella* (patogen), *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Edwardsiella* i *Erwinia*. Prisutnost enterobakterija u namirnicama indikator je fekalnog zagađenja, tj. nedovoljne higijene tijekom proizvodnje, čuvanja i rukovanja sa namirnicama. Namirnice u kojima se ustanovi prisutnost enterobakterija smatraju se zdravstveno neispravnima. Izolirane mikrobiološkim brisevima sa površina, ruku osoblja i pribora ukazuju na fekalno zagađenje i nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju (Brčina, 2013.).

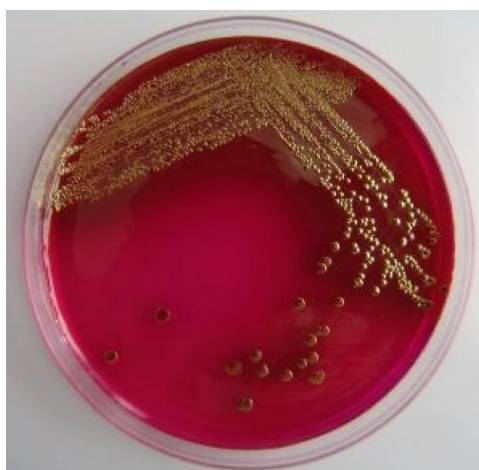
2.2.4. Bakterije vrste *Escherichia coli*

Bakterija vrste *Escherichia coli* je raširena u prirodi, u zemlji, u vodi, u probavnom traktu ljudi i životinja, odakle u okoliš dolazi preko fekalija. U crijevima imaju značajnu ulogu u probavi, vršeći razlaganje ugljikohidrata i bjelančevina. Proizvodi neke vitamine iz grupe B (B12) i K vitamin i tvari koje antagonistički djeluju na druge bakterije. Njihovo prisustvo u prehrambenim namirnicama ili vodi za piće ocjenjuje se kao znak loših higijenskih uvjeta u proizvodnji i mogućnosti fekalnog zagađenja.

Bakterija vrste *E. coli* je gram - negativan, kratak štapić, pojedinačan, u parovima ili nepravilnim grupama. Posjeduje flagele peritrihijalno raspoređene, što im omogućava intenzivno kretanje. Pojedini sojevi posjeduju kapsule. Ne formiraju spore.

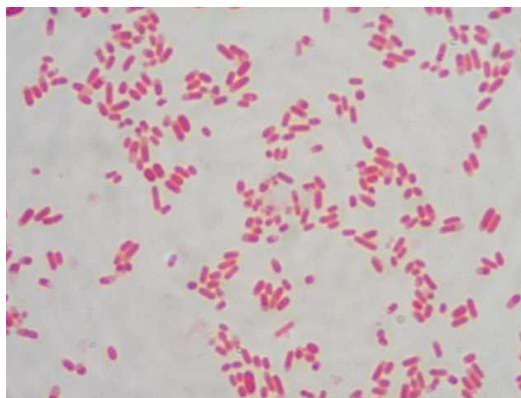
Razmnožavaju se dobro na mnogim hranjivim podlogama. Izrasle kolonije na Endo agaru posjeduju karakterističan metalan sjaj. Dobro raste i na MacConkey agaru, Krvnom agaru, na temperaturi od 20-40°C.

Escherichia coli je fakultativno anaerobna bakterija koja proizvodi brojne enzime. Pomoću enzima intenzivno vrše razlaganje ugljikohidrata, škroba i bjelančevina (Brčina, 2013.).



Slika 3 Bakterija vrste *Escherichia coli* na Endo agaru

(<http://www.freeimages.com/photo/1018465>, 2014.)



Slika 4 Mikroskopska slika bakterije vrste *Escherichia coli*

(<http://sfappeal.com/2013/11/local-food-distributor-might-be-behind-e-coli-outbreak-at-trader-joes/>, 2014.)

Bakterije vrste *E.coli* su vrlo otporne i mogu mjesecima živjeti u vodi, zemljištu i na površini mnogih predmeta. Dugo mogu živjeti u raznim vrstama prehrambenih namirnica gdje se mogu razmnožavati. Povišena temperatura ih uništava. Uništavaju se na temperaturi od 60°C za 15 minuta. Osjetljive su na neke boje i kemijska sredstva (Brčina, 2013.).

U okoliš dolazi putem fecesa i može kontaminirati vodu, zemlju, voće i povrće u kojima se može pronaći čak i unutar tkivnih stanica (Bhunja, 2008.).

Bakterija vrste *E. coli* je uvjetno patogena bakterija (oportunistička). Korisna je za domaćina jer djeluje antagonistički na razne patogene i proteolitičke bakterije. Ako dospije u druge organe izvan probavnog trakta ili preko kontaminirane hrane i vode (fekalno-oralni put), može uzrokovati različite infekcije: sepsa, meningitis kod beba, infekcije urinalnog trakta i dr. jer proizvodi više vrsta toksina. Uzrokuje entrokolitis: dijarejno oboljenje, koje može biti i smrtonosno, naročito kod male djece i mladih životinja (Brčina, 2013.).

2.3. GLJIVE

Gljive pripadaju grupi eukarotskih mikroorganizama, koja sadrži oko 250 000 vrsta. Mogu biti jednostanične i višestanične. One su heterotrofni organizmi. Razmnožavaju se vegetativno stvaranjem spora ili pupanjem, a neke i diobom. Nepokretne su, a oblik im je jajast ili u obliku niti. Gljive mogu tvoriti spolne i nespodne spore. Većina gljiva su saprofiti, ali ima i patogenih vrsta. Gljive ili fungi dijele se u tri empirijske grupe: kvasci, plijesni i pečurke (Duraković, 1996.).

2.3.1. Opće osobine plijesni

Plijesni su velika skupina gljiva, kod kojih je tijelo građeno od gustog sustava cjevastih stanica bez klorofila (Duraković, 1996.).

Zato što ne sadrže klorofil, plijesni su heterotrofi, uglavnom aerobi (Pinter, 2010.). Nitaste su građe, a niti (hife) se isprepliću i tvore micelij. Splet micelija čini talus ili tijelo plijesni. Micelij se, kao prašnjava ili paučinasta (pahuljasta) prevlaka, rasprostire po podlozi. Plijesni se klasificiraju i identificiraju kao separirane (pregrađene) i neseperirane. Separirane hife su poprečno pregrađene nitima zvanim septa, kroz čije pore struji citoplazma i stanične organele. Kod neseperiranih hifa pregrade ne postoje (Duraković, 1996.).

Kod uzgoja u submerznoj kulturi dolazi do rasta hifa koje tvore različite morfološke oblike koji mogu varirati od disperznih micelijskih filamenata do čvrsto isprepletenih micelijskih tvorevina peleta (Janeš, 2009.).

Plijesni su vrlo rasprostranjeni mikroorganizmi. Najviše naseljavaju vlažno tlo i biljke, odakle dospijevaju na plodove voća i povrća, ratarskih kultura, a tako i u namirnice. Plijesni rastu na kruhu, voću, siru, na vlažnome tekstilu, koži, bojama, drvetu, papiru i dr. Iako se plijesni mogu upotrijebiti u raznim granama industrije, u medicini i dr., neke mogu ugroziti zdravlje ljudi i životinja (Duraković, 1996.).

Prozvede mnoštvo različitih enzima tako što koriste ugljik iz supstrata te enzimima razgrađuju molekule supstrata u manje molekule koje stanica tada može apsorbirati. Mogu se nastaniti (kolonizirati) i rasti na različitim tipovima hrane. Postoje četiri kritična uvijeta za rast plijesni: dostupnost spora plijesni, dostupnost hrane, odgovarajuća temperatura i udio vlage. Uklanjanje bilo kojeg od navedenog, spriječit će rast plijesni. Većina plijesni raste pri sobnim temperaturama (Nujić, 2011.).

Mogu se klasificirati kao plijesni sa polja, plijesni u skladištima i plijesni uznapredovalog kvarenja. Rodovima koji najčešće rastu u uskladištenim namirnicama pripadaju *Penicillium*, *Aspergillus* i *Mucor* (Duraković i Duraković, 2001.).

Ujedno su ti rodovi plijesni najčešći proizvođači mikotoksina. Mikotoksini su toksični sekundarni produkti metabolizma nekih vrsta plijesni. Najpovoljniji uvijeti za rast toksikotvornih plijesni i proizvodnju njihovih toksina prisutni su u tropskim predjelima zbog prikladnih klimatsko-okolišnih uvijeta, temperature i vlage. Plijesni posjeduju sposobnost proizvodnje različitih kemijskih spojeva, od jednostavnih kiselina do složenih makromolekula. Većina plijesni opasnih za zdravlje podrijetlom je iz skladišta, iako su neki biološki aktivni produkti metabolizma plijesni s prirodnih staništa pokazali toksičan učinak na zdravlje ljudi i životinja (Šarkanj i sur., 2010.).

Ovisno o tome nalaze li se toksikotvorne plijesni u polju ili u skladištima, na sintezu mikotoksina utječu vremenski uvijeti, odnosno uvijeti skladištenja (Pitt i Hocking, 2009.).

2.3.2. Značenje plijesni

Čovjek je plijesni podijelio u dvije skupine s obzirom na to kako djeluju na njegove proizvode, životinje i biljke koje uzgaja kao i na samog čovjeka.

Plijesni s pozitivnim značenjem:

1. Proizvodnja antibiotika
2. Proizvodnja organskih kiselina
3. Proizvodnja sireva
4. Proizvodnja enzima i dr.

Plijesni sa negativnim značenjem u životu ljudi:

1. Biosinteza mikotoksina
2. Bolesti (mikoze)
3. Biološka razgradnja i dr. (Duraković, 1996.)

Plijesni s pozitivnim značenjem:

1. Proizvodnja antibiotika

Slučajnim otkrićem penicilina, antibiotika proizvedenog pomoću plijesni *Penicillium notatum* i *Penicillium chrysogenum* godine 1929. Alexander Fleming je otvorio novo poglavlje u borbi protiv raznih infektivnih bolesti prouzročenih bakterijama i drugim mikroorganizmima. Pod antibioticima se podrazumjevaju spojevi koji inhibiraju rast ili razmnožavanje bakterija i ostalih mikroorganizama (Duraković, 1996.).

Osim penicilina, važan antibiotik je i grizeofulvin, koji je 1939.g. otkrila grupa kemičara, kao metabolički produkt plijesni *Penicillium griseofulvum*. Grizeofulvin je prvi antibiotik za liječenje površinskih mikoza (Muntonola i Cvetković, 1989.).

2. Proizvodnja organskih kiselina

Limunska kiselina može se proizvesti pomoću plijesni *Aspergillus niger* i *Aspergillus wentii*. Upotrebljava se kao začini (za bezalkoholna pića), u proizvodnji tinte, bojila, kemikalija i kao antikoagulans.

Itakonska kiselina i njeni derivati nastaju kao proizvod metabolizma plijesni *Aspergillus itaconicus* i *Aspergillus terreus*, a primjenjuje se, uglavnom, u tekstilnoj i kemijskoj industriji, kao i međustadij u pripremi lijekova, u proizvodnji umjetnih vlakana i plastike, površinskih prevlaka, štavljenju kože i dr. (Duraković, 1996.).

3. Proizvodnja sireva

Sir roquefort proizvodi se uz pomoć plemenitih plijesni *Penicillium roqueforti*, brie i camembert uz pomoć *Penicillium candidum* i *Penicillium camemberti*, a gorgonzola uz pomoć *Penicillium roqueforti* i *Penicillium glaucum*. Možemo spomenuti i plavi sir proizveden uz pomoć plijesni *Penicillium roqueforti* (Duraković, 1996.).

4. Proizvodnja enzima

Enzimi dobiveni pomoću plijesni zauzimaju značajno mjesto u različitim industrijskim granama. Primjerice, amilaza dobivena pomoću *Aspergillus oryzae* i *Aspergillus niger* upotrebljava se u proizvodnji sirupa od kukuruznog škroba, u proizvodnji papira (za postizanje glatkoće), u proizvodnji glukoze iz škroba, u pekarskoj industriji (dodatak brašna), u pivarstvu, u proizvodnji lijekova, tekstilnoj industriji.

Proteaze i lipaze (sintetizirana pomoću plijesni *Aspergillus niger*) upotrebljavaju se u čišćenju životinjskog krzna, nužnog u obradi kože, dok se lipaza koristi u mljekarskoj industriji (za okus sira).

Pektinaze proizvodi nekoliko mikroorganizama, ali se komercijalno upotrebljava samo *Aspergillus niger*. Pektinaze se isključivo upotrebljavaju u proizvodnji vina i voćnih sokova (za bistrenje i razgradnju pektinskih tvari) (Duraković, 1996.).

Plijesni sa negativnim značenjem u životu ljudi:

1. Biosinteza mikotoksina

Mikotoksini su toksični produkti metabolizma nekih plijesni koje rastu na različitim namirnicama i krmivima. U akutnim slučajevima mikotoksini izazivaju otrovanja ljudi i životinja (mikotoksikoze), a u kroničnim, oštećenja kože i unutrašnjih organa. U eksperimentalnim uvjetima dokazano je da mikotoksini induciraju karcinom jetre u raznih životinjskih vrsta, a pronađeni su u namirnicama koje se koriste u prehrani ljudi. Tijekom istraživanja primjećeno je djelovanje aflatoksina i na druge organe (pored jetre), kao što su želudac, bubrezi, dušnik i crijeva (Duraković, 1989.).

Većina namirnica (kao i krmiva) je osjetljiva na kontaminaciju mikotoksinima s obzirom na sposobnost plijesni producenata mikotoksina da rastu na najrazličitijim supstratima, pri različitim uvjetima. Prisustvo, pak, plijesni u namirnici ne znači nužno prisutnost mikotoksina (ako plijesan nije dovoljno porasla), ali s druge strane, odsutnost plijesni ne znači da nema mikotoksina jer se mogu zadržati u supstratu dugo nakon nestanka plijesni. Poseban problem predstavlja i pojava tzv. maskiranih mikotoksina koji se u hrani nalaze u promijenjenom obliku. Najčešće je riječ o kemijskoj vezi sa šećerima, pri čemu se takav mikotoksin ne može detektirati uobičajenim metodama što daje krivu sliku o

kontaminaciji analiziranog uzorka. Naime, maskirani mikotoksini se, djelovanjem hidrolitičkih enzima crijevne mikroflore, mogu osloboditi u probavnom traktu i djelovati toksično prema konzumentu (Šarkanj i Klapec, 2013.).

Najvažnijim mikotoksinima smatraju se aflatoksin, trihoteceni, fumonizini, zearalenon i okratoksin A, a sintetiziraju ih najčešće plijesni rodova *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Nujić, 2011.)

Aflatoksin su sekundarni metaboliti, prvenstveno *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus*, ali i nekih drugih, rjeđih vrsta. Riječ je o lipofilnim, termostabilnim spojevima, osjetljivim na UV-svjetlo i upravo obzirom na karakterističnu plavu ili zelenu fluorescenciju pod UV-zračenjem, četiri najznačajnija aflatoksina imenovani su kao B1, B2, G1 i G2, te hidroksilirani derivati M1 i M2. Aflatoksin su genotoksični karcinogeni, pa se smatra da nema sigurnog unosa i preporuča se smanjiti prisustvo u namirnicama na najmanju moguću tehnološki ostvarivu mjeru. Najčešće izazivaju rak jetre, a utvrđena je i hepatotoksičnost i imunotoksičnost na pokusnim životinjama.

Trihoteceni su skupina mikotoksina koje najvećim dijelom proizvode plijesni roda *Fusarium*. Najznačajniji trihoteceni su T-2 toksin, HT-2 toksin, deoksinivalenol (DON), diacetoksiscirpenol, nivalenol, i dr. Akutno visoki unos T-2 toksina najčešće izaziva gastrointestinalne i imunotoksične posljedice. Više doze DON-a se povezuju s epidemijama bolesti probavnog trakta kod ljudi (naziva se još i vomitoksin zbog glavnog simptoma: povraćanja), a djeluje i imunotoksično.

Ohratoksin su metaboliti *Aspergillus* i *Penicillium* vrsta. Najrelevantniji je ohratoksin A (OTA). Ispitivanjima na pokusnim i domaćim životinjama ustanovljena je snažna nefrotoksičnost OTA.

Zearalenon je endokrini disruptor zbog sličnosti građe estrogenu. Nekoliko *Fusarium* vrsta sintetizira ovaj mikotoksin. Nekoliko epidemioloških studija je utvrdilo vezu unosa hrane kontaminirane ovim mikotoksinom i simptoma koji bi se mogli pripisati estrogenskom djelovanju, poput uranjenog puberteta djevojčica.

Patulin proizvodi nekoliko *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssosclamyces* vrsta.

Fumonizine proizvodi nekoliko *Fusarium* vrsta. Kronični unos malih količina su epidemiološke studije povezale s većim rizikom raka jednjaka i defektima neuralne tube. Stoga bi embriji i fetusi mogli biti naročito osjetljivi na izloženost fumonizinima (Šarkanj i Klapec, 2013.).

2. Bolesti (mikoze)

Mikoze su bolesti izazvane gljivama. Dije se u pet skupina:

superficialne (površinske)

kutane (kožne)

subkutane (potkožne)

sustavne i

oportunističke mikoze.

Gljive uzročnici površinske mikoze ograničene su na dlake iz kose i na epidermalne stanice. Općenito, prevladavaju u tropskom podneblju. Gljive uzročnici infekcije kože, kose i noktiju zovu se dermatofiti, a infekcije uzrokovane njima dermatomikoze ili kožne mikoze (Duraković, 1996.).

Potkožne mikoze su gljivične infekcije ispod površine kože, a prouzrokuju ih saprofitne gljive koje žive u tlu i na biljkama. Sustavne mikoze su infekcije gljivama duboko unutar tijela (Kalenić, 1995.).

Oportunistične mikoze izazivaju uvjetno patogeni mikroorganizmi. Oni su neškodljivi u njihovom normalnom staništu, ali mogu postati patogeni u domaćinu koji je oslabljen ili traumatiziran, ili koji je pod terapijom antibiotika širokog spektra (Duraković, 1996.).

3. Biološka razgradnja

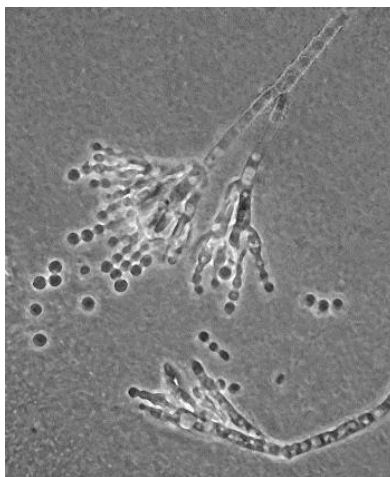
Biološku razgradnju prouzrokuju biološki uzročnici – biorazgrađivači (kukci, ptice, glodavci, mikroorganizmi i dr.). Metaboličko djelovanje različitih mikroorganizama uključuje kvarenje različitog materijala poput papira, drveta, tekstila, uskladištenih proizvoda, metala, bojila. Česti uzročnici biorazgradnje su plijesni roda *Aspergillus*, zbog toga što je velik broj vrsta koje za svoj rast upotrebljavaju različite supstrate (Duraković, 1996.).

2.3.3. Pojedine vrste plijesni

Plijesni roda *Penicillium*

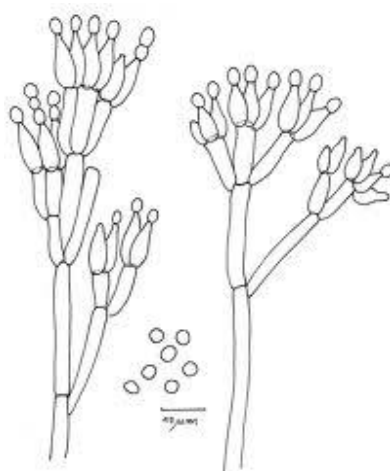
U rod *Penicillium* svrstano je oko 50-tak vrsta plijesni. Bolest kod čovjeka najčešće uzrokuju vrste *P. marneffe*, *P. chrysogenum* i *P. citrinum*. Ove se plijesni nespolno razmnožavaju fikalokonidijama. Kod nekih vrsta otkriven je spolni način razmnožavanja. Vrste roda *Penicillium* mogu uzrokovati različite bolesti čovjeka. Mogu kolonizirati kožu ili nekrotično tkivo pluća, uzrokovati hipersenzibilni pneumonitis ili penicilozu.

Vrste roda *Penicillium* rasprostranjene su širom svijeta. Izolirane su iz tla, zraka, otpadnih tvari i biljaka. Neke vrste ovih plavio-zelenih plijesni stvaraju mikotoksine na nepravilno uskladištenom krmivu i uzrokuju teške mikotoksikoze životinja hranjenih takvom hranom (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).



. Slika 5 Mikroskopska slika plijesni roda *Penicillium*

(http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/nov2003.html, 2014.)



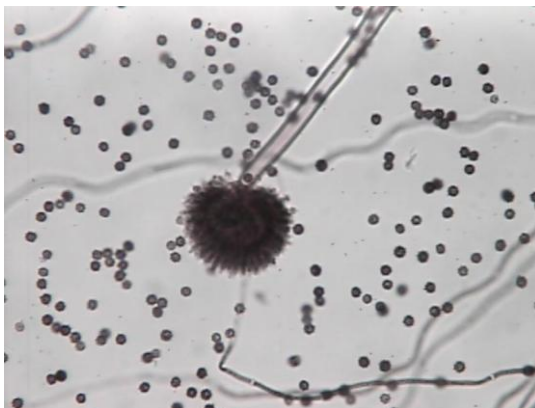
Slika 6 Crtež plijesni roda *Penicillium*

(<http://www.plantasyhongos.es/hongos/Penicillium.htm>, 2014.)

Plijesni roda *Aspergillus*

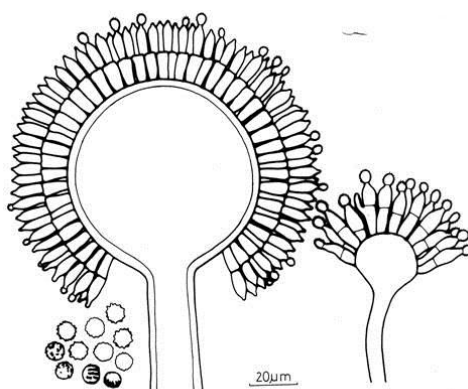
U rod *Aspergillus* svrstano je oko 200 vrsta od kojih je tek 20-tak patogeno za čovjeka. Najčešći uzročnici aspergiloze čovjeka jesu: *A. fumigantus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. candidus* i dr. Ove se plijesni razmnožavaju nespolno fjalokonidijama. Kod nekih vrsta otkriven je i spolni način razmnožavanja. Vrste roda *Aspergillus* mogu uzrokovati različite bolesti čovjeka. Mogu kolonizirati sluznicu dišnih putova ili šupljina stvorenih drugim bolestima, uzrokovati bolesti uslijed preosjetljivosti na gljivične antigene te invadirati stijenke krvnih žila i krvlju se širiti u pluća ili druge unutarnje organe. Rastom u vanjskoj sredini neke vrste ovih plijesni stvaraju mikotoksine (aflatoksin, sterigmatocistin, ohratoksin). Konzumiranjem hrane zagađene mikotoksinima čovjek može razviti kliničku sliku akutnog

trovanja hranom ili toksičnog oštećenja jetre, bubrega i drugih organa. Konidije ovih plijesni nalaze se u zraku, zemlji, vodi, na uskladištenoj hrani i lišću biljaka. Konidije vrste roda *Aspergillus* čine četvrtinu svih konidija u zraku. U 1 m³ nalazi se prosječno 2-15 konidija neke od vrsta ovog roda (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).



Slika 7 Mikroskopska slika plijesni roda *Aspergillus*

(http://www.moldlab.com/wp_moldlab/garlic-and-aspergillus-niger/, 2014.)

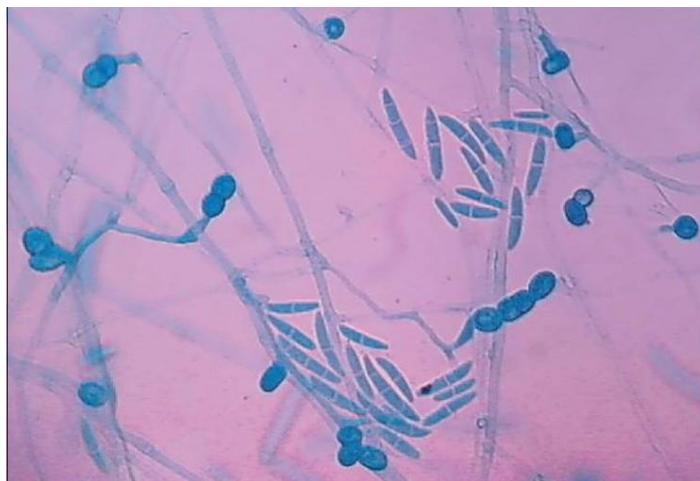


Slika 8 Crtež plijesni roda *Aspergillus*

(http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802220004, 2014.)

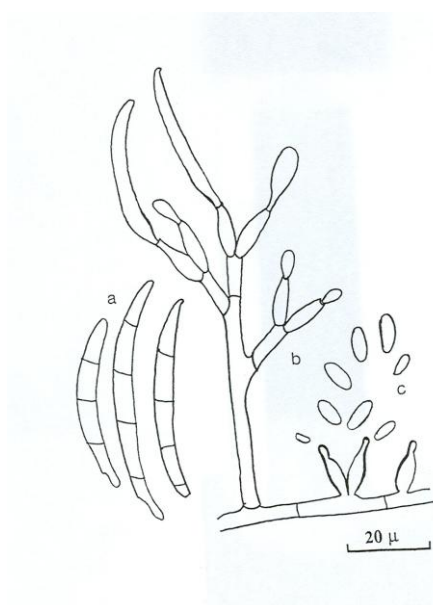
Plijesni roda *Fusarium*

Rod pljesni *Fusarium* razmnožava se nespolno fialokonidijama. Kod vrste *F. moniliforme* otkriven je i spolni način razmnožavanja. Vrste roda *Fusarium* rijetki su uzročnici gljivičnih infekcija čovjeka. Mogu uzrokovati površinsku, kožnu, potkožnu, sustavnu i disminiranu mikozu. U imunodeficijentnih osoba ove se plijesni mogu širiti krvlju u unutarnje organe (bubreg, pluća, srce, gušterača) i stvarati nekrotična žarišta. Vrste roda *Fusarium* saprofitne su plijesni rasprostranjene širom svijeta. Izolirane su iz tla i otpadnih tvari. Uzrokuju bolest ljudi, životinja i biljaka. Neke vrste ove plijesni stvaraju mikotoksine. Fuzarioza nije zarazna gljivična bolest (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).



Slika 9 Mikroskopska slika plijesni roda *Fusarium*

(<http://www.e-ijd.org/article.asp?issn=0019-5154;year=2013;volume=58;issue=3;spage=241;epage=241;aualast=Kudur>, 2014.)



Slika 10 Crtež plijesni roda *Fusarium*

(<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=20&n=Fusarium>, 2014.)

Plijesni roda *Rhizopus*

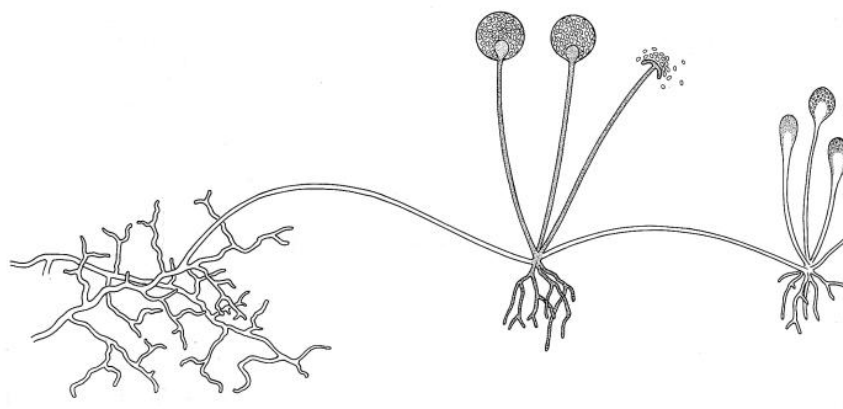
Plijesni roda *Rhizopus* su gljive svrstane u pododjel *Zygomycotina*. Iako je izloženost konidijama ovih plijesni opća, samo mali broj ljudi oboljeva. Smatra se da su ove plijesni slabo virulentne gljive i da uzrokuju bolest poglavito u osoba oštećenog imuniteta, dijabetičara i teško ozljeđenih osoba (opekline, ozljede trbuha i glave). Zigomikozu čovjeka mogu uzrokovati vrste *R. arrhizus* i *R. mikrosporus*. Vrste roda *Rhizopus* vrlo su raširene u prirodi i rasprostranjene širom svijeta. Kako od sustavne i diseminirane zigomikoze oboljevaju osobe s dugotrajnom neutropenijom (npr. osobe nakon transplatacije koštane

moždine), potrebno je ove bolesnike zaštititi od infektivnih sporangiokonidija smještanjem u prostorije s filtriranim zrakom (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).



Slika 11 Mikroskopska slika plijesni roda *Rhizopus*

(<http://bloglistdoktor.blogspot.com/2011/06/rhizopus.html>, 2014.)



Slika 12 Crtež plijesni roda *Rhizopus*

(<http://www.biology-resources.com/drawing-fungi-02-rhizopus.html>, 2014.)

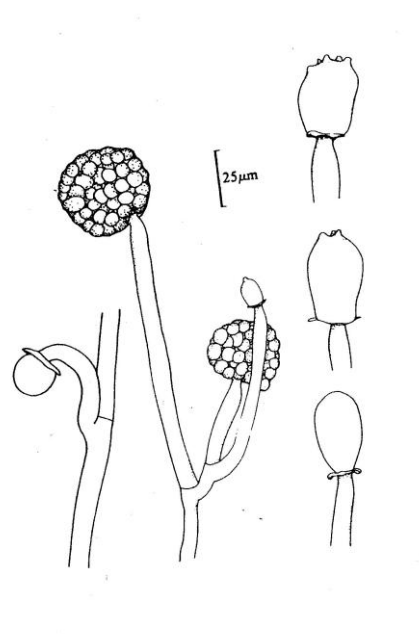
Plijesni roda *Mucor*

Plijesni roda *Mucor* su gljive svrstane u pododjel *Zygomycotina*. Žive kao saprofiti na tlu i na biljkama širom svijeta. Plijesni iz roda *Mucor* raširene su u prirodi i rasprostranjene širom svijeta. Vrste ovog roda uzrokuju zigomikozu čovjeka rjeđe od vrste rodova *Rhizopus* (Kalenić i Mlinarić-Missoni, 1995.).



Slika 13 Mikroskopska slika plijesni roda *Mucor*

(<http://tolweb.org/Mucorales/103792>, 2014.)



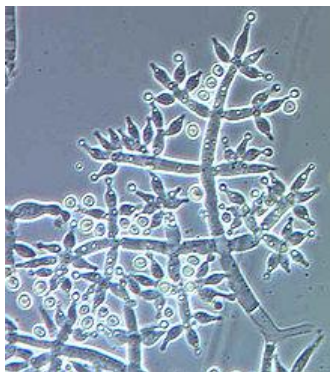
Slika 14 Crtež plijesni roda *Mucor*

(<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=48&n=Mucor>, 2014.)

Plijesni roda *Trichoderma*

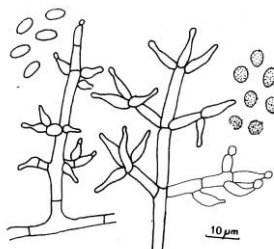
Rod *Trichoderma* (T.) je aseksualna saprofitska gljiva (plijesan). Broj opisanih i potvrđenih, filogenetski različitih vrsta *Trichoderma*, do sada je prešao brojku 100. Makroskopski, rod *Trichoderma* je karakteriziran brzo rastućim kolonijama, koje su u početku glatke i prozirne ili vodenasto bijele, a kasnije postaju flokulirane, s izrazitim čupercima konidiofora koje često formiraju koncentrične zone poput prstena, postupno mjenjajući svoju boju iz bijelkasto-zelene u svijetlu maslinasto-zelenu kad sazriju. Mikroskopski, uočavaju se loptaste konidije na vrhu fijalida koje su u obliku boce i dižu se pod kutem od konidiofora.

Broj kliničkih slučajeva u ljudi, kod kojih je kao uzročnik dokazana neka vrsta iz roda *Trichoderma*, raste iz godine u godinu, a razlog može biti sve veći broj bolesnika s oslabljenim imunitetom kao i veća pažnja mikrobiologa prema ovim plijesnima, koje su prije smatrane nepatogenima (Sabolić, 2012.).



Slika 15 Mikroskopska slika plijesni roda *Trichoderma*

(<http://www.agroterra.com/p/trichomic-hongos-trichoderma-de-trichoderma-sp-13543/13543>, 2014.)



Slika 16 Crtež plijesni roda *Trichoderma*

(<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=43&n=Trichoderma>, 2014.)

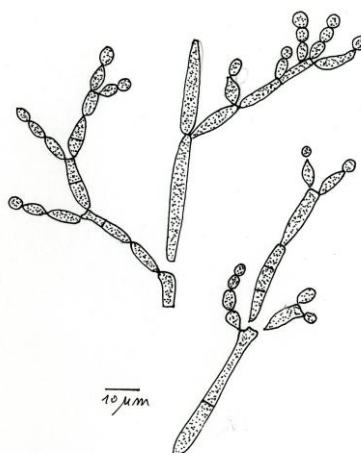
Plijesni roda *Cladosporium*

Cladosporium herbarum kao najčešća vrsta u vanjskom okolišu čini 40-80%, ukupnog godišnjeg sastava plijesni u zraku. Prisutnost *Cladosporium spp.* češća je u sjevernoj Europi. Iako su spore mnogih plijesni znatno manje od peludnih zrnaca, njihovo značenje u izazivanju alergijskih simptoma nije ekvivalentno. Utvrđeno je da je 30-42% djece s alergijskim bolestima senzibilizirano na plijesni. Povezanost između broja spora u zraku i učestalosti senzibilizacije na osnovi kožnog testiranja utvrđena je u djetinjstvu, dok u kasnijoj životnoj dobi više nije izražena (Kanceljak-Macan, 2005.).



Slika 17 Mikroskopska slika plijesni roda *Cladosporium*

(<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=102>, 2014.)

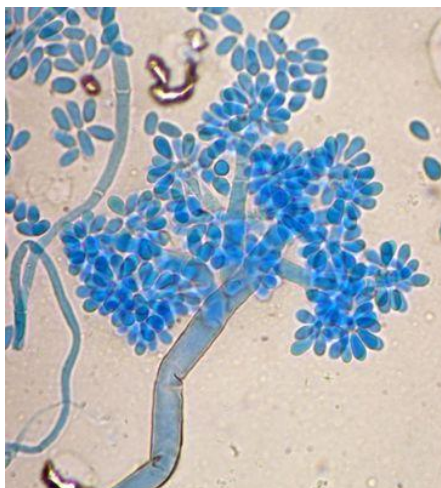


Slika 18 Crtež plijesni roda *Cladosporium*

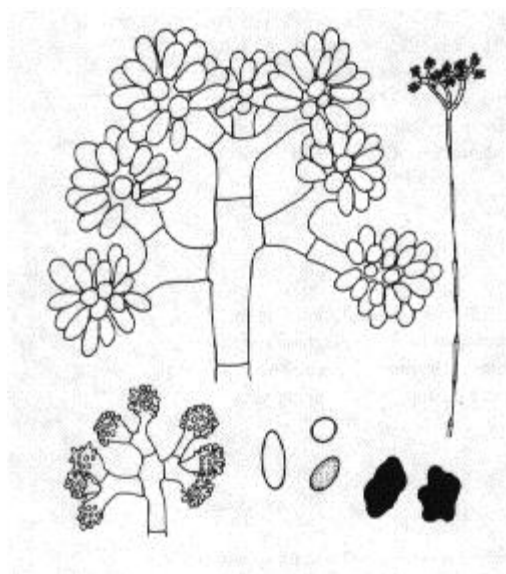
(http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Cladosporium_sphaerospermum.htm, 2014.)

Plijesni roda *Botrytis*

Siva plijesan grožđa (*Botrytis*) poznata je kao saprofit na različitim mrtvim i odumirajućim biljnim dijelovima a kao parazit dolazi na različite biljke i biljne organe. U prirodi se nalazi posvuda u saprofitskoj, odnosno poluparazitskoj fazi, stvarajući obilje konidija, te uvijek postoji mogućnost da u povoljnim prilikama i pod određenim uvjetima kao parazit uzrokuje masovno oboljenje neke biljne vrste (<http://www.vinogradarstvo.hr/index.php?s=34>, 2014.)



Slika 19 Mikroskopska slika plijesni roda *Botrytis*
(<http://microfungi.mnhn.fr/joelle.html>, 2014.)



Slika 18 Crtež plijesni roda *Botrytis*

(<http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Botrytis.html>, 2014.)

2.3.4. Kvasci

Kvasci pripadaju carstvu Fungi, zajedno sa plijesnima i mesnatim gljivama. Kvasci zasigurno po brojnosti čine ekonomski najznačajniju skupinu mikroorganizama (Vrsalović-Presečki, 2003.).

Poput plijesni, kvasci se također mogu prenositi zrakom ili na drugi način i tako dospjeti na površinu namirnica. Kolonije kvasca su uglavnom vlažne ili mukozne po izgledu i blijedo žute boje. Kvascima najviše odgovara a_w od 0,90 do 0,94, ali mogu rasti i ispod 0,90. Točnije, neki osmofilni kvasci mogu rasti čak i na a_w od 0,60. Ovi mikroorganizmi najbolje rastu u kiseloj pH koja se kreće od 4,0 do 4,5 (Marriott i Gravani, 2006.).

Većina njih nije štetna po ljudsko zdravlje. Neki od njih koriste se kao radni mikroorganizmi ili starter kulture u prehrambenoj industriji, npr. u proizvodnji pekarskih i konditorskih proizvoda, piva i dr. Ova grupa mikroorganizama sadrži mnogobrojne rodove. Najveća pažnja posvećena je sljedećim rodovima: *Candida*, *Saccharomyces* i *Rhodotorula* (Škrinjar i Tešanović, 2007).

Neki od patogenih kvasaca: *Candida albicans*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*.

Za ljude su oni, s jedne strane od gospodarske važnosti ali također mogu biti uzročnici bolesti (općenito kod osoba sa slabim imunološkim statusom). Najpoznatiji kvasac u medicini je *Candida albicans*, koji uzrokuje kandidijazu. Ova gljiva često naseljava područja nosa, grla i usta i živi tamo bez izazivanja bolesti, ali isto tako može izazvati gljivične infekcije ("oralni osip", "pelenski osip") osobito kod dojenčadi (Buchrieser i Miorini, 2009.).

Candida albicans je pripadnik normalne fiziološke flore čovjeka. Manifestira se različitim kliničkim slikama. Infekcija može biti ograničena na sluznicu ili kožu ili može zahvatiti jedan ili više unutarnjih organa. Kanidioza usne šupljine javlja se često u novorođenčadi u prvim tjednima poslije rođenja te u odraslih s hormonalnim i imunološkim poremećajima. Očituje se bijelim naslagama na jeziku, ždrijelu i sluznici obraza. Kanidioza jednjaka, želuca i crijeva razvija se često u osoba s malignim bolestima. Kanidioza rodnice javlja se češće u žena sa šećernom bolešću, u trudnoći i nakon liječenja antibioticima. Prisutan je bijel, sirast iscjedak i jak svrbež (Kalenić i Mlinarić, 1995.).



Slika 19 Kvasac roda *Candida albicans* na Sabouraud dekstroznom agaru

(<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html>, 2014.)



Slika 20 Mikroskopska slika kvasca roda *Candida albicans*

(http://www.doctorfungus.org/thefungi/Candida_albicans.php, 2014.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je ispitati mikrobiološku čistoću dijelova ambalaže nekih konzumnih pića, tako što su se uzimali brisevi sa gornjeg dijela ambalaže na kojem se nalazi otvarač. Određivana je prisutnost bakterija vrste *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, te broj aerobnih mezofilnih bakterija, plijesni i kvasaca.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Materijal

Uzorci za mikrobiološke analize su kupljeni u lokalnim trgovačkim centrima i analizirani odmah po kupovini. Uzorci su prikupljeni metodom slučajnog odabira. Ukupno je analiziran 51 uzorak.

Trgovački centar A: 10 uzoraka

1. Somersby apple cider 0,5L
2. Pivo lager grejp K plus 0,5L
3. Ožujsko pivo 0,33L
4. Karlovačko pivo 0,33L
5. Orangina 0,33L
6. Red Bull 0,25L
7. Franzberg bier premium lager 0,5L
8. Karlovačko pivo 0,5L
9. Pivo lager K plus 0,5L
10. Laško zlatorog pivo 0,5L

Trgovački centar B: 10 uzoraka

1. Ožujsko pivo 0,5L
2. Pivo lager K plus 0,5L
3. Karlovačko pivo 0,5L
4. Pan lager pivo 0,5L
5. Union pivo radler grapefruit 0,5L
6. Amstel premium pilsener 0,5L
7. Ožujsko cool pivo 0,5L

8. Bavaria Holland premium beer 0,5L
9. Ožujsko limun pivo 0,5L
10. Staropramen premium beer 0,5L

Trgovački centar C: 10 uzoraka

1. Karlovačko rally pivo 0,5L
2. Pivo lager grejp K plus 0,5L
3. Franzberg bier premium lager 4%alk., 0,5L
4. Franzberg bier premium lager 5%alk., 0,5L
5. Osječko pivo 0,5L
6. Ožujsko pivo grejp 0,5L
7. Ožujsko pivo 0,33L
8. Burn energy drink 0,25L
9. The blue edition Red Bull energy drink 0,25L
10. Black energy drink Mike Tyson 0,25L

Trgovački centar D: 10 uzoraka

1. Guarana energy drink 0,25L
2. Guarana energy drink 0,25L
3. Red Bull energy drink sugarfree 0,25L
4. Carling lager pivo 0,568L
5. Union pivo radler grapefruit 0,5L
6. Ožujsko cool pivo 0,5L
7. Karlovačko rally pivo 0,5L
8. Karlovačko pivo 0,5L
9. Ožujsko pivo 0,5L
10. Ožujsko limun pivo 0,5L

Trgovački centar E: 11 uzoraka

1. Ožujsko pivo grejp 0,5L
2. Pivo lager grejp K plus 0,5L

3. Pivo lager K plus 0,5L
4. Pivo lager grejp K plus navijačko 0,55L
5. Bavaria Holland premium beer 0,5L
6. Staropramen premium beer 0,5L
7. Laško zlatorog pivo 0,5L
8. Amstel premium pilsener 0,5L
9. Franzberg bier premium lager 4%alk., 0,5L
10. Franzberg bier premium lager 5%alk., 0,5L
11. Red Bull energy drink 0,355L

3.2.2. Metode

Za mikrobiološku analizu uzoraka ambalaže konzumnih pića, uzeti su brisevi sa gornjeg dijela ambalaže na kojem se nalazi otvarač. Sterilnim štapićem prethodno uronjenim u fiziološku otopinu prebrisana je čitava površina gornjeg dijela limenke ambalaže, uključujući i otvarač limenke. Štapić se uronio u 10 mL sterilne fiziološke otopine te se izvršila homogenizacija uzorka pri čemu se mikroorganizmi skinu u fiziološku otopinu i na taj način dobije se osnovno razrjeđenje iz kojega se prema potrebi i očekivanom broju istraživanih skupina mikroorganizama pripremaju ostala razrjeđenja, prenošenjem 1 mL u narednih 9 mL sterilne fiziološke otopine. Nakon toga, u vremenu od najviše 15 minuta, naciepljene su podloge za izolaciju i/ili prebrojavanje odabranih skupina mikroorganizama.

Aerobne, mezofilne bakterije

Preneseno je 1 mL inokuluma u sterilnu, praznu petrijevu zdjelicu. U zdjelicu je uliven Tryptic Glucose Yeast Agar (TGK; Biolife, Italija), otopljen i ohlađen na 55 °C. Nakon ulijevanja i homogenizacije, uzorci su inkubirani u termostatu pri 28 °C tijekom 7 dana. Nakon inkubacije se pratilo da li je došlo do porasta kolonija mezofilnih bakterija, te su prebrojane. Njihov broj je preračunat prema sljedećoj formuli (te je preračunat na 1cm²):

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (\text{jed/ mL})$$

CFU (Colony Forming Units / broj živih stanica koje stvaraju kolonije)

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae*

Preneseno je 1 mL inokuluma iz osnovnog razrijeđenja u epruvetu s 10 mL Mossel-ovog bujona za enterobakterije (Mossel Bujon; Biolife, Italija). Nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C, bujon koji se zamutio i/ili promjenio boju iz zelene u žutu dokaz je prisutnosti bakterija porodice *Enterobacteriaceae*.

Bakterije vrste *Escherichia coli*

Prisutnost i broj bakterija vrste *Escherichia coli* određena je na Endo agaru (Biolife, Italija) prenošenjem 0,1mL inokuluma iz razrijeđenja 10^{-1} na površinu podloge i razmazivanjem sterilnim štapićem. Nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C, bakterije ove vrste tvore crveno obojene kolonije metalnog sjaja. Porasle kolonije se provjeravaju biokemijskim testovima. Njihov broj je preračunat prema spomenutoj formuli za CFU, te je rezultat preračunat na jedinicu površine od 1cm^2 .

Bakterije vrste *Staphylococcus aureus*

Prisutnost i broj bakterija vrste *Staphylococcus aureus* određena je na Bayer Parker-ovom agaru (Biolife, Italija) prenošenjem 0,1mL inokuluma iz razrijeđenja 10^{-1} na površinu podloge i razmazivanjem sterilnim štapićem. Nakon inkubacije od 48 sati pri 37 °C se pratilo da li je došlo do porasta ove vrste bakterija koja na Bayer Parker-ovom agaru raste u vidu sitnih crnih kolonija okruženih bijelo-sivim neprozirnim prstenom a zatim prozirnom zonom. Njihov broj je preračunat prema spomenutoj formuli za CFU, te je rezultat preračunat na jedinicu površine od 1cm^2 .

Plijesni i kvasci

Broj kolonija plijesni određen je prenošenjem 1 mL inokuluma pripadajućeg razrijeđenja u sterilnu petrijevu zdjelicu i ulijevanjem Czapekovog agara koji je prethodno rastopljen i ohlađen na 45 °C u vodenoj kupelji. Kvasci su se određivali na isti način, s time da se koristio Sabouraud dekstrozni agar. Nakon inkubacije od 7 dana pri 25 °C, prebrojane su porasle kolonije plijesni. Njihov broj je preračunat prema gore spomenutoj formuli za CFU (kao i za aerobne mezofilne bakterije), te je rezultat preračunat po 1cm^2 . Plijesni su determinirane do roda uz pomoć priručnika za determinaciju (Pitt i Hocking, 1997.; Klic, 2002.).

3.3. OBRADA REZULTATA

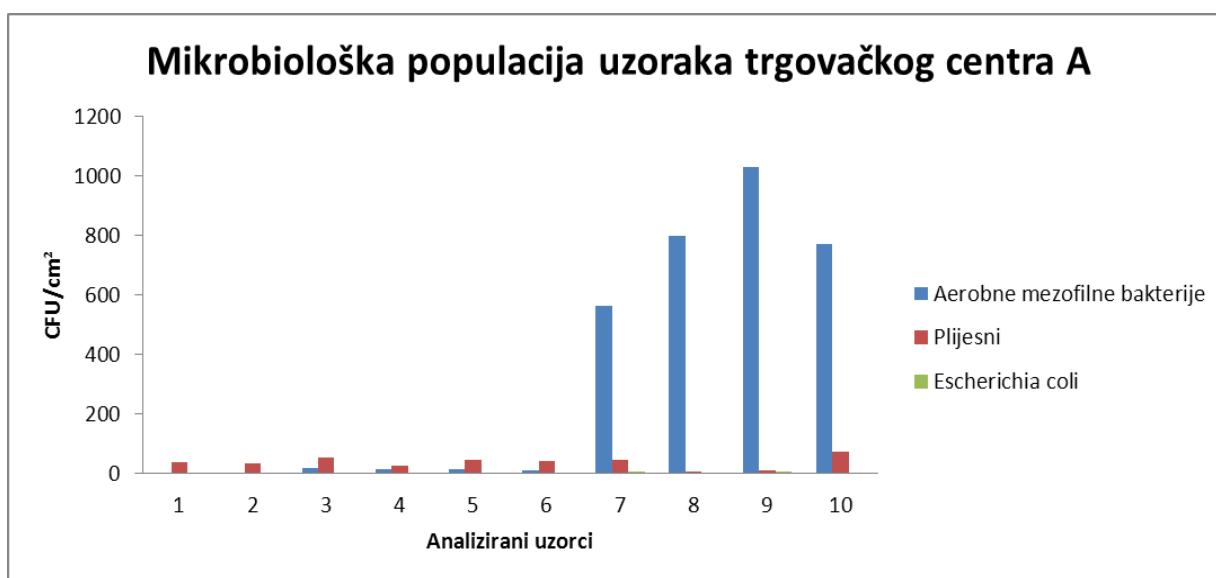
Rezultati rada obrađeni su uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2007 za Windows, Microsoft Corporation, Redmond, SAD i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows, GraphPad Software, San diego, SAD.

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI ISPITIVANJA ONEČIŠĆENJA DIJELOVA AMBALAŽNOG MATERIJALA

Tablica 1. Ukupni broj kolonija bakterija, plijesni i kvasaca u analiziranim uzorcima trgovačkog centra A

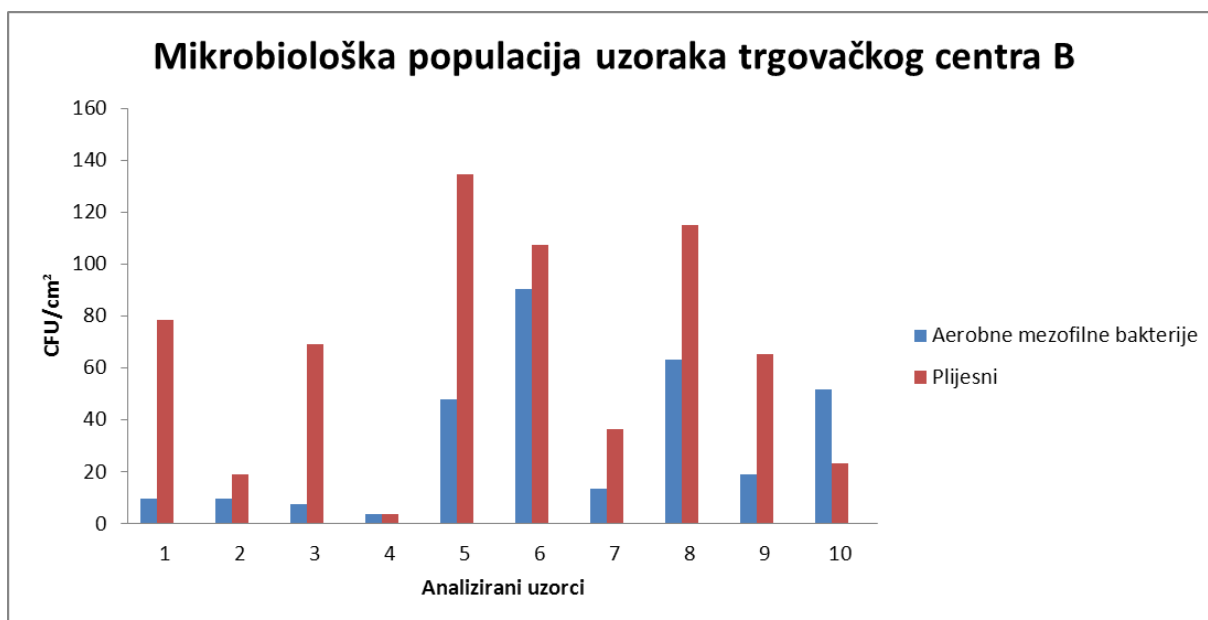
Redni broj	Aerobne, mezofilne bakterije [CFU/cm ²]	<i>Enterobacteriaceae</i> [CFU/cm ²]	<i>Escherichia coli</i> [CFU/cm ²]	<i>Staphylococcus aureus</i> [CFU/cm ²]	Plijesni [CFU/cm ²]	Kvasci [CFU/cm ²]
1.	-	-	-	-	$3,9 \times 10^1$	-
2.	-	-	-	-	$3,3 \times 10^1$	-
3.	$1,7 \times 10^1$	-	-	-	$5,2 \times 10^1$	-
4.	$1,3 \times 10^1$	-	-	-	$2,5 \times 10^1$	-
5.	$1,3 \times 10^1$	-	-	-	$4,4 \times 10^1$	-
6.	1×10^1	-	-	-	4×10^1	-
7.	$5,6 \times 10^2$	>10	1,9	-	$4,6 \times 10^1$	-
8.	8×10^2	-	-	-	5,8	-
9.	1×10^3	>10	3,8	-	$1,2 \times 10^1$	-
10.	$7,7 \times 10^2$	-	-	-	$7,3 \times 10^1$	-



Slika 21 Mikrobiološka populacija uzoraka trgovačkog centra A

Tablica 2. Ukupni broj kolonija bakterija, plijesni i kvasaca u analiziranim uzorcima trgovačkog centra B

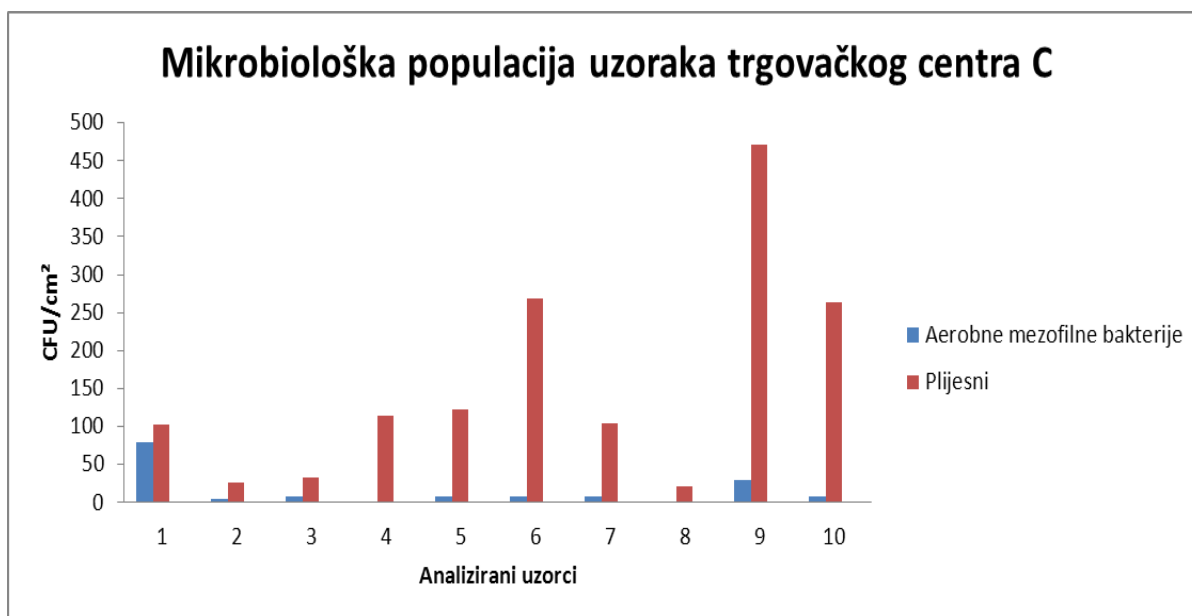
Redni broj	Aerobne, mezofilne bakterije [CFU/cm ²]	<i>Enterobacteriaceae</i> [CFU/cm ²]	<i>Escherichia coli</i> [CFU/cm ²]	<i>Staphylococcus aureus</i> [CFU/cm ²]	Plijesni [CFU/cm ²]	Kvasci [CFU/cm ²]
1.	9,6	-	-	-	$7,9 \times 10^1$	-
2.	9,6	-	-	-	$1,9 \times 10^1$	-
3.	7,7	-	-	-	$6,9 \times 10^1$	-
4.	3,8	-	-	-	3,8	-
5.	$4,8 \times 10^1$	-	-	-	$1,3 \times 10^2$	-
6.	9×10^1	-	-	-	$1,1 \times 10^2$	-
7.	$1,4 \times 10^1$	-	-	-	$3,7 \times 10^1$	-
8.	$6,4 \times 10^1$	-	-	-	$1,2 \times 10^2$	-
9.	$1,9 \times 10^1$	>10	-	-	$6,5 \times 10^1$	-
10.	$5,2 \times 10^1$	-	-	-	$2,3 \times 10^1$	-



Slika 22 Mikrobiološka populacija uzoraka trgovačkog centra B

Tablica 3. Ukupni broj kolonija bakterija, plijesni i kvasaca u analiziranim uzorcima trgovačkog centra C

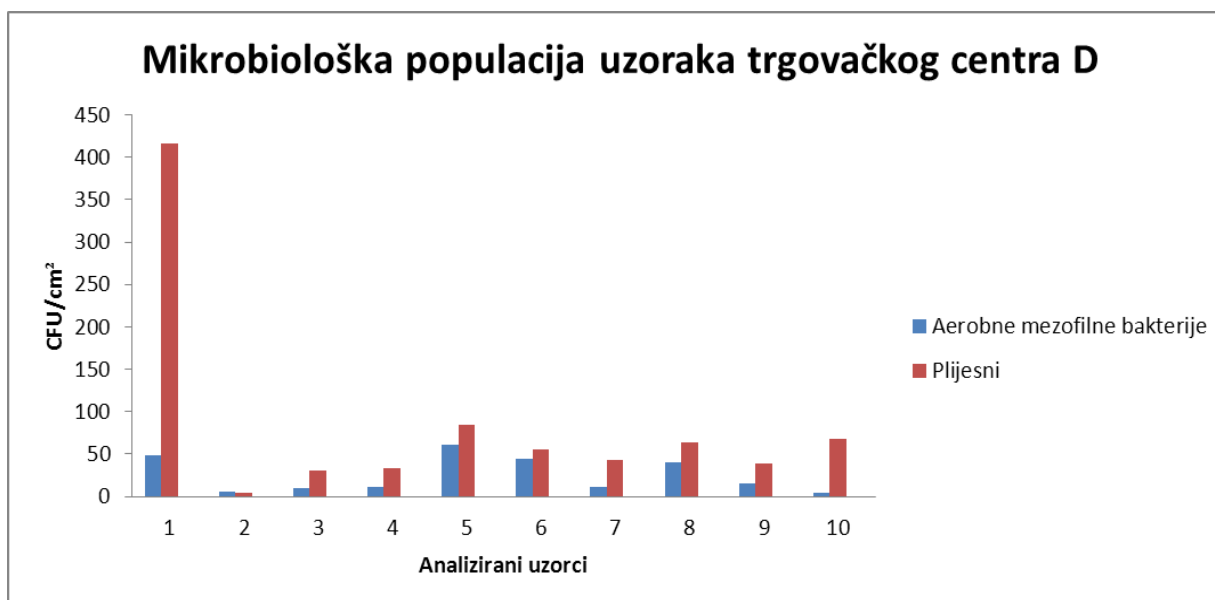
Redni broj	Aerobne, mezofilne bakterije [CFU/cm ²]	<i>Enterobacteriaceae</i> [CFU/cm ²]	<i>Escherichia coli</i> [CFU/cm ²]	<i>Staphylococcus aureus</i> [CFU/cm ²]	Plijesni [CFU/cm ²]	Kvasci [CFU/cm ²]
1.	$7,9 \times 10^1$	-	-	-	1×10^2	-
2.	3,8	>10	-	-	$2,7 \times 10^1$	-
3.	7,7	-	-	-	$3,3 \times 10^1$	-
4.	-	-	-	-	$1,1 \times 10^2$	-
5.	7,7	-	-	-	$1,2 \times 10^2$	-
6.	7,7	-	-	-	$2,7 \times 10^2$	-
7.	7,7	-	-	-	1×10^2	-
8.	-	-	-	-	$2,2 \times 10^1$	-
9.	3×10^1	-	-	-	$4,7 \times 10^2$	-
10.	8	-	-	-	$2,6 \times 10^2$	-



Slika 23 Mikrobiološka populacija uzoraka trgovačkog centra C

Tablica 4. Ukupni broj kolonija bakterija, plijesni i kvasaca u analiziranim uzorcima trgovačkog centra D

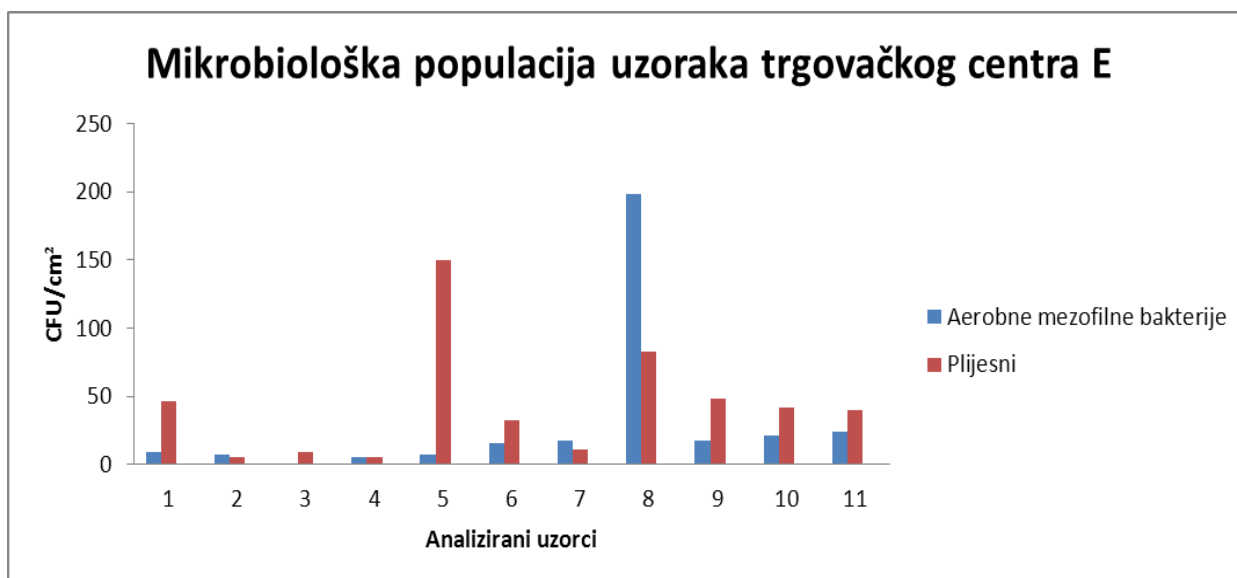
Redni broj	Aerobne, mezofilne bakterije [CFU/cm ²]	<i>Enterobacteriaceae</i> [CFU/cm ²]	<i>Escherichia coli</i> [CFU/cm ²]	<i>Staphylococcus aureus</i> [CFU/cm ²]	Plijesni [CFU/cm ²]	Kvasci [CFU/cm ²]
1.	4,8×10 ¹	-	-	-	4,2×10 ²	-
2.	6	-	-	-	4	-
3.	1×10 ¹	-	-	-	3×10 ¹	-
4.	1,2×10 ¹	-	-	-	3,3×10 ¹	-
5.	6,2×10 ¹	-	-	-	8,5×10 ¹	-
6.	4,4×10 ¹	-	-	-	5,6×10 ¹	-
7.	1,1×10 ¹	-	-	-	4,2×10 ¹	-
8.	4×10 ¹	-	-	-	6,4×10 ¹	-
9.	1,5×10 ¹	-	-	-	3,9×10 ¹	-
10.	3,8	-	-	-	6,7×10 ¹	-



Slika 24 Mikrobiološka populacija uzoraka trgovačkog centra D

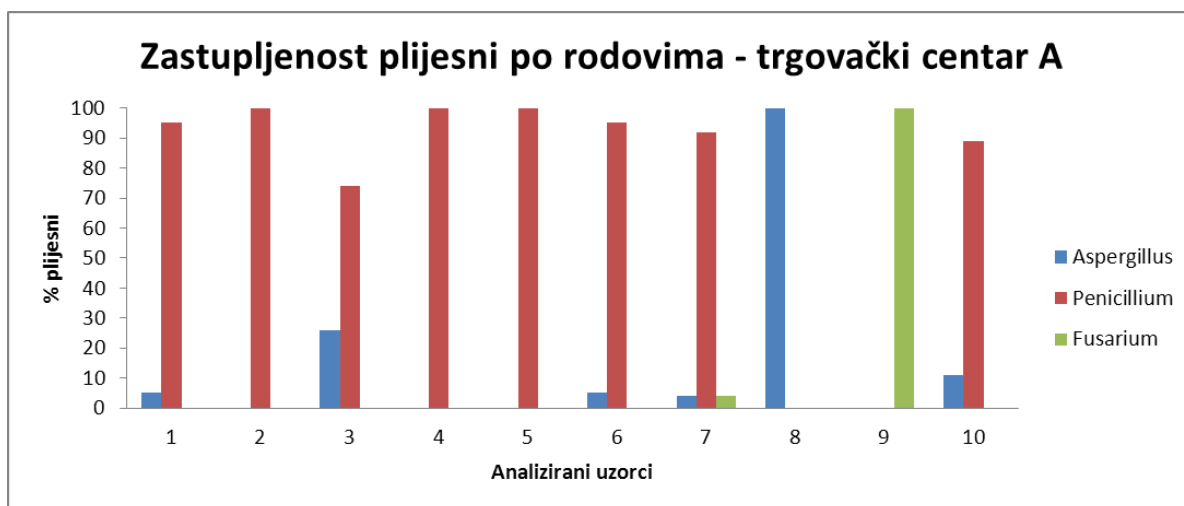
Tablica 5. Ukupni broj kolonija bakterija, plijesni i kvasaca u analiziranim uzorcima trgovačkog centra E

Redni broj	Aerobne, mezofilne bakterije [CFU/cm ²]	<i>Enterobacteriaceae</i> [CFU/cm ²]	<i>Escherichia coli</i> [CFU/cm ²]	<i>Staphylococcus aureus</i> [CFU/cm ²]	Plijesni [CFU/cm ²]	Kvasci [CFU/cm ²]
1.	9,6	-	-	-	4,6×10 ¹	-
2.	7,7	-	-	-	5,8	-
3.	-	-	-	-	9,6	-
4.	5,8	-	-	-	5,8	-
5.	7,7	-	-	-	1,5×10 ²	-
6.	1,5×10 ¹	-	-	-	3,2×10 ¹	-
7.	1,7×10 ¹	-	-	-	1,2×10 ¹	-
8.	2×10 ²	-	-	-	8,3×10 ¹	-
9.	1,7×10 ¹	-	-	-	4,8×10 ¹	-
10.	2,1×10 ¹	-	-	-	4,2×10 ¹	-
11.	2,4×10 ¹	-	-	-	4×10 ¹	-

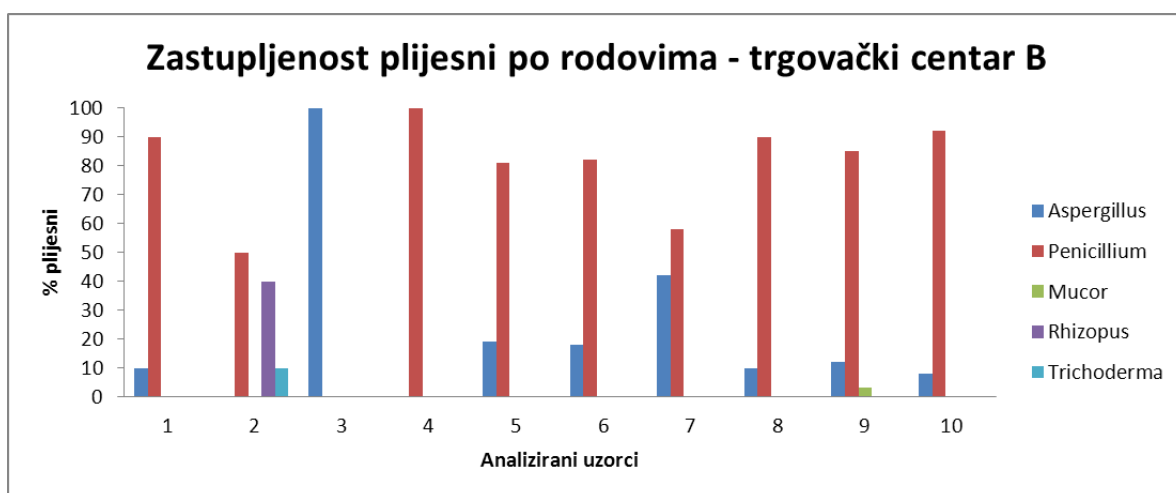


Slika 25 Mikrobiološka populacija uzoraka trgovačkog centra E

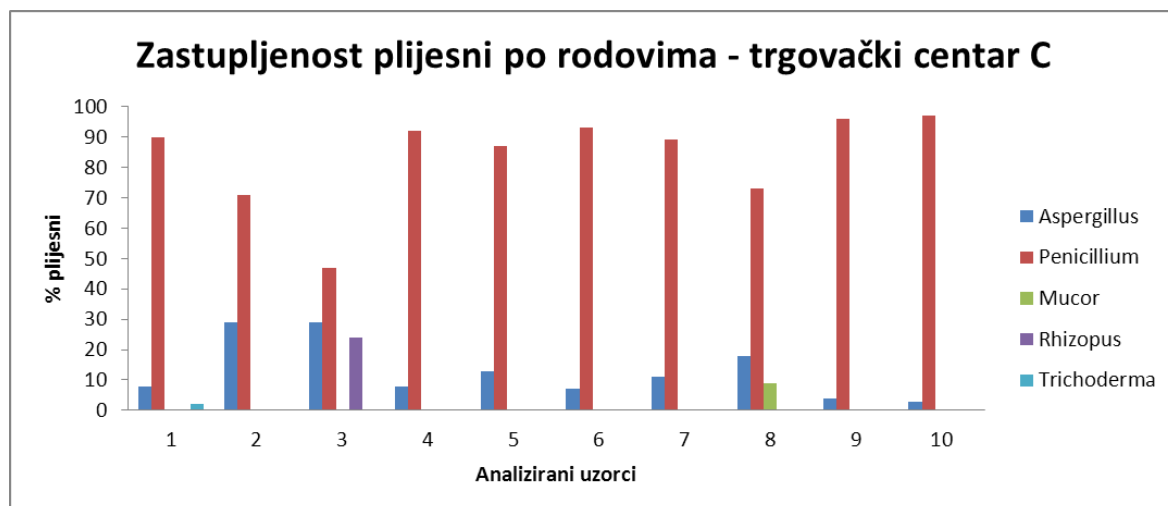
4.2. ZASTUPLJENOST PLIJESNI PO RODOVIMA



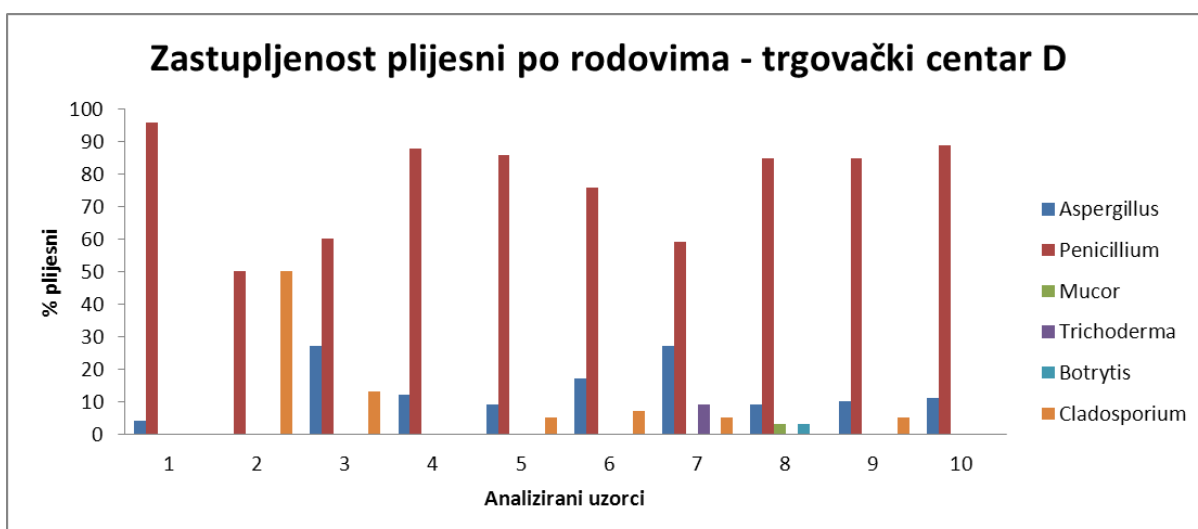
Slika 26 Zastupljenost plijesni po rodovima - trgovački centar A



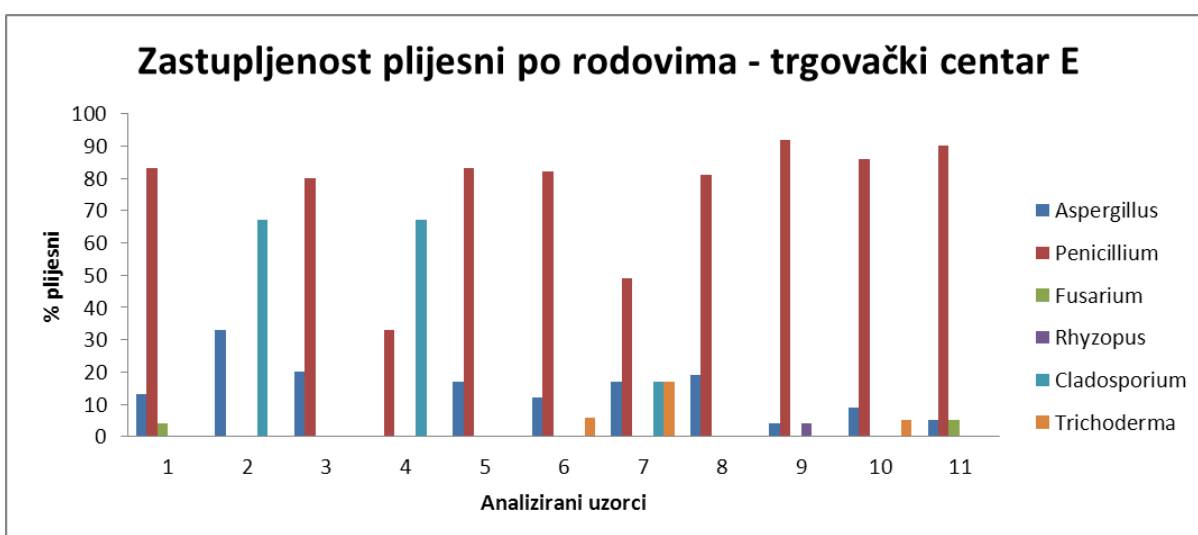
Slika 27 Zastupljenost plijesni po rodovima - trgovački centar B



Slika 28 Zastupljenost plijesni po rodovima - trgovački centar C



Slika 29 Zastupljenost plijesni po rodovima - trgovački centar D



Slika 30 Zastupljenost plijesni po rodovima - trgovački centar E



Slika 31 Slike prikazuju porasle plijesni na Czapekovom agaru iz svih analiziranih uzoraka

5. RASPRAVA

5.1. MIKROBIOLOŠKA POPULACIJA ANALIZIRANIH DIJELOVA AMBALAŽE

Mikrobiološka populacija analiziranih uzoraka prikazana je **Slikama 21-25.**, te **Tablicama 1-5.**

Rezultati analiziranih uzoraka trgovačkog centra A (**Tablica 1, Slika 21**) prikazuju da je utvrđeno najviše aerobnih mezofilnih bakterija (1×10^3 po cm^2 na 9. uzorku), a na samoj ambalaži je dopušten broj aerobnih mezofilnih bakterija do $\leq 1 \times 10^2$ po cm^2 što govori da ovaj uzorak, vjerojatno, nije pravilno skladišten. Isto vrijedi i za 7., 8. i 10. uzorak. Aerobne mezofilne bakterije su velika skupina bakterija koja, nužno, ne uključuje i patogene.

Na 7. i 9. uzorku pronađena je bakterija vrste *E. Coli.*, te je također bio pozitivan Mossel-ov bujon koji potvrđuje prisutnost bakterija porodice *Enterobacteriaceae*. Dopušten broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae* na ambalaži je od 0-1 po cm^2 . Na 7. uzorku bakterija vrste *E.coli* je u količini od 1,9 a na 9. 3,8 po cm^2 što prikazuje veću vrijednost od dopuštene. Iako se većina ovih bakterija ne smatra patogenima, ipak postoje i patogeni koji mogu izazvati probleme u ljudskom organizmu. Prisutnost bakterija vrste *Staphylococcus aureus* te kvasci nisu ustanovljeni.

Broj plijesni kretao se od 5,8 do $7,3 \times 10^1$ po cm^2 . Najzastupljeniji rod plijesni je *Penicillium* (**Slika 26**). Nizak broj plijesni je i posljedica, vjerojatno, dobre mikrobiološke ispravnosti proizvodnog pogona, odnosno samog skladištenja u pogonu i trgovini.

Rezultati analiziranih uzoraka trgovačkog centra B (**Tablica 2, Slika 22**) prikazuju da je najveći broj aerobnih mezofilnih bakterija ustanovljen na 6. uzorku u količini od 9×10^1 po cm^2 , što ne prelazi dopuštenu vrijednost.

Uzorak 9. je imao pozitivan Mossel-ov bujon, ali nisu ustanovljene bakterije vrste *E.coli*. Kao i u trgovačkom centru A prisutnost bakterija vrste *Staphylococcus aureus* te kvasci nisu ustanovljeni.

Najveći broj plijesni je utvrđen na 5. uzorku u količini od $1,3 \times 10^2$ po cm^2 . Najzastupljeniji rod plijesni je *Penicillium* (**Slika 27**).

Rezultati analiziranih uzoraka trgovačkog centra C (**Tablica 3, Slika 23**) prikazuju da je najveći broj aerobnih mezofilnih bakterija utvrđen na 1. uzorku u količini od $7,9 \times 10^1$ po cm^2 , što ne prelazi dopuštenu vrijednost.

Uzorak 1. trgovačkog centra C je imao pozitivan Mossel-ov bujon, ali nisu utvrđene bakterije vrste *E.coli*. Prisutnost bakterija vrste *Staphylococcus aureus* te kvasci nisu ustanovljeni.

Najveći broj plijesni je utvrđen na 9. uzorku u količini od $4,7 \times 10^2$ po cm^2 . Najzastupljeniji rod plijesni je *Penicillium* (**Slika 28**).

Rezultati analiziranih uzoraka trgovačkog centra D (**Tablica 4, Slika 24**) prikazuju da je najveći broj aerobnih mezofilnih bakterija dokazan na 5. uzorku u količini od $6,2 \times 10^1$ po cm^2 , što ne prelazi dopuštenu vrijednost.

Niti na jednom uzorku nije dokazana prisutnost bakterija vrste *E.coli* odnosno bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, kao niti prisutnost bakterija vrste *Staphylococcus aureus* te kvasaca.

Najveći broj plijesni je utvrđen na 1. uzorku u količini od $4,2 \times 10^2$ po cm^2 . Najzastupljeniji rod plijesni je *Penicillium* (**Slika 29**).

Rezultati analiziranih uzoraka trgovačkog centra E (**Tablica 5, Slika 25**) prikazuju da je najveći broj aerobnih mezofilnih bakterija utvrđen na 8. uzorku u količini od 2×10^2 po cm^2 , što prelazi dopuštenu vrijednost od $\leq 1 \times 10^2$ po cm^2 . Ostali uzorci su prikazuju manju vrijednost prisutnih aerobnih mezofilnih bakterija.

Najveći broj plijesni je utvrđen na 5. uzorku u količini od $1,5 \times 10^2$ po cm^2 . Najzastupljeniji rod plijesni je *Penicillium* (**Slika 30**).

Niti na jednom uzorku nije utvrđena prisutnost *E.coli* odnosno *Enterobacteriaceae*, kao niti prisutnost bakterija vrste *Staphylococcus aureus* te kvasaca.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Broj aerobnih mezofilnih bakterija se kretao od 0 do 1×10^3 po cm^2 . Trgovina A i E su imale uzorke na čijoj su ambalaži dokazane vrijednosti koje prelaze dopuštene vrijednosti ove vrste bakterija. To su uzorci 7. ($5,6 \times 10^2$ po cm^2), 8. (8×10^2 po cm^2), 9. (1×10^3 po cm^2) i 10. ($7,7 \times 10^2$ po cm^2) iz trgovine A, te 8. uzorak sa vrijednosti od 2×10^2 po cm^2 iz trgovine E.
2. Broj plijesni se kretao od 0 do $4,7 \times 10^2$ po cm^2 . Zastupljene vrste plijesni na analiziranim dijelovima ambalaže su: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* i *Botrytis*.
3. Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* dokazane su na uzorcima: 7. i 9. trgovačkog centra A, na 9. uzorku trgovačkog centra B te 2. uzorku iz trgovačkog centra C što je dokazano Mossel-ovim bujonom.
4. Bakterije vrste *Escherichia coli* su dokazane na 7. uzorku u količini od 1,9 po cm^2 , te na 9. uzorku u količini od 3,8 po cm^2 trgovačkog centra A, te su vrijednosti iznad dopuštenih. Na ostalim analiziranim uzorcima iz drugih trgovačkih centara bakterije vrste *Escherichia coli* nisu ustanovljene.
5. U analiziranim uzorcima nije dokazana prisutnost bakterija vrste *Staphylococcus aureus*.
6. Prisutnost kvasaca nije ustanovljena.
7. Glede prisutnosti velikog broja različitih mikroorganizama na površini limenki postoji mogućnost zaraze konzumenata različitim mikotoksinima i patogenim bakterijama pa se preporuča prebrisati ili čak oprati dio ambalaže, na kojem se nalazi otvor za piće, prije uporabe.

7. LITERATURA

Adams MR, Moss MO: *Food microbiology*. RSC Publishing, Cambridge, 2008.

Agrotterra - mikroskopska slika plijesni roda *Trichoderma*:

<http://www.agrotterra.com/p/trichomic-hongos-trichoderma-de-trichoderma-sp-13543/13543> (10.07.2014.)

Anamorphic fungi - crtež plijesni roda *Aspergillus*:

http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802220004 (16.07.2014.)

Anonimno: *Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima*. NN/RH br. 74/08. I 156/08., 2008.

Narodne novine: *Pravilnik o učestalosti kontrole i normativina mikrobiološke čistoće u objektima pod sanitarnim nadzorom*. br. 79/07, 113/08 i 43/09.

Biology resources - crtež plijesni roda *Rhizopus*: <http://www.biology-resources.com/drawing-fungi-02-rhizopus.html> (10.07.2014.)

Blog list doktor - mikroskopska slika plijesni roda *Rhizopus*:

<http://bloglistdoktor.blogspot.com/2011/06/rhizopus.html> (10.07.2014.)

Bhunja AK: *Foodborne microbial pathogens: mehanisms and pathogenesis*. Springer, New York, 2008.

Botit botany - mikroskopska slika plijesni roda *Penicillium*:

http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/nov2003.html (16.07.2014.)

Brčina A: *Mikrobiološka kontrola hrane (interna skripta za učenike)*. Tuzla, 2013.

Buchrieser V, Miorini T: *Osnove mikroiologije i infektologije*. Austria, 2009.

Doctor fungus - mikroskopska slika kvasca roda *Candida albicans*:

http://www.doctorfungus.org/thefungi/Candida_albicans.php (10.07.2014.)

Duraković, S., Duraković L: *Mikrobiologija namirnica: osnove i dostignuća*. Kugler, Zagreb, 2001.

Duraković S: *Opća mikrobiologija*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

Duraković S: *Primijenjena mikrobiologija*. Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.

Duraković S: *Toksični i kancerogeni metaboliti gljiva u namirnicama i krmivima*. Hrana i ishrana, Zagreb, 1989.

Food Microbiologee - slika bakterije vrste *Staphylococcus aureus* na Baird Parker agaru:

http://foodmicrobiologee.blogspot.com/2012_08_01_archive.html (18.07.2014.)

Freeimages – slika bakterije vrste *Escherichia coli* na Endo agaru:

<http://www.freeimages.com/photo/1018465> (18.07.2014.)

Fundacionio - mikroskopska slika bakterije vrste *Staphylococcus aureus*:

http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html

(18.07.2014.)

Indian Journal of Dermatology - mikroskopska slika plijesni roda *Fusarium*:

<http://www.eijd.org/article.asp?issn=00195154;year=2013;volume=58;issue=3;spage=241;epage=241;aulast=Kudur> (10.07.2014.)

Jakobek L: *Ambalaža i pakiranje hrane*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.

Janeš K: *Rast Trametes versicolor u uvjetima submerznog uzgoja*. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.

Kalenić S, Mlinarić-Missoni E: *Medicinska bakteriologija i mikologija*. Zagreb, 1995.

Kanceljak-Macan B: *Alergije - rastući zdravstveni problem*. Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, 2005.

Katalenić M: *Limenke kroz stoljeća*. 2004.

http://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fhrcak.srce.hr%2Ffile%2F40687&ei=nzmkU9_9B_TG7Abo4oFI&usq=AFQjCNEkoiXR9QPgljigrzLAHyTKY-an7w&bvm=bv.69411363,d.ZGU

(27.6.2014.)

Marriott, N.G, Gravani, R. B: *Principles of Food Sanitation*, Springer, USA, 2006.

Moldlab - mikroskopska slika plijesni roda *Aspergillus*:

http://www.moldlab.com/wp_moldlab/garlic-and-aspergillus-niger/ (16.07.2014.)

Muntonola M, Cvetković: *Opšta mikologija*. NIRO Književne novine, Beograd, 1987.

Microfungi - mikroskopska slika plijesni roda *Botrytis*: <http://microfungi.mnhn.fr/joelle.html>

(10.07.2014.)

Mycota - crtež plijesni roda *Fusarium*: [http://mycota-](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=20&n=Fusarium)

[crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=20&n=Fusarium](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=20&n=Fusarium) (10.07.2014.)

Mycota - mikroskopska slika plijesni roda *Cladosporium*: [http://mycota-](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=102)

[crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=102](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=102) (10.07.2014.)

Mycota - crtež plijesni roda *Mucor*: [http://mycota-](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=48&n=Mucor)

[crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=48&n=Mucor](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=48&n=Mucor) (10.07.2014.)

Mycota - crtež plijesni roda *Trichoderma*: [http://mycota-](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=43&n=Trichoderma)

[crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=43&n=Trichoderma](http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=43&n=Trichoderma) (10.07.2014.)

- Nujić M: *Antifungalni učinak eteričnih ulja Cinnamomum cassia, Litsea cubeba i timola na odabrane plijesni roda Penicillium*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Pinter LJ: *Opća mikrobiologija*. Veterinarski fakultet, Zagreb, 2010.
- Plantasy hongos - crtež plijesni roda *Cladosporium*:
http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Cladosporium_sphaerospermum.htm
(10.07.2014.)
- Plantasy hongos - crtež plijesni roda *Penicillium*:
<http://www.plantasyhongos.es/hongos/Penicillium.htm> (16.07.2014.)
- Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and Food Spoilage*. Springer, New York, 2009.
- Sabolić P: *Istraživanje fungicidnih spojeva za zaštitu jestivih gljiva od bolesti zelene plijesni*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2012.
- Sfappeal - mikroskopska slika bakterije vrste *Escherichia coli*:
<http://sfappeal.com/2013/11/local-food-distributor-might-be-behind-e-coli-outbreak-at-trader-joes/> (18.07.2014.)
- Sperber M i Doyle M: *Compendium of Microbiological Spoilage of foods and Beverages*. Springer, New York, 2009.
- Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klapac T: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Grafika d.o.o., Osijek, 2010.
- Šarkanj B, Klapac T: *Opasnosti vezane uz hranu: Kemijske i fizikalne opasnosti*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Škrinjar M, Tešanović D: *Hrana u ugostiteljstvu i njeno čuvanje*. Prirodno matematički fakultet, Novi Sad, 2007.
- Tolweb - mikroskopska slika plijesni roda *Mucor*: <http://tolweb.org/Mucorales/103792>
(10.07.2014.)
- Thunderhouse - kvasac roda *Candida albicans* na Sabouraud dekstroznom agaru:
<http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2009/12/candida-albicans.html> (10.07.2014.)
- Vrsalović-Presečki A.: *Studij proces pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca*. Magistarski rad, Zagreb, 2003.
- Vuković , Galić K, Vereš M: *Ambalaža*. Tectus, Zagreb, 2007.