

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL  
Keemia ja biotehnoloogia instituut

# **PALA PETFOODS KOERATOIDUS MIKROOBSE KVALITEEDI MÄÄRAMINE SÄILITAMISEL**

Bakalaureusetöö

Autor: Kerit-Lii Joason

Juhendaja: Inga Sarand

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia

TALLINN  
2023

## Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Kerit-Lii Joason

30.05.2023

.....

(allkiri ja kuupäev)

Üliõpilase kood: 206546LAAB

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele:

Juhendaja: Inga Sarand

30.05.2023

.....

(allkiri ja kuupäev)

Kaitsmisele lubatud "....." ..... 2023.a.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Katrin Laos

.....

TALLINN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY  
Department of chemistry and biotechnology

# **DETERMINATION OF MICROBIOLOGICAL QUALITY DURING STORAGE IN PALA PETFOODS DOG FOOD**

Bachelor thesis

Üliõpilane: Kerit-Lii Joason

Juhendaja: Inga Sarand

Õppekava: Applied chemistry and gene technology

TALLINN

2023

# SISUKORD

<b>ANNOTATSIOON</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID</b> .....	7
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	8
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	9
1.1 Koeratoidud .....	9
1.2 Mikrobioloogilised ohud ja kvaliteet .....	9
1.2.1 <i>Mikroorganismid ja hallitused koeratoidus</i> .....	10
1.2.2 <i>Seadlusandlus</i> .....	12
1.3 Koeratoidu mikrobioloogilist ohutust määravad faktorid .....	12
1.3.1 <i>Niiskussisaldus</i> .....	12
1.3.2 <i>Vee aktiivsus</i> .....	13
1.3.3 <i>Temperatuur</i> .....	13
1.3.4 <i>pH ja tiitritav happesus</i> .....	13
1.4 Pala petfoods koeratoit .....	14
<b>2. EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	15
2.1 Materjalid.....	15
2.2 Proovi ettevalmistamine.....	15
2.2.1 <i>Mikrobioloogiline analüüs</i> .....	15
2.2.2 <i>pH ja tiitritava happesuse mõõtmine</i> .....	16
2.2.3 <i>Bakterite, hallituste ja pärmide identifitseerimine</i> .....	16
2.3 Tulemused ja arutelu .....	17
2.3.1 <i>Koeratoidu mikroobse arvukuse muutus säilitamisel</i> .....	17
2.3.2 <i>Koeratoidus leiduvate mikroorganismide Identifitseerimine</i> .....	20
2.3.3 <i>Koeratoidu pH ja tiitritava happesuse muutus säilitamisel</i> .....	25
2.4 Järeldused .....	27
<b>3. KOKKUVÕTE</b> .....	28
<b>SUMMARY</b> .....	30
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	31
<b>LISAD</b> .....	
LISA 1. Katseskeem .....	
LISA 2. Lihtlitsents.....	

## ANNOTATSIOON

Töö eesmärgiks oli määrata koeratoidu mikroobse kvaliteedi muutust toatemperatuuril säilitamisel. Idee tekkis, kuna koeratoidu tootmisettevõttest Pala Petfoods tuli teateid, et vahetevahel läheb toit hallitama. Töös määrati igakuiselt hallituste ja pärmseente arvukus suletud või taassuletud pakkides kuni säilivusaja lõpuni, milleks oli kolm ja pool kuud. Lisaks määrati mesofiilsete bakterite üldarvukus värskelt pakitud ja säilivusaja lõppu jõudnud toodetes. Igal katsepäeval määrati ka toote pH ning tiitritav happesus. Tulemuseks leiti, et uuritud partiides ei lähe koeratoit hallitama toatemperatuuril hoides seda suletuna või taassuletuna kaitstult otsese päikesevalguse eest. Samuti leiti, et bakterite mitmekesisus väheneb võrreldes just valmistatud toitu kolm ja pool kuud seisnud toiduga. pH muutus oli langevas trendis säilivusaja vältel, kuid TTA tõusis seoses ettevalmistamisajaga ning toidu leotamisel vees, TTA puhul ei märgatud muutust seoses säilivusajaga.

Töö koosneb kirjanduse ülevaatest, kus seletatakse täpsemalt, kuidas lemmikloomatoitu valmistatakse ning võrreldakse varasemate uuringute tulemusi. Töö eksperimentaalsest osast, kus tuuakse välja konkreetse retsepti koostis, kirjeldatakse lähemalt töös läbiviidud katseid, esitatakse tulemused ja järeldused.

Töö koosneb 35 leheküljest, 7 tabelist ja 2 lisast.

## ABSTRACT

The pet food production volumes are in the increasing trend worldwide. Also more attention is paid on the quality of pet foods including safety and nutritional values. The latter includes pet foods, which are less processed, preserve natural components (e.g. vitamins) and contains less preservatives. These should not compromise the safety of food, especially biological safety including pathogenic bacteria (mainly *Salmonella* and *Listeria*) but also mycotoxins produced by molds (e.g. representatives of *Aspergillus* and *Penicillium*).

The aim of the work was to determine the change in the microbial quality of Pala Petfoods dog food recipe number 3 (beef, salmon and vegetables) during storage at room temperature. The problem arose because there were reports from the food processing company Pala Petfoods that occasionally the food went moldy. In current work, the number of molds and yeasts was determined monthly in sealed or resealed packages until the end of the shelf life, which was three and a half months. In addition, the total number of mesophilic bacteria in freshly packed and expired products was determined. The product pH and titratable acidity were also determined on each test day. As a result, it was found that in the studied batch food does not go moldy when kept closed or resealed at room temperature protected from the direct sun. It was also found that the diversity of bacteria decreases in food that has been preserved for three and half months compared to freshly prepared food. The pH rather decreased during the storage period, and the titratable acidity increased only when the food sample was soaked in water.

The work consists of a literature review, which explains in more detail how pet food is prepared and compares the results of previous studies. In the experimental part of the work, the composition of a specific recipe is presented, the experiments carried out in the work are described in more detail, the results and conclusions are presented.

The work consists of 35 pages, 7 tables and 2 appendices.

## KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID

RPM – revolutions per minute (inglise keeles), pöördeid minutis

Pmü - pesa moodustav ühik (cfu- colony forming unit (inglise keeles))

N/D - not determined (inglise keeles), ei ole määratud

SD - standard deviation (inglise keeles), standardhälve

N - normality (inglise keeles), normaalsus, (mol/L)

TTA - total titratable acidity (inglise keeles), tiitritav happesus

Spp - species in the plural form (inglise keeles), nimetus perekonna järel, mis viitab rohkem kui ühele nimeta liigile.

## SISSEJUHATUS

Lemmikloomade arv on viimasel ajal kasvutrendis eriti alates COVID epideemiast, kus võeti endale rohkem koduloomi, kuna inimesed ise olid rohkem kodus. Tänu sellele on hakatud ostma ka rohkem koeratoitu ning igasugune „superpremium“ ning värske või kergelt töödeldud koeratoit on muutunud eriti populaarseks. Maailmas on koeratoidu müük tõusnud võrreldes koroonaaegse ajaga ning prognooside kohaselt on see kasvamas veelgi (US Pet Market Focus et al., 2021).

Antud töös uuritud Pala Petfoods koeratoit on valmistatud Eesti esimese ettevõtte poolt, kes töötab kröbinade kujul tootoidu. Tegu on toiduga, mille niiskustase on alla 14% ehk siis koerte kuivtoit (FEDIAF et al., 2018), kuid erinevalt tavalisest kuivtoidust valmistatakse seda madalamatel temperatuuridel pikka aega kuivatades. Toortoidu kröbinad on suurepärane alternatiiv, sest erinevalt teistest koera kuivtoitudest, kuhu on vitamiine ja mineraalaineid toidu balanseerimiseks lisatud (UK Pet food et al, 2022), säilivad Pala Petfoods koeratoidus toorainetele omased valgud, rasvhapped, vitamiinid ning mineraalained paremini just tänu madalale valmistamistemperatuurile (Palapetfoods et al., 2021).

Koeratoit peab olema ohutu, sest lisaks looma tervisele on vaateväljas ka loomaomaniku tervis, kuna osad patogeenid võivad kanduda loomalt inimesele, ehk olla zoonoosid. Lisaks patogeenidele võivad bioloogilistest ohtudest koera tervist mõjutada negatiivselt ka mükotoksiinid, mis on toodetud hallitusseente poolt. Uurimistöötajate valiti seetõttu, et koeratoidu ostjatelt tuli tagasiside, et toit läheb mõnikord hallitama. Antud töö eesmärk oli uurida, kas ja millal läheb toit hallitama ning millised hallitused toidus kasvavad. Toitu uuriti igakuiselt kolme ja poole kuu jooksul kuni toidu pakendile märgitud säilivusaja lõpuni. Lisaks jälgiti, kuidas mõjub pakendi avamine ja taas sulgemine edaspidisele toidu mikroobsele kvaliteedile säilitamisel toatemperatuuril. Uurimiseks võeti Pala Petfoods koeratoidu retsept number 3, mille peamiseks koostisosadeks on veiseliha, lõhe ning juurviljad.

Töö teoreetilises osas räägitakse täpsemalt Pala Petfoods koeratoidu valmistamisest. Käsitletakse hallituste ja teiste mikroorganismide esinemist koerte (ja kasside) kuivtoidus. Töö eksperimentaalses osas tuuakse välja konkreetse retsepti koostis ning seletatakse lähemalt katse meetodeid ja tulemusi.



# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Koeratoidud

Koeratoit koosneb tavaliselt mitmest koostisosast, mis on grupeeritud kuueks suuremaks klassiks: vesi, valgud, rasvad, süsivesikud, vitamiinid ja mineraalained. Et tagada koerale õige toitainete tasakaal segatakse lemmikloomatoidu tööstuses koeratoidu sisse tavaliselt liha ja kala, juur-, köögi- ja puuvilju, teravilju, vitamiine ja mineraalaineid. Koeraomanikud, kes söödavad oma koera täisväärtusliku kaubandusliku koeratoituga, võivad olla kindlad, et rahuldavad oma lemmiku toitumisvajadused (UK Pet food 2022).

Koeratoidu ettevõtted edendavad pidevalt koostisosade ja valmistoodete ohutust. Nende ohutusprogrammid on suunatud tulevikku ja seal tuleb kinni pidada rangetest testimisprotokollidest *Salmonella* ja teiste kahjulike bakterite erinemise suhtes nulltolerantsiga pidevalt kogu tootmisprotsessi käigus, et tagada võimalikult ohutu toit. Ohutu toidu tootmiseks on lihtsad meetmed. Esiteks on parim viis hankida tooraine kohalikult usaldusväärset tootjalt vältides nii tooraine kauaaegset kohaletoimetamist ning selle käigus saastumist. Teiseks tuleb kogu tootmise käigus rangelt jälgida hügieeni ning inspekteerida ja testida tooraineid nii kohale toimetamisel kui ka toidu partii tegemisel. Kolmandaks tuleb viia läbi kontrollid ka pakendamisel ning turustamisel, et vältida katkiste või aegunud toodete poelettidel müümist (Pet food institute et al., 2023).

Koeratoitu ostes tuleb veenduda, et pakend on puhas, ei ole rebenenud ega purunenud. Pakendit tuleb säilitada viisil, mis sarnaneb inimtoidu säilitamisele. Kröbinat pakendamine taassuletavatesse kottidesse võimaldab vähendada saastumist õhu kaudu. Samas paki avamine muudab selle mikroobset koostist, gaasikeskkonna muutuste tõttu. Avamata märga ja kuiva toitu tuleb hoida vastavalt pakendile märgitud temperatuurile, tavaliselt jahedas ning kindlasti kuivas kohas. Kotti ei ole soovitatav jätta näiteks garaaži või õue. Säilitusmahutites toitu hoides, tuleb anumaid pesta ja kuivatada iga toidukoti vahel ning kontrollida kahjustusi ja putukate aktiivsust. Võimalusel tuleks siiski hoida toitu originaalkotis ning kaanega plast- või metallkastis. Säilitamisel tuleb jälgida tavapäraseid toiduhügieeni tavasid, et tagada kogu leibkonnaliikmete ohutus. Köögis toiduga tegeledes tuleb alati puhastada käed, tööpinnad ning toidunõud (Pet food institute et al. 2023).

Koeratoidud jagunevad niiskussisalduse alusel: märgtoit, kus niiskussisaldus on 60% või rohkem, sinna alla kuuluvad konservtoidud ja toortoit; poolmärgtoit, kus niiskussisaldus on vahemikus 14-60%; kuivtoit, kus niiskussisaldus on alla 14%, sinna alla kuuluvad kuivtoidud ehk kröbinad (FEDIAF et al., 2018).

## 1.2 Mikrobioloogilised ohud ja kvaliteet

Koeratoidu mikrobioloogiline koostis sõltub peamiselt koostiscomponentide mikrobioloogilisest kvaliteedist. Kuid mikroobne saastumine võib toimuda ka tootmisüksuse ruumides puudulike

hügieeninõuete tõttu. Pakendatud toidus võib mikroorganismide arvukus tõusta ja selle osade proportsioon muutuda säilitamise käigus. Mikroobse saastumise põhjuseks võivad olla nii toormaterjali saastumine, toidu valesti töötlemine, pakendamine, transportimine kui ka säilitamine. Esimesel puhul võib olla toormaterjal saastunud või vanaks läinud juba enne, kui see jõuab toidu tootmisettevõttesse ja kui toormaterjali ei kontrollita enne tootmist, siis jääb saaste tootesse ja toit läheb halvaks enne “parim enne” või “kõlblik kuni” tähtaega (Hanson et al., 2022).

Koeratoit võib sisaldada nii baktereid, pärme kui ka hallitusseeni. Osad bakterid on patogeensed ja isegi zoonoosid, ehk saavad kanduda loomalt inimesele ja põhjustada loomaomanikule haigestumist (Hanson et al., 2022). Patogeensed bakterid lemmikloomadel võivad põhjustada kõhulahtisust, palavikku, oksendamist, krampe ja muid haiguslikke seisundeid. Roisubakterid võivad toidus esinedes muuta toidu sensoorseid omadusi tootes näiteks hapet, tekitades ebameeldiva lõhnaga gaase, muutes toidu värvust, tekitades toidu peale või sisse lima või limakihte või muutes toidu struktuuri (Hanson et al., 2022).

Inaktiveeritud pärme lisatakse koeratoitu, et tagada toidu funktsionaalsus ja parem maitse (Bahrii et al., 2021). Siiski suures koguses süsivesikute- ja suhkruterikas dieet võib nõrgenenud immuunsusega või allergilistel koertel esile kutsuda pärmiseene infektsiooni, kui toidu hoiustamise keskkond on pärmseente kasvuks sobivalt soe ja niiske. Haigust võivad loomas esile kutsuda ka teised tingimused nagu näiteks suits, õietolm, hallituste esinemine, erinevad ravimid ja stress. Haigustunnusteks on tihti sügelev nahk, naha ärritus ja põletik, kõrva probleemid ja tihe pea raputamine (Brady et al., 2022).

Mikroobide arvukus ja liigirikkus koeratoitudes võivad varieeruda suurtes piirides. Liibanonis läbi viidud uuringus, kus analüüsiti mikrobioloogilist saastust, võrreldi kassi- ja koeratoidu konserve ja kuivtoite. Katse viidi läbi 165 kaubamärgiga, kus kuivtoite oli 66. Eesmärgiks oli erinevate mikrobioloogiliste saastajate tuvastamine. Selleks analüüsiti bakterite üldarvukust, *Enterobacteriaceae* liikidesse kuuluvate bakterite arvukust, pärme ja hallitusi ning *Salmonella* ja *Listeria* olemasolu. Kokkuvõtteks leiti, et kuivtoidus oli saastus suurem kui konservtoitudes. Mis puudutab Euroopa Komisjoni määrustele mittevastavust, siis 165 kaubamärgist üheteistkümnel (ehk 7%) oli aeroobsete mikroobide üldarv üle  $10^6$  pmü/g ja 27 (ehk 16%) ületas kolm korda  $10^2$  pmü/g, mis on *Enterobacteriaceae* maksimumpiir koeratoidus. Kuivade kaubamärkide hulgas oli kaheksal 66-st (ehk 12%) pärmi- ja hallitusseente saastatuse tase üle  $10^4$  pmü/g. *Salmonella* spp. tuvastati 68-l (ehk 41%) ja *Listeria* spp. 106-l (ehk 64%) kaubamärgil. See uuring aitab kaasa andmebaasi loomisele ja teadmiste arendamisele lemmikloomatoidu võimaliku saastumise kohta ülalnimetatud mikroorganismidega (Serhan et al., 2022).

### **1.2.1 Mikroorganismid ja hallitused koeratoidus**

Kõige tihedamini ja tõenäolisemalt satub toidu sisse suurimaks ohuks olev *Salmonella* just toorest valgurikkast toormest, seetõttu valmistatakse kuivtoitu töödeldes ja kuivatades seda temperatuuril 80-160°C (Kazimierska et al., 2021). FEDIAF, mis on Euroopa lemmikloomatoidu tööstust reguleeriv ja neile reegleid seadev organisatsioon, on välja toonud erinevad bioloogilised, keemilised- ja füüsilised riskid, mis võivad toidu sisse sattuda. Vaadates lähemalt bioloogilisi

saasteid, mille alla kuulub ka mikrobioloogiline saaste, näeb, et toorest materjalist võivad toidu sisse sattuda tabelis 1 toodud mikroorganismid:

**Tabel 1. Mikroorganismid, kuidas võivad toidu sisse sattuda**

Mikroorganism	Võimalik saastumise keskkond
<i>Aeromonas</i>	Reostunud vesi
<i>Campylobakter</i>	Linnu- ja veiseliha
<i>Clostridium perfringens</i>	Loomade soolestik
<i>Clostridium botulinum</i>	Reostunud vesi, madala hapnikuga keskkond
<i>Enterobacteriaceae</i> sugukond	Toores liha (loomade soolestik), pinnas
<i>Listeria monocytogenes</i>	Taimed, reostunud vesi, linnu- ja veiseliha
<i>Escherichia coli</i>	Soojavereliste loomade (kalad, linnud) soolestik
<i>Salmonella</i>	Toores liha, muna, kala, puu- ja juurviljad
pärmseened ja hallitused	Kuiv töötlemata toore nagu teraviljad ja puuning köögiviljad, mida hoitakse liiga kõrge niiskusesisalduse ja vee aktiivsusega keskkonnas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pinnas (võib kanduda köögi- ja juurviljadele) ning soojavereliste loomade veri

Bakterite, pärmide ja hallituste esinemise ja paljunemise riskid suurenevad toidu seistes, kuid madal vee aktiivsus hoiab need riskid väiksena. Toidu kuumtöötlemine tapab enamiku bakteritest, kuid osade bakterite toodetavad toksiinid on temperatuuriresistentsed (näiteks *Staphylococcus aureus* toodetud) ehk jäävad ka pärast kuumtöötlemist produkti sisse alles (FEDIAF ET AL., 2018).

Uuringud näitavad, et teravilja sisaldavates koera kuivtoitudes leitakse tihedamini pärme ja hallitusi, mis võivad esineda just seetõttu, et teraviljad on enne töötlemist juba hallitusega saastunud, kui neid on hoitud mittevastavates tingimustes (Kazimierska et al., 2021). Hallitused toodavad mükotoksiine ning need on loomade tervisele ohtlikud. Teraviljades võib esineda aflatoksiin B ja lihas, organites ning liha kõrvalproduktides ohratoksiini A *Aspergillus spp* ja *Penicillium spp* poolt toodetud. Aflatoksiin on koertele väga mürgine ning 0.5-1 mg/kg koera kehakaalu kohta võib olla surmav. Okratoksiin on noorkoertele surmav juba 0.3 mg/kg kehakaalu kohta. Tüüpiliselt toob mükotoksiinide esinemine koeratoidus ja selle tarbimine kaasa lemmikloomale oksendamist, ülemäärast janu tunnet, liigset urineerimist ja maksapõletikku (Leung et al., 2006).

Hallitused ja teised mikroorganismid võivad toidus kasvada ka juhul, kui toidu töötlemine toimub pikaajaliselt, kuid madala temperatuuril (alla 90°C), näiteks küpsetamise või ekstrusiooniprotsessil (FEDIAF et al., 2018).

## **1.2.2 Seadlusandlus**

Euroopa Komisjoni määrus on kehtestanud kontrolli lemmiklooma toidu puhul ainult *Salmonella* tuvastamise ja *enterobacterite* arvukuse määramise üle. Selle kohaselt peab koeratoidu materjaliproovides puuduma *Salmonella* viies 25 grammises analüüsitavas proovis ning *enterobacter*-ite hulk võib olla viiest proovist kahes ühe grammises proovis maksimaalselt 300 pmü/g. Euroopa Komisjoni määrus ei sätesta piire bakterite üldarvukusele (EU nr 142/2011 XIII LISA, II peatükk, 2. punkt et al., 2011). Piirmäärasid hallituste ning toksiinide kohta ei ole Euroopa Komisjon samuti paika pannud, kuid nende poolt on soovituslikud piirid, millest alla poole võiksid toksiinid jääda. Ohtratoksiin A peaks kasside- ja koertetoidus olema kuni 0.01mg/kg toidu kohta, mille niiskussisaldus on 12% (EU 2016/1319/EC et al., 2016). Aflatoksiin B tase peaks jääma alla 0.01mg/kg toidu kohta koduloomade toidus, mille niiskussisaldus on 12% (EU 2003/100/EC et al., 2003).

Lubatud mikroorganismide piirmäärad on maailma top viie sisse kuuluva integreeritud tervishoiu süsteemi Alberta Health Service (Alberta Health Service et al., 2018) poolt paika pandud nii, et esimese kategooria toitude, kuhu all kuuluvad töödeldud liha, kala ja valmistoidud, puhul on rahuldavaks tulemuseks  $<10^4$  pmü/g, kriitiline tulemus on  $<10^5$  pmü/g ja mitterahuldavaks loetakse  $\geq 10^5$  pmü/g. Tulemused kehtivad bakterite üldarvukuse määramise meetodi analüüsidele. Indikaatororganismide kohta käivad tulemused on veidi teised. Indikaatororganismideks on esiteks *Enterobacteriaceae*, mille rahuldavaks tulemuseks on  $<100$  pmü/g, kriitiliseks tulemuseks  $<10^4$  pmü/g ning mitterahuldavaks tulemuseks on  $\geq 10^4$  pmü/g; teiseks on *Escherichia coli*, mille rahuldavaks tulemuseks on  $<10$  pmü/g, kriitiliseks on  $<100$  pmü/g ja mitterahuldavaks on  $\geq 100$  pmü/g. Andmed ei ole täielikult reguleeritud, kuid need on piirmäärad, mida võiks tööstustes jälgida (Alberta Health Service et al., 2022).

## **1.3 Koeratoidu mikrobioloogilist ohutust määravad faktorid**

### **1.3.1 Niiskussisaldus**

Koertekuivtoiduks loetakse töödeldud toitu, mille niiskussisaldus jääb alla 14%. Poolmärjatoidu puhul on niiskustase vahemikus 14 kuni 60% ning märgtoidu puhul on niiskustase üle 60% (FEDIAF et al., 2018).

Kuivtoidus võib alata mikrobioloogiline kasv tingituna niiskustasemest ning vee aktiivsusest. Seetõttu tuleb vältida vee kondensatsiooni toidus. Kui aga valmistada koeratoidu valedel

tingimustel, näiteks liiga suure niiskuse taseme juures, jättes selle lõppniiskustaseme üle 10%, võivad sobiva temperatuuri juures hakata kasvama hallitused (Kerns et al., 2021).

### **1.3.2 Vee aktiivsus**

Vee aktiivsus ehk  $a_w$  näitab toidu kohal oleva veeauru osarõhu ja puhta veeauru rõhu suhet samal temperatuuril. See ennustab, kas vesi liigub toiduainest tõenäoliselt esineda võivate mikroorganismide rakkudesse. Puhta vee vee aktiivsus on 1. Üldiselt on toore liha ning toretes köögiviljades vee aktiivsus 0.99. Vee aktiivsuse alandamisega väheneb ka erinevatele mikroorganismidele sobiv elukeskkond. Tavaliselt kasvavad mikroorganismid vee aktiivsuse vahemikus 0.75-0.99. Osad hallitused suudavad kasvada juba alates vee aktiivsuse tasemest 0.60, kuid mükotoksiine hakkavad tootma üldiselt alates vee aktiivsuse tasemest 0.83. Et seda kõike vältida, tuleks vee aktiivsust alandada alla 0.60. Selleks kasutatakse erinevaid viise. Kuivatamise käigus aneab vee aktiivsus füüsiliselt vee eemaldamisega. Soola või suhkruga lisamine seob vaba vett. Külmutamisel langeb vee aktiivsus langeb tänu vee muutumisele tahkeks jääks. Erinevaid viise võib omavahel ka kombineerida (Mabitoba et al., 2023).

### **1.3.3 Temperatuur**

Enamike mikroorganismide jaoks jääb kasvamise temperatuurivahemik 5°C ja 60°C vahele. Termilisel töötusel sisetemperatuurini 74°C on toidu valmistamisele tugev efekt, sest selle käigus hävitatakse enamik mikroorganismid toidus (Hanson et al., 2022). Siiski üle 100°C temperatuur lühikest aega alles suudab tappa mikroorganismid ja ka nende spoorid ning kui hapniku tase on säilituskeskkonnas madal (0.05%), ei hakka seal üldiselt enam uuesti mikroorganismid kasvama (Santos et al., 2020).

Toitu tuleb hoiustada ehk pakendada, transportida ja säilitada õigetel tingimustel. Mikroorganismid kasvavad soojas kohas, kus on niiske. Kui hoida toitu näiteks plastikkarbis, et oleks lihtsam sealt koerale ette tõsta, võib karbi põhja koguneda niiskus, kui ruumi temperatuur on soe (üle 25°C) ja karbi kaas on üldiselt suletud. Kaant avades aga satub hapnik toidu pinnale ning soodustab mikroorganismide kasvu (Kerns et al., 2021). Koeratoidu tuleb hoiustada ka poe riiulitel õigetel temperatuuridel, kaitstult otsese päikese eest. Pakendi soojenemine seest soodustab hallituste tekkimist. Seetõttu on parem osta korraga väikemaid pakendeid, et toit ei jääks liiga kauaks seisma. Veel parem oleks neid osta või tellida oste tootjatelt tagamaks nende värskus (Kerns et al., 2021).

### **1.3.4 pH ja tiitritav happesus**

pH mõõdab lahuses vabade prootonite kontsentratsiooni. Need on vesinik+ ioonid, mis eralduvad happest dissotsieerudes. pH mõõtmine näitab lahuse happe tugevust ehk selle võimet alust neutraliseerida. Lahus on happeline, kui pH väärtus on väiksem seitsmest ning aluseline ehk leeliseline, kui pH väärtus on suurem seitsmest (Pratt et al., 2021).

Mikroorganismid on jagatud kolmeks optimaalse kasvu alusel olenevalt pH-st, esimesed kasvavad happelises keskkonnas alla pH 5, teised neutraalse pH lähedal 5 kuni 9 ning kolmandad aluselises keskkonnas üle pH väärtuse 9. pH muutus juba ühe ühiku võrra võib mõjutada mikroorganismide

metabolismi ning struktuure, modulleerides redoksreaktsioonide termodünaamikat ja kineetikat, mis omakorda mõjutab mikroorganismide kasvukiirust (Jin et al., 2018).

Värskes lihas peaks pH jääma vahemikku 5,5 kuni 6,2. Veiseliha puhul peaks pH täpsemalt olema 5,4 kuni 6,0 (Horiba Ltd et al., 2022).

Tiitritav happesus ehk TTA mõõdab lahuses hapete kogusummat ehk annab vabade prootonite ja dissotsieerumata neutronite summa. Siiski ei näita see kõiki lahuses sisalduvaid happeid, seega nimetatakse seda ligikaudseks üldhappesuse arvuks. Mõõtühikuks on g/L ehk mitu grammi happeid on ligikaudselt ühes liitris lahuses (Pratt et al., 2021)

## **1.4 Pala petfoods koeratoit**

Pala petfoods koeratoit on 100% looduslik, mis tähendab, et sinna pole lisatud sünteetilisi lisaaineid, värv- ega lõhnaaineid. Toidus sisaldub palju valke (keskmiselt 40-50g 100g kohta), koerale piisavalt vitamiine ja mineraalaineid, mis säilivad tänu minimaalsele töötlusele. Toitude retseptid on valminud koostöös Helsinki Ülikooli uurimisrühmaga DogRisk, kus pannakse rõhku just koerte toitumisele ja tervisele. Koostööd tehakse ka Tallinna Tehnikaülikooli ning TFTAK-iga, et olla kursis kõige uuemate ja paremate toidu valmistamise ning säilitamise võimalustega.

Kogu koeratoit valmistatakse ja pakendatakse nende oma tootmisüksuses. Iga nädal tellitakse uued liha ja kala külmutatud tooted, värsked puu-ja juurviljad. Retseptide valmistamiseks mõõdetakse kindlad kogused igat koostisosa ning kogu mass segatakse hakkmasinas kokku. Peenestatud segu kuivatatakse steriilses kuivatuskambris madalal temperatuuril 39°C juures, et liha ja kala valgud ei denatureeruks. Tänu sellele jäävad kõik ensüümid ja aminohapped toitu alles ka pärast toidu kuivatuskambrist välja võtmist ning pakendamist vakkumipakenditesse. Toitu säilitatakse kuni kolm ja pool kuud toatemperatuuril (Palapetfoods et al., 2021).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Materjalid

Analüüsimiseks kasutati Pala Petfoods koeratoidu retsepti number 3, mille koostises on 50% veiseliha, 30% lõhe ning ülejäänud osa moodustavad porgand, peet, seller, brokoli, pruunvetikas, purustatud munakoored, kurkum, mustikad, jõhvikad, petersell, lõheõli, nisuoras, must küüslauk, õllepärm ja must pipar (Palapetfoods et al., 2021).

Katseks võeti 15 100-grammist toidukotti, 12 kotti olid valmistatud 3.02.2022 ning aegumiskuupäev oli 17.05.2022, viimased kolm kotti olid valmistamiskuupäevaga 10.05.2022 ning aegumiskuupäevaga 24.08.2022. Neid säilitati toatemperatuuril ning määrati hallitus- ja pärmseente sisaldust nii kinnistes kui ka juba avatud ja taassuletud pakkides. Kuna toidu säilivus oli 3,5 kuud, sooviti teada, kuidas muutub hallituste ja pärmide arvukus selle aja jooksul.

### 2.2 Proovi ettevalmistamine

Proovideks kaaluti steriilselt 10g materjali Stomacheri kotti ning lisati autoklaavitud puhverdatud peptoonvesi vahekorras 1:10. Puhverdatud peptoonvesi valmistati NEOGEN firma valmissegust vastavalt instruksioonile ja autoklaaviti 15 minutit 121°C juures.

Koeratoidu proove homogeniseeriti Seward Stomacher 400 circulator-is 30 sekundit 230 RPM. Saadud suspensioonist valmistati 10 kordsete lahjenduste rida kasutades puhverdatud peptoonvett.

#### 2.2.1 Mikrobioloogiline analüüs

Pärmide ja hallituste määramiseks kasutati pindkülvle DRBC-le (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol, Biomaxima) ning MEA-le (Malt Extract Agar, VWR Chemicals BDH), viimasele lisati pärast autoklaavimist klooramfenikooli lõppkontsentratsioon 25 µL/mL.

Koeratoidu proove analüüsiti neljal korral alates valmistamisest kuni säilivusaja lõpuni. Katseskeem on toodud Lisas 1.

Esimene proovi analüüs teostati kohe pärast koeratoidu valmistamist ja pakendamist, seejärel 1 kuu möödudes, 2 kuu möödudes ning säilivusaja lõppedes (3,5 kuu möödudes). Igal katsepäeval avati kolm uut pakki ning lõpuks oli avatud 12 pakki. Iga kord välja arvatud esimene proovivõtt analüüsiti ka eelnevalt avatud ja taassuletud pakke koos just avatud pakkidega.

Vajalikest lahjendustest kanti pindkülvina MEA ja DRBC söötmetele 100 µL proovi. Söötmetega tase inkubeeriti 25°C juures. Kolooniaste kasvu kontrolliti 48 tunni kuni 5 päeva jooksul.

Bakterite üldarvukuse määramiseks, mida tehti ainult katse viimasel päeval kõigest 3,5 kuud seisnud proovidest ning kolmest uuest partii proovist, kasutati PCA (Plate Count Agar, Negroen Culture Media) söödet. Vajalikest lahjendustest kandi pindkülvinä 100 µL proovi söötmele ning tase inkubeeriti tagurpidises asendis 30°C juures 48 tundi.

Keskmi bakterite arvukust pakendis arvutati valmi järgi, mis annab kolooniat moodustavad ühikud ühes grammis proovis.  $N = C / [(n_1 + n_2) * d]$  (pmü/g), kus C on loendatud kolooniate arv;  $n_1$  on tasside arv, mis kuulus loendamisele esimeses lahjenduses;  $n_2$  on tasside arv, mis kuulus loendamisele teises lahjenduses; d on esimese lahjenduse lahjendusfaktor.

Standardhälve arvutati järgmise valemi järgi:  $SD = \sqrt{[(E \sum (x - m)^2) / n]}$ , kus E on hälvete summa, x on konkreetne väärtus, m on kõikide väärtuste aritmeetiline keskmine,  $(x - m)^2$  on konkreetse väärtuse hälve, n on väärtuste arv.

Mikrobioloogilise arvukuse erinevust PCA proovidelt kontrolliti excelis statistilise analüüsi Anova testi abil võrreldes igal kuul avatud pakside keskmisi ning nende keskmisi ka uue partiiga. Selleks kasutati „Anova: Singel Factor“ testi ning võrreldi saadud p-väärtusi. Kui p-väärtus oli väiksem kui 0.05, siis loeti proovid üksteisest eristuvateks.

### **2.2.2 pH ja tiitritava happesuse mõõtmine**

Igast toiduproovist mõõdeti pH. Selleks kaaluti 10 g proovi ning lisati sellele 90 mL destilleeritud vett ja homogeniseeriti Stomacheris. pH mõõdeti 40 mL-sest proovist kasutades pH-meetrit Seven Easy Mettler Toledo. Tiitritava happesuse mõõtmiseks kasutati büretti Titrette 20L82607 CE-M 20, selleks kasutati 40 mL proovi, millest oli mõõdetud pH ja tiitriti 0,1 N NaOH lahuega kuni pH 8,2-ni.

Koeratoidu tiitritav happesus arvutati valemist:  $TTA (\%) = [(titrandi\ kogus(g) * alkaali\ normaalsus(N) * lahustatud\ proovi\ algne\ maht(g) * happe\ ekvivalentmass(g) * 100) / (proovi\ kogus(g) * lahustatud\ proovi\ maht, mis\ võeti\ tiitrimiseks(mL) * 1000)]$  (Processing of Horticultural Crops et al., 2012), kus 100 on ülemineku tegur protsentidele ning 1000 on üleminekutegur liitrit milliliitriks. On leitud, et anaeroobne keskkond, mis inhibeerib aeroobsete roisubakterite kasvu, võib muuta piimahappe bakterid dominantseks liha mikroflooral, seega kui pakendada liha gaasivaesesse või vaakumkeskkonda, võivad seal hakata kasvama piimahappebakterid ja see võib toidule juurde tekitada hapu lõhna ja/või maitse (Egan et al., 1983). Seetõttu kasutatakse valemis piimahappe ekvivalentmassi, mis on 90.08 g (Dijkstra et al., 2016).

### **2.2.3 Bakterite, hallituste ja pärmide identifitseerimine**

Mikroorganismide identifitseerimine teostati mass-spektromeetriliselt, kasutades MALDI-TOF süsteemis Bruker raamatukogu versiooni võrdlemiseks. Viimasel katsepäeval võeti iga külvatud proovi kohta (1 proov = 1 kott, kokku 15 kotti) kuus kolooniat PCA tassilt ja teostati ümberkõlv samale söötmele, et saada üksikkolooniad. Sarnaselt teostati ümberkõlv kolooniatega, mis kasvasid MEA ja DRBC tassidel. Tasse inkubeeriti vastvalt 30°C või 25°C juures 48 tundi.



Mikroorganismide identifitseerimiseks MALDI-TOF abil lähtuti kommertsiaalsest juhendist. Lühidalt võeti igast kasvanud kolooniast hambatikuga väike kogus biomassi *target* plaadile ning lisati 0,25 µL 70%-list metaanhapet, mis lüüsis rakkude membraani. Kuivanud proovile lisati Matrixit (Whatman) ning seejärel viidi plaat mass-spektromeetrisse.

Usaldusväärse tulemuse puudumisel määrati bakterisolaate 16S rRNA geeni järjestuse baasil ning hallitus- ja pärmseeni ITS (internally transcribed spacer) piirkonna järjestuse baasil. DNA isoleeriti kasutades FTA paberit (Whatman) vastvalt instruksioonile. Selleks kasvatati proovid vastavas vedelas söötmes ja 30 µL kultuuri kanti FTA paberile. Kuivanud paberist lõigati piiritusega puhastatud lõikamisalusel välja spetsiaalse lõikajaga ringikujulised proovitükid ning asetati PCR-i ependorfi tuubidesse. Proovid pesti kaks korda 150 µL FTA Purification reagentga ja 150 µL TE puhvriga. Pärast pesu lasti proovidel 1 tund lahtises ependorffides toatemperatuuril kuivada.

Puhastatud DNA-d kasutati PCR reaktsioonides. PCR reaktsioon teostati ruumalal 25 µL ning sisaldas peale DNA ka kahte erinevat Mastermix-i (Whatman), vastavalt 16F27 ja 16R1522 praimereid või ITS1 ja ITS4 praimereid (1+1 µL), lisaks veel Hot FIREPol Blended Master Mix-i (Whatman) (5 µL) ja destilleeritud vett (16µL). Suletud ependorfid asetati PCR-i masinasse, mis oli programmeeritud vastavalt kolmele PCR-i etapile. Esimene etapp toimus temperatuuril 95°C, mille käigus DNA denatureerus ja kaheahelaline DNA muudeti üheaheelaliseks. Teine etapp toimus temperatuuril 55°C, mille käigus praimerid seondusid komplementaarsete aladega amplifitseeritavas DNA-s. Kolmas etapp toimus temperatuuril 72°C ja seal DNA polümeraas seondus DNA-praimeri kompleksiga ning lisas praimerjärjestuse kolm-prim-otsa uusi nukleotiide moodustades nii uue DNA ahela. Tsüklit korrati 30 korda.

Järgnevas analüüsi PCR produkte geelelektroforeesil. 1%-lise agarosgeeli valmistamistati TAE puhvris (koostis: tris-(hüdrosümetüül)aminometaan, äädikhape, EDTA-etüleendiamiintetraädikhape). PCR produktide suurust määrati võrdluses DNA suurusmarkeriga (1 Kb ladder).

Amplifitseeritud DNA puhastati PCR reaktsiooni komponentidest kasutades PCR clean-up kit-i (Whatman). Selleks lisati amplifitseeritud DNA proovile MP puhvrit, segati ja puhastati kasutades kolonni. Puhta DNA kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga 260 nm juures.

Proovid saadeti sekveneerimisele Eesti biokeskuse tuumiklaborisse Tartusse. Saadud järjestused analüüsi BLAST programmiga (NIH et al., 2022).

## **2.3 Tulemused ja arutelu**

### **2.3.1 Koeratoidu mikroobse arvukuse muutus säilitamisel**

Üheks aeg-ajalt esinevaks probleemiks Pala toortoidu kröbinatel on hallituste kasv. Antud katse käigus uuriti veiseliha-lõhe-juurviljade baasil valmistatud toortoidus hallituste arvukust. Selleks lähtuti standardist ISO 21527-1:2008 ning teostati väljakülve hallitsu- ja pärmseente spetsiifilisele DRBC söötmele. Paralleelselt teostati väljakülvide ka MEA söötmele, mis on üks levinumaid

söötmeid hallitus- ja pärmseente kasvatamiseks (Black et al., 2020). Värskest toodetud erinevate partiide koeratoidu proovides tuvastati DRBC söötmel 700-2500 pmü/g (Tabel 2). MEA söötmel saadud arvukus oli kõrgem ja jäi vahemikku 8050-38000 pmü/g (Tabel 2). Üheski väljakülvis ei tuvastatud hallituseentele omapärast kasvu. Esimese partii (parim enne 17.05.2022) väljakülvides kasvanud kõiki kolooniaid vaadeldi mikroskoobi all ja nähti ainult pärmidele omaseid rakke.

Üks, kaks ja kolm ja pool kuud seisnud koeratoidu proovides ei täheldatud mikroorganismide kasvu DRBC ja MEA söötmetel sõltumata sellest, kas pakk oli juba avatud ja taassuletud või avamata (Tabel 2). Sellest võib järeldada, et Pala Petfoods koeratoidu retsepti number 3 säilitamisel toatemperatuuril kolme ja poole kuu jooksul ei kasva toidus veel hallitusi, kuid algne pärmide arvukus on langenud alla detekteerimis piiri, milleks on <100 pmü/g.

Varasemalt uuritud töödes, kus on analüüsitud pärmseente esinemist ja kasvu toores ja töödeldud lihas, on leitud, et pärmide kasvukiirus alaneb ning arvukus väheneb säilivusajal vähese hapnikuga ning kõrge süsinikdioksiidiga keskkonnas toatemperatuuril või madalamal temperatuuril. Teisest küljest, kui tingimused on soodsad ehk näiteks hapniku juurdepääs on hea, siis see võimendab suuresti pärmseente kasvu. Kõige enam leitakse lihast ja lihatoodetest *Candida* perekonda kuuluvaid pärmseeni, sest nad on kõige vastupidavamad ning kohanemisvõimelisemad ka madalamatel temperatuuridel (Nielsen et al., 2008). Lisaks on leitud, et vaakumpakend ei oma väga erilist toimet pärmide kasvule võrreldes standardse kinnise mittevaakumpakendiga (Cabello-Olmo et al., 2020). Uurimuste käigus on välja tulnud, et hallituste kasvu prässimiseks on vaja mitme teguri koosmõju, sealhulgas võib välja tuua madala hapniku taseme, madala veeaktiivsuse, erinevad termilised kuumtöötlusmeetodid, säilitustemperatuuri (22°C või madalam) ja lisaks inhibeerivad hallituste kasvu ka antioksidandid ning orgaanilised happed toidus (Santos et al., 2019).

Kolmekuulise säilivuskatse viimasel proovivõtu päeval ja uue partii proovidele teostati väljakülvi ka PCA söötmele, et määrata üldine mesofiilsete bakterite arvukus. Kolm ja pool kuud säilinud koeratoidu proovides tuvastati  $1.2 \cdot 10^4$  kuni  $1.9 \cdot 10^6$  pmü/g. Uue partii proovidel tuvastati  $4.5 \cdot 10^7$  kuni  $9.8 \cdot 10^7$  pmü/g. Siit näeb, et arvukus on äsja valmistatud partiis suurem. Kuid ei saa ka välistada erinevate partiide algset mikrobioloogilise kvaliteeti.

**Tabel 2. Mikrobioloogiline arvukus – väärtused koos samade suurte tähtedega ei erine oluliselt (p-väärtus suurem kui 0.05).**

Proovi tähis	Sööde	Kuupäev			
		8.02.2022	15.03.2022	13.04.2022	18.05.2022
		pmü/g	pmü/g	pmü/g	pmü/g
A	DRBC	2000 <sup>A</sup>	<100	<100	<100
	MEA	8700 <sup>B</sup>	<100	<100	<100
	PCA	N/D	ND	ND	$1.2 \cdot 10^4$ <sup>D</sup>
B	DRBC	700 <sup>A</sup>	<100	<100	<100
	MEA	11000 <sup>B</sup>	<100	<100	<100
	PCA	N/D	ND	ND	$1.4 \cdot 10^4$ <sup>D</sup>
C	DRBC	2500 <sup>A</sup>	<100	<100	<100
	MEA	9400 <sup>B</sup>	<100	<100	<100

	PCA	N/D	N/D	N/D	$1.2 \cdot 10^{5D}$
D	DRBC	-	<100	<100	<100
	MEA	-	<100	<100	<100
	PCA	-	N/D	N/D	$2.4 \cdot 10^{5D}$
E	DRBC	-	0	0	<100
	MEA	-	0	0	<100
	PCA	-	N/D	N/D	$8.2 \cdot 10^{4D}$
F	DRBC	-	<100	<100	<100
	MEA	-	<100	<100	<100
	PCA	-	N/D	N/D	$1.3 \cdot 10^{5D}$
G	DRBC	-	-	<100	<100
	MEA	-	-	<100	<100
	PCA	-	-	N/D	$6.6 \cdot 10^{5D}$
H	DRBC	-	-	<100	<100
	MEA	-	-	<100	<100
	PCA	-	-	N/D	$1.1 \cdot 10^{5D}$
I	DRBC	-	-	<100	<100
	MEA	-	-	<100	<100
	PCA	-	-	N/D	$1.8 \cdot 10^{5D}$
J	DRBC	-	-	-	<100
	MEA	-	-	-	<100
	PCA	-	-	-	$9.7 \cdot 10^{4D}$
K	DRBC	-	-	-	<100
	MEA	-	-	-	<100
	PCA	-	-	-	$1.1 \cdot 10^{6D}$
L	DRBC	-	-	-	<100
	MEA	-	-	-	<100
	PCA	-	-	-	$1.9 \cdot 10^{6D}$
U1	DRBC	-	-	-	700 <sup>C</sup>
	MEA	-	-	-	8050 <sup>C</sup>
	PCA	-	-	-	$9.6 \cdot 10^{7E}$
U2	DRBC	-	-	-	800 <sup>C</sup>
	MEA	-	-	-	8950 <sup>C</sup>
	PCA	-	-	-	$4.5 \cdot 10^{7E}$
U3	DRBC	-	-	-	1200 <sup>C</sup>
	MEA	-	-	-	$3.8 \cdot 10^{4C}$
	PCA	-	-	-	$4.8 \cdot 10^{7E}$

Statistiline analüüs näitas, et kolm ja pool kuud seisnud proovide tulemused erinevad uue partii tulemustest, sest kasutades „Anova: Singel Factor“ testi excelis, tuli p-väärtus väiksem kui 0.05. Samas, kui kolm ja pool kuud seisnud proovid (A-L) olid avatud erinevatel aegadel kogu säilivuskatse vältel, siis nende vahel ei leitud statistilist erinevust. Proovide keskmised kolooniat moodustavad ühikud iga katse päeva kohta ning nendele vastavad standardhälbed on välja toodud tabelis 3.

**Tabel 3. Keskmise mikrobioloogiline arvukus ja standardhälbed – väärtused koos samade suurte tähtedega ei erine oluliselt (p-väärtus suurem kui 0.05)**

Proovi tähised	Sööde	Kuupäev			
		8.02.2022 pmü/g +SD	15.03.2022 pmü/g +SD	13.04.2022 pmü/g +SD	18.05.2022 pmü/g +SD
A+B+C	DRBC	$1.7 \cdot 10^3 \pm 7.6 \cdot 10^2$ <sup>F</sup>	<100	<100	<100
	MEA	$9.7 \cdot 10^3 \pm 9.6 \cdot 10^2$ <sup>F</sup>	<100	<100	<100
	PCA	N/D	N/D	N/D	$4.9 \cdot 10^4 \pm 5.0 \cdot 10^4$ <sup>G</sup>
D+E+F	DRBC	-	<100	<100	<100
	MEA	-	<100	<100	<100
	PCA	-	N/D	N/D	$1.5 \cdot 10^5 \pm 6.6 \cdot 10^4$ <sup>G</sup>
G+H+I	DRBC	-	-	<100	<100
	MEA	-	-	<100	<100
	PCA	-	-	N/D	$3.2 \cdot 10^5 \pm 2.4 \cdot 10^5$ <sup>G</sup>
J+K+L	DRBC	-	-	-	<100
	MEA	-	-	-	<100
	PCA	-	-	-	$1.0 \cdot 10^6 \pm 7.4 \cdot 10^5$ <sup>G</sup>
U1+U2+U3	DRBC	-	-	-	$9.0 \cdot 10^2 \pm 2.2 \cdot 10^2$ <sup>f</sup>
	MEA	-	-	-	$1.8 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^4$ <sup>F</sup>
	PCA	-	-	-	$6.2 \cdot 10^7 \pm 2.2 \cdot 10^7$ <sup>G</sup>

Tabelist 3 näeb, et kolm ja pool kuud seisnud ning uue partii proovide DRBC ning MEA söötmetel kasvanud mikroorganismide keskmine arvukus ei erine üksteisest, kuid uute proovide DRBC ja MEA söötmetel kasvanud mikroorganismide arvukus erineb üksteisest (tabelis väike ja suur f-täht). PCA söötmetel kasvanud mikroorganismide arvukus erineb kolm ja pool kuud seisnud pakkide keskmisest võrreldes uue partii pakkide keskmise tulemusiga.

### 2.3.2 Koeratoidus leiduvate mikroorganismide identifitseerimine

Euroopa komisjoni määrus näeb ette koeratoidus analüüsida *Salmonella* esinemist toiduproovis ning *enterobakterite* arvukuse määramist proovis. Katse käigus ei tuvastatud väljakasvanud kolooniate seast ühtegi *Salmonella* liiki kuuluvat bakterit, kuid see ei välista nimetatud bakteri esinemist koeratoidus. Et kinnitada nende mitteesinemine, oleks vajalik rikastussöötme inokuleerimine. Katse käigus leiti *enterobaktereid*, kuid ei mõõdetud nende arvukust, kuna eesmärgiks oli üldine mesofiilsete bakterite arvukuse mõõtmine (Tabel 2-3). Tabelis 4 on välja toodud isolaadid, mis identifitseeriti Bruker Maldi biotyper identification-i raamatukoguga. Osasid isolaate identifitseeriti 16s rRNA või ITS piirkonna järjestuse baasil, kuna neid ei õnnestunud identifitseerida MALDI-TOF meetodil.

**Tabel 4. Identifitseeritud mikroorganismid**

Sööde	Proovi tähis	Tulemus
DRBC	U1.1	<i>Pseudomonas spp</i> *
MEA	U1.3	<i>Filobasidium oeirenes</i> **
MEA	U1.5	<i>Pseudomonas fragi</i>
MEA	U1.6	<i>Candida krusei</i>
MEA	U2.1	<i>Acinetobakter baumannii</i>
MEA	U2.2	<i>Candida kefyr</i>
MEA	U2.3	<i>Acinetobakter baumannii</i>

DRBC	U2.4	<i>Saccharomyces spp**</i>
DRBC	U2.5	<i>Candida kefyr</i>
MEA	U3.1	<i>Pseudomonas spp*</i>
MEA	U3.2	<i>Candida zeylanoides</i>
DRBC	U3.4	<i>Acinetobacter baumannii*</i>
MEA	U3.3	<i>Candida kefyr</i>
MEA	U3.5	<i>Enterococcus durans</i>
PCA	U1.1	<i>Lactococcus garvieae</i>
PCA	U1.3	<i>Escherichia coli</i>
PCA	U1.4	<i>Carnobacterium divergens</i>
PCA	U1.5	<i>Staphylococcus sciuri</i>
PCA	U1.6	<i>Acinetobacter baumannii</i>
PCA	U2.2	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	U2.3	<i>Lactococcus garvieae</i>
PCA	U2.4	<i>Staphylococcus sciuri</i>
PCA	U2.5	<i>Staphylococcus sciuri</i>
PCA	U2.6	<i>Enterobacter cloacae</i>
PCA	U3.1	<i>Lactococcus garvieae</i>
PCA	U3.2	<i>Staphylococcus hominis</i>
PCA	U3.3	<i>Staphylococcus hominis</i>
PCA	U3.5	<i>Echerichia coli</i>
PCA	A1	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	A4	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	A5	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	A6	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	B1	<i>Bacillus subtilis</i>
PCA	C1	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	C3	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	C4	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	C5	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	D1	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	E1	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	E3	<i>Bacillus inaquosorum*</i>
PCA	F2	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	F3	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	F4	<i>Bacillus velezensis*</i>
PCA	F5	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	G2	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	G3	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	G4	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	G5	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	G6	<i>Bacillus megaterium</i>
PCA	H2	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	H3	<i>Enterococcus faecium</i>

PCA	H6	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	J1	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	J2	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	J3	<i>Bacillus spp*</i>
PCA	K1	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	K2	<i>Enterococcus faecium</i>
PCA	K3	<i>Enterococcus faecium</i>

\*-identifitseerimine 16s rRNA geeni järjestuse baasil

\*\*-identifitseerimine ITS järjestuse baasil

MEA ja DRBC söötmete isolaatidest identifitseeriti ainult uue partii proovidel kasvanud kolooniaid. Esimese partii DRBC ja MEA väljakülvidest saadud isolaadid vaadeldi mikroskoopiliselt. Mõlemates partiides domineerisid nendel söötmetel pärmseened. Uue partii identifitseeritud pärmseened kuulusid *Filobasidium oerines*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Saccharomyces spp* ja *Candida zeylanoides* liikidesse. Lisaks kasvasid MEA söötmetel ka *Pseudomonas fragi*, *Acinetobakter baumannii* ja *Enterococcus durans* liikidesse kuuluvad bakterid. MEA söötme selektiivsus bakterite vastu on klooramfenikool ja osadel bakteritel on tema vastu loomulik resistentsus (Vázquez-López et al., 2020; Fernández et al., 2012). Gramnegatiivsetel bakteritel esineb lipopolüsahariide sisaldav välismembraan, mis kaitseb neid keskkonna eest ning takistab selektiivselt antibiootikumide sisenemist läbi membraani (Silhavy et al., 2010).

*Filobasidium* on seente riiki kuuluv mikroorganism. Enamik liike kuulub pärmseente alla ning on imetejatele ohutud (Liu et al., 2015)

*Candida krusei* on pärmseen, kes omab oportunistlikku patogeensust ehk tekitab infektsioone üldiselt immuunpuudulikkusega patsientidel. Teda leidub kääritatud toiduainetes ja piimatoodetes, samuti kasutatakse teda ensüümide tootmiseks. *C. krusei* on resistente üldkasutatavatele seeneravimitele ja seetõttu kaheldakse tema ohutuses tööstlikult kasutamiseks (Yadav et al., 2012).

*Candida kefyr* on laktoosi fermenteeriv pärm, mis stimuleerib *Lactobacillus kefyri* kasvu, et koos sellega toota etanooli (Ramos et al., 2021). Neid on isoleeritud veest, taimedelt, puuviljadelt, loomadelt, mereveest, valmistoidust ning inimestelt (Belloch et al 2002). Sel ajal kui teda konkreetselt ei kasutata toidu tööstuses fermenteerimiseks, siis võib ta põhjustada toidu riknemist (Sessou et al., 2022).

*Saccharomyces* on pärmseente alla kuuluv perekond, keda kasutatakse üldiselt pagaritööstuses kergitajana ja keda tuntakse ka nime all õlle- või pagaripärm (Alsammar et al., 2020). Seda sama õllepärm kasutatakse ka selle retsepti (veiseliha ja lõhe) valmistamises, milles pärme uuriti.

*Candida zeylanoides* on inimesele patogeenne seen, tekitades koos *Candida kefyr*-i ja teiste pärmidega valge- ja sinihallitust juustule ning ka teistele toodetele (Desmaures et al., 2014). Väga suures hulgas ( $10^3$ - $10^7$  cfu/g) on *C. zeylanoides*-t uuringute käigus leitud purustatud veise-, lamba- ja linnulihast. Nad kasvavad madalatel temperatuuridel (alla 5°C), kuid liha soolamine, naatriumnitriti/nitraadi, vääveldioksiidi ja erinevate hapestajatega töötlemine pärsib mikroorganismide kasvu (Fleet et al., 2011).

*Pseudomonas fragi* on psührofiilne gram-negatiivne bakter, kes kasvab hästi temperatuuridel 2°C kuni 35°C ja vastutab aeroobselt säilitatava liha riknemise eest. Teda leidub taimses materjalis ja pinnases. Soodustab *Staphylococcus aureuse* ja *Lysteria monocytogenes*-i arengut ja kasvu (Chen et al., 2017).

*Acinetobakter baumannii* on aeroobne gramnegatiivne bastill, lisaks pleomorfne ning mitteliikuv oportunistlik patogeen, kes põhjustab infektsioone vaid nõrga või puuduliku immuunsusega patsientidele (Howards et al., 2012). Teda on leitud toorestelt puu- ja juurviljadelt, reostunud veest ning ka loomadelt. Nosokomiaalse patogeeni edule aitavad kaasa mitmed tegurid, sealhulgas selle võime kohaneda ebasoodsate keskkonnatingimustega, kuivamisresistentsus, multiresistentsus antibiootikumide suhtes ja genoomi plastilisus (Vázquez-López et al., 2020). Lisaks võib *A. baumannii* ellu jääda kokkupuutel regulaarselt kasutatavate desinfitseerimisvahenditega, nagu fenoolid ja kloorheksidiin, ning talub kuiva keskkonda (Ababneh et al., 2022).

*Enterococcus durans* on seedukulga grampositiivne bakter, kes põhjustab noorloomadel (põrsad, varsad, kutikad) enteriiti (viiruslik soolepõletik). Kuid seda bakterit ei seostata enterotoksiinide tootjana ning ta ei põhjusta teadaolevalt limaskestast olulist kahjustust (Schaer et al 2014). On leitud, et *E.durans*-i saaks kasutada ohutult potentsiaalse probiootikumina inimtoidus ja täiskasvanudloomasöötades (Li et al., 2018). Nad levivad saastunud toidu ja veega ning saavad kasvada ebasoodsates kasvutingimustes. Enim esineb neid fermenteeritud toitudes nagu juust, jogurt, fermenteeritud lihatooted nagu vorstid, kus nad saavad hästi paljuneda. Nad levivad ka looma väljaheitega ning seetõttu leidub neid peale toore liha (eriti looma organite) ka pinnases ning juur- ja köögiviljaadel. Tavalised tööstusprotsessid vähendavad nende arvu, kuid ei pruugi neid täielikult hävitada. Nad võivad biogeensete amiidide tootmise kaudu põhjustada toidumürgistust ning olla oportunistlike infektsioonide kaaspõhjustajateks, kuid nende esmase patogeenina tegutsemine on tänapäevani küsimärgi all (Giraffa et al., 2002).

Lisaks väljakülvidest, mis olid tehtud PCA söötmele uue partii proovidest identifitseeriti *Lactococcus garvieae*, *Escherichia coli*, *Carnobacterium divergens*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* ja *Staphylococcus hominis* liikidesse kuuluvad bakterid.

*Lactococcus garvieae* on grampositiivne fakultatiivne anaeroob, kes võib kasvada kuni 45°C juures ja pigem aluselises keskkonnas. Ta on kaladest ja molluskitest leitud bakter, kuid teda võib esineda ka reovees, looma- ja linnulihhas ning juurviljades. Nakatumine võib põhjustada erinevad viirushaigusi nii sooltes kui hingamisteedes (Rubi et al., 2018). Siiski tema zoonootiline tunnus on hetkel veel kaheldav (Gibello et al., 2016).

*Escherichia coli* on fakultatiivne gramnegatiivne anaeroob, elab tavaliselt terve inimese või looma soolestikus ilma seda kahjustamata, kuna enamik *E.coli* tüüpe on kahjutud. Toidud, kus võib bakterit esineda on toores- või vähetöödeldud veiseliha, pastöreeerimata piim ning värsked ja pesemata puu-, juur- ja köögiviljad (Mayoclinic et al., 2022). Mõned tüved, mis on patogeensed, võivad põhjustada tõsist toidumürgistust ning seetõttu nii soolesiseseid kui ka -väliseid infektsioone (Tenailon et al., 2010).

*Carnobacterium divergens* on grampositiivne bakter. Ta ei ole patogeenne inimesele, kuid võib põhjustada infektsioone kaladele. Teda leidub kalas, lihas ja osades piimatoodetes. Ta suudab kasvada madalatel temperatuuridel, anaeroobsetes ning isegi vaakumtingimustes. Siiski ei ole leitud, et ta põhjustaks toidu riknemist (Casaburi et al., 2011). On leitud, et *C. divergens* avaldab pärssivat mõju patogeensetele bakteritele nagu näiteks *Lysteria monocytogenes* (Brillet et al., 2005).

*Staphylococcus sciuri* on grampositiivne koagulaasnegatiivne, novobiotsiiniresistentne ning oksüdaaspositiivne patogeenne bakter. Teda esineb peamiselt kodu- ja metsloomade nahal ning limaskestadel, samuti loomsetes toiduainetes. Teadaolevalt võib teda leida ka keskkonnast, sealhulgas pinnasest, veest, liiva seest, rohu seest. Teda seostatakse südame ja kuseteede põletikega (Dakic et al., 2005).

*Enterobacter cloacae* on gramnegatiivne fakultatiivne anaeroob, tavaline imetaja mikrofloora bakter soolestikus, inimestele ja loomadele ei ole ohtlik patogeen. Siiski on ta oportunistlik ja multiresistente bakter (Davin-Regli et al., 2015).

*Staphylococcus hominis* on grampositiivne mesofiilne aeroobne bakter, keda leidub imetajate mikroflooras, tavaliselt ohutu, kuid võib mõjuda negatiivselt, kui esineb nõrk immuunsussüsteem. Bakteriga nakatumine võib toimuda tarbides toorest või vähe töödeldud veiseliha (Singh et al., 2019).

Väljakülvidest, mis olid tehtud PCA söötmetele kolme ja poole kuulise säilituskatse viimane proovivõtu päeval domineerisid *Enterococcus faecium* liiki kuuluvad bakterid. Üksikud bakterid kuulusid ka *Bacillus subtilis*, *Bacillus inaquosorum*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus megaterium* liikidesse ning *Bacillus spp* perekonda, nad on grampositiivsed mittepatogeensed bakterid, keda leidub pinnases, juurviljades ning mereandides (Martinez et al., 2013). Kuna esimese partii esimesel katsepäeval ei teostatud PCA söötmetele külve, ei ole teada nende proovide algne mikrobioloogiline mitmekesisus. Samas on kõik esindatud bakteri liigid grampositiivsed ning üldiselt on grampositiivsed bakterid ja nende spoorid vastupidavad pikka aega ekstreemsetele tingimistele tänu peptidoglükaani kihtidele rakkude ümber (Silhavy et al., 2010). Tänu millele võisid nad olla toidus juba algselt valmistades ning jääda kasvamisvõimeliseks kuni säilivusaja lõpuni.

*Enterococcus faecium* on grampositiivne kommensaalne bakter, elades inimese või looma seedetraktis, üldiselt tugeva immuunsusega inimesel/loomal ei põhjusta haigusi, kuid siiski on leitud, et ta võib põhjustada kuseteede ja südame infektsioone. Ta on resistentne mitmetele antibiootikumidele (Fiore et al., 2019), teda leidub toores lihas ning liha toodetes (Hanchi et al., 2019).

*Bacillus* on spore moodustav aeroobne või fakultatiivne anaeroobne grampositiivne bakter, mõne liigi puhul võib ta muutuda gramnegatiivseks. Nende moodustatud spoorid on vastupidavad kuumusele, külmumisele, kiirgusele, kuivamisele ning desinfektsioonivahenditele. Neid on looduses igal pool, kuid vaid vähesed liigid on patogeensete omadustega (Baron et al., 1996).



Kokkuvõtteks võib öelda, et katse käigus ei tuvastatud ohtlike patogeenide esinemist kolm ja pool kuud seisnud koeratoidu proovides. Sellest võib järeldada, et toit on loomale ohutu kuni säilivusaja lõpuni hoides seda kinnisena või taassuletuna toatemperatuuril.

### 2.3.3 Koeratoidu pH ja tiitritava happesuse muutus säilitamisel

Koeratoidus analüüsiti peale mikroobse arvukuse ka pH-d ja tiitritavat happesust, et näha, kas nende vahel on seost mikroorganismide kasvuga. Avamata pakendis oli pH keskmiselt 5.9 (5.48-6.12). Pakendi säilitamisel peale avamist langes pH keskmiselt 0.1 ühikut kuus (Tabel 5).

**Tabel 5. pH ja tiitritava happesuse tulemused**

Proovi tähis	Kuupäev							
	14.02.2022		23.03.2022		13.04.2022		18.05.2022	
	pH	TTA	pH	TTA	pH	TTA	pH	TTA
A	5.92	1.76	5.78	1.11	5.71	0.56	5.51	0.73
B	5.8	1.88	5.83	1.45	5.77	0.65	5.59	0.73
C	5.91	2.36	5.84	1.51	5.77	0.65	5.58	0.82
D	-	-	5.92	1.57	5.75	0.75	5.75	0.77
E	-	-	5.91	1.71	5.75	0.76	5.79	0.72
F	-	-	5.95	1.80	5.93	0.75	5.77	0.84
G	-	-	-	-	5.92	0.53	5.82	1.08
H	-	-	-	-	5.83	0.79	5.74	0.84
I	-	-	-	-	5.94	0.75	5.76	0.91
J	-	-	-	-	-	-	5.77	0.72
K	-	-	-	-	-	-	5.93	1.10
L	-	-	-	-	-	-	5.95	0.95
U1	-	-	-	-	-	-	5.48	1.07
U2	-	-	-	-	-	-	5.92	1.56
U3	-	-	-	-	-	-	6.12	0.92

Tabeli 5 põhjal näeb, et esimesel ja teisel proovivõtupäeval tiitritav happesus tõusis iga prooviga. Esimesel päeval 1.76-st kuni 2.36-ni, teisel päeval 1.11-st kuni 1.80-ni. Asjaolu tulenes sellest, et kõik proovid valmistati korraga ning hakati siis järjest mõõtma. Kolmandal ja neljandal proovivõtupäeval oli kõikumine väiksem, kuna proovid tehti ükshaaval ning peale iga proovi tegemist teostati kohe analüüs ning alles seejärel valmistati järgmine proov. Kolmandal päeval jäi tiitritav happesus vahemikku 0.53 kuni 0.79 ning neljandal päeval 0.73 kuni 1.56.

Et täpsustada proovi valmistamise ja TTA mõõtmise ajalisi efekti võrreldi TTA mõõdetud tulemusi erinevate ajavahemike tagant (Tabel 7). Tabelist näeb, et teisel päeval valmistatud proovi TTA suurenes poole tunniga umbes 0.3 ühikut. Samas kolmandal päeval valmistatud proovide TTA suurenes 1.5 tunni möödudes umbes kaks korda. Viimasel päeval valmistatud proovides, mis seisid kaks tundi, enne kui TTA uuesti mõõdeti, oli see tõusnud keskmiselt kolm ja pool korda.

**Tabel 6. pH ja tiitritava happesuse keskmised ning nendele vastavad standardhälbed**

Proovi tähised	Kuupäev							
	14.02.2022		23.03.2022		13.04.2022		18.05.2022	
	pH +SD	TTA +SD	pH +SD	TTA +SD	pH +SD	TTA +SD	pH +SD	TTA +SD
<b>A+B+C</b>	5.88 ±0.05	2.00 ±0.26	5.82 ±0.03	1.35 ±0.17	5.75 ±0.03	0.62 ±0.05	5.56 ±0.04	0.76 ±0.05
<b>D+E+F</b>	-	-	5.93 ±0.02	1.70 ±0.11	5.81 ±0.08	0.75 ±0.01	5.77 ±0.02	0.78 ±0.06
<b>G+H+I</b>	-	-	-	-	5.90 ±0.05	0.69 ±0.14	5.77 ±0.03	0.95 ±0.12
<b>J+K+L</b>	-	-	-	-	-	-	5.88 ±0.08	0.92 ±0.19
<b>U1+U2+U3</b>	-	-	-	-	-	-	5.84 ±0.27	1.18 ±0.34

Kogu katse vältel pH pigem langes avatud ja taassuletud pakkides ning just avatud proovides oli see jälle kõrgem. Tiitritav happesus varieerus nii sama päeva proovide vahel kui ka erinevatel päevadel teostatud proovides. Asjaolu tulenes arvatavasti sellest, et proovid valmistati erineva kiirusega arvestades inimlikku viga. Varasemalt läbi viidud uuringus, kus analüüsiti pH-d ja tiitritavat happesust kuiv-fermenteeritud vorstides, mõõdeti tiitritavat happesust kuni pH 7-ni 0,1 N NaOH-ga, ning saadi tulemuseks keskmiselt  $0.86 \pm 0.19$  (%piimhapet). pH väärtuseks saadi  $5.07 \pm 0.25$  kuni  $5.63 \pm 0.51$  (Capita et al., 2006).

**Tabel 7. pH ja tiitritava happesuse muutused aja möödudes**

Proovi tähis	Kuupäev					
	23.03.2022		13.04.2022		18.05.2022 + 2h	
	Algne TTA	TTA + 0.5h	Algne TTA	TTA + 1.5h	Algne TTA	TTA + 2h
<b>A</b>	1.76	2.08	0.56	2.83	0.73	3.16
<b>B</b>	-	-	-	-	0.73	3.49
<b>C</b>	-	-	0.65	2.78	0.82	3.56
<b>D</b>	-	-	-	-	0.77	3.18
<b>E</b>	-	-	-	-	0.72	3.20
<b>F</b>	-	-	-	-	0.84	3.59
<b>G</b>	-	-	-	-	1.08	3.69
<b>H</b>	-	-	-	-	2.65	3.68
<b>I</b>	-	-	-	-	0.91	3.81
<b>J</b>	-	-	-	-	0.72	3.61
<b>K</b>	-	-	-	-	1.10	4.29
<b>L</b>	-	-	-	-	0.95	3.48
<b>U1</b>	-	-	-	-	1.07	3.74
<b>U2</b>	-	-	-	-	1.56	2.57
<b>U3</b>	-	-	-	-	0.92	3.15

Tabelit 7 vaadates näeb, et mida kauem proov seisis, seda enam suurenes TTA. Sellest võib järeldada, et vees leotades eraldus lihast lahusesse piimhappeid.

## 2.4 Järeldused

Antud töö tulemused näitasid, et analüüsitud Pala Petfoods koeratoidu partiides ei detekteeritud hallituste kasvu märgitud säilivusaja jooksul, kuid uues partiis leidis pärmseeni. Siiski vähenes pärmseente üldarv juba esimese kuuga alla detekteerimispiiri. Õigetes tingimustes (toatemperatuuril, otsese päikese eest kaitstult) mikroorganismide üldarvukus vähenes, kui pakk tehti lahti ning jäeti seisma. Samuti vähenes tuvastavate mikroorganismide mitmekesisus. Peale kolme ja poolt kuud säilitamist domineerisid grampositiivsed *Enterococcus faecium* liiki kuuluvad bakterid, samuti esines väljakülvides erinevaid *Bacillus spp* perekondadesse kuuluvaid baktereid. Üldiselt bakterid, mis leiti toidust olenemata sellest, kas toit oli värskelt valmistatud või juba säilivusaja lõpus olid kas ohutud või oportunistlikult patogeensed ehk need ei põhjusta tervete loomade haigestumist.

pH langes minimaalselt säilivusaja jooksul avatud pakendites ja jäi avatud ning taassuletud pakendites vahemikku 5.51 kuni 5.84, avamata pakendites jäi pH vahemikku 5.48 kuni 6.12 seega ei ilmnenud riknemise märke. Tiitritava happesuse usadusväärne mõõtmine oli mõjutatud vees lahustuvatest ainetest ja nõuab lisa standardiseerimist. Katsetulemuste põhjal ei leitud seost pH ja TTA ning mikroorganismide arvukuse vahel.

### 3. KOKKUVÕTE

Töö eesmärk oli määrata Pala Petfoods koeratoidu retseptis number 3 mikroobse kvaliteedi muutust säilitamisel. Resultaadid näitasid, et säilivusaja vältel ei kasvanud toidus hallitusi, sellest võib järeldada, et paki avamine ei mõjuta hallituste kasvu. Pärmide arvukus jäi vahemikku  $9.0 \cdot 10^2 \pm 2.2 \cdot 10^2$  pmü/g kuni  $1.8 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^4$  pmü/g ja langes esimese kuuga alla deketkteerimispiiri. Isolaadid, mis määrati olid järgnevad: *Filobasidium oeirenes*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Saccharomyces spp* ja *Candida zeylanoides*. Analüüsi käigus tuli välja, et toit oli loomadele ohutu, bakterite üldine arvukus kahanes olles uue partii avatud pakis  $6.2 \cdot 10^7 \pm 2.2 \cdot 10^7$  pmü/g ning säilivusaja lõppu jõudnud pakkides  $4.9 \cdot 10^4 \pm 5.0 \cdot 10^4$  kuni  $1.0 \cdot 10^6 \pm 7.4 \cdot 10^5$  pmü/g. Bakterite mitmekesisus vähenes võrreldes tootmise alguses ning säilivusaja lõpus avatud pakke. Värskest toodetud pakkides leiti järgnevad bakterid: *Pseudomonas spp*, *Pseudomonas fragi*, *Lactococcus garvieae*, *Escherichia coli*, *Carnobacterium divergens*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus hominis*. Kolm ja pool kuud seisnud bakterite mitmesesisuse uurimisel leiti, et valdav enamus kuulus *Enterococcus faecium* liiki, esines ka *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus inaquosorum* ja *Bacillus velezensis* liike ning lisaks kuulus üks tulemus *Bacillus spp* perekonda. Katse käigus identifitseeritud mikroorganismid olid loomale üldiselt ohutud või oportunistliku isemloomuga ehk tekitavad kõrvalmõjusid vaid nõrga immuunsusega loomadele.

Tiitritav happesus katse vältel üldiselt ei muutunud erinevatel aegadel avatud proove võrreldes, kuid suurenes toidu leotamisel vees. Selle suurenemine toidus näitab, kui palju happeid toidust lahusesse eraldub. pH langes avatud ja taassuletud pakkides, kuid mitte märkimisväärselt, olles suletud kottides vahemikus 5.48-6.12 ning avatud ja taassuletud kottides 5.51-5.84.

Tulevikus tuleks analüüsida täpsemalt Enterobakterite arvukuse muutust koeratoidus säilivusaja vältel, kuna seda kontorollitakse Euroopa Komisjoni määruse alusel ning sellega saaks ettevõtte endale tagasisidet, kui kaua oleks mõistlik hoida koeratoidu pakki lahtisena enne, kui selles olevate mikroorganismide arvukuse määr ületab lubatud piirmäära.

Kuna katse käigus ei tuvastatud hallitusseentele omast kasvu, kuid ettevõttest oli teateid selle kohta on tuleviku plaanideks analüüsida toidukomponente eralid erinevats partiides, et tuvastada, mis on hallituse algallikas. Samut oleks vaja teha keskkonna analüüse, sealhulgas õhu- ja pinnaanalüüs ning üle vaadata töötajate isiklik hügieen.

## **TÄNUAVALDUS**

Soovin abi eest tänada töö juhendjat, Inga Sarandit suurepärase nõuannete eest töö katseehituse välja mõtlemises. Samuti tänan Viiu Paalmet Keemia ja Biotehnoloogia instituudist ning toidutehnoloogia doktorant Atefed Asadit, kes aitasid katseid läbi viia ja seletasid nende vajalikkust töö eesmärgi saavutamisel.

## SUMMARY

The aim of this work was to determine the microbiological quality during storage in Pala Petfoods dog food recipe number 3 (beef-salmon-vegetables). Our results detected no growth of mold in the analyzed batch samples upon storage for three and a half months. Also regular package opening has no effect on the growth of molds. The number of culturable yeast in the freshly packed food was around  $9.0 \cdot 10^2 \pm 2.2 \cdot 10^2$  pmü/g until  $1.8 \cdot 10^4 \pm 1.4 \cdot 10^4$  pmü/g and it decreased below detection limit during the first storage month. The yeast isolates were represented by species *Filobasidium oerenses*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Saccharomyces spp* ja *Candida zeylanoides*. The bacterial total numbers in the freshly packed food was  $6.2 \cdot 10^7 \pm 2.2 \cdot 10^7$  pmü/g. The number of bacteria at the end of shelf life was decreased and was around  $4.9 \cdot 10^4 \pm 5.0 \cdot 10^4$  pmü/g until  $1.0 \cdot 10^6 \pm 7.4 \cdot 10^5$  pmü/g. Only gram positive bacteria belonging to species *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus inaquosorum*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus megaterium* were detected in the end of storage. The vast majority were from *Enterococcus faecium* species. In difference the bacteria diversity in the beginning of storage was significantly higher. Both gram positive and negative bacteria were isolated. They were identified as *Lactococcus garvieae*, *Escherichia coli*, *Carnobacterium divergens*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus hominis*. None of them was pathogenic but some belong to opportunistic pathogens, i.e. they cause side effects only in animals with weak immunity. The changes in microbial community was not significantly reflected in the pH dynamic. It slightly decreased in closed bags from 5.48-6.12 to open and reclosed bags 5.51-5.84. The measurement of TTA during the experiment generally did not change when comparing the samples opened at different times, but increased when the food was soaked in water. Its increase in food indicates how much acid is released from the food into the solution.

In the future, the change in the number of Enterobacteriaceae during the shelf life of dog food could be analyzed more precisely, as it is recorded on the basis of the European Commission regulation, and with this the company could get feedback on how long it would be reasonable to keep the dog food package open before the number of microorganisms in it exceeds the permitted limit.

Since the test did not detect mold growth, but there were reports of it from the company, the levels of various mycotoxins in the dog food will need to be measured in the future to identify where the molds are coming from.

## KASUTATUD KIRJANDUS

1. Ababneh, Q., Al-Rousan, E., Jaradat, Z. (2022) "Fresch produce as a potential vehicle for transmission of *Acinetobacter baumannii*":  
<https://foodcontaminationjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40550-022-00092-7#:~:text=in%20this%20study,-A.,and%20fruits%20> (17.11.2022)
2. Alberta Healt Service „AHS ranked among best in world for integration of care“ (2018):  
[https://www.albertahealthservices.ca/news/Page14471.aspx#:~:text=EDMONTON%20%E2%80%9393%20Alberta%20Health%20Services%20\(AHS,health%20systems%20in%20the%20world.](https://www.albertahealthservices.ca/news/Page14471.aspx#:~:text=EDMONTON%20%E2%80%9393%20Alberta%20Health%20Services%20(AHS,health%20systems%20in%20the%20world.)  
(29.05.2023)
3. Alberta Healt Service "Microbial Guidelines for ready-to-eat foods" (2022):  
<https://www.albertahealthservices.ca/assets/wf/eph/wf-eh-microbial-guidelines-for-ready-to-eat-foods.pdf> (15.11.2022)
4. Alsammar, H., Delneri, D. (2020) „An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus“: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32196094/> (19.05.2023)
5. Bahrii, A. B. (2021) „Yeast: a pet food ingredient of the future“ GlobalPETS:  
<https://globalpetindustry.com/article/yeast-pet-food-ingredient-future> (27.04.2023)
6. Baron, S., Iglevski, B. H. (1996) "Medical microbiology 4th edition, chapter 27: *Psuedomonas*":  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/#:~:text=Most%20pseudomonads%20known%20to%20cause,human%20diseases%3A%20glanders%20and%20melioidosis.>(26.11.2022)
7. Belloch, C., Hamamoto, M., Eliskases-Lechner, F., Prillinger, H. (2002) "Encyclopedia of Dairy Science: *Kluyveromyces*":  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122272358002285> (17.11.2022)
8. Black, W. D. (2020) „A comparison of several media types and basic techniques used to assess outdoor airborne fungi in Melbourne, Australia“:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0238901> (17.05.2023)
9. Brady, Dr. C. (2022) „Yeast infection in dogs: Causes, Treatments, Foods to Avoid“:  
<https://dogsfirst.ie/yeast-infection-in-dogs/> (27.0.2023)
10. Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M., Leroi, F. (2005) "Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a bio-preservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon“:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15979753/> (23.11.2022)
11. Cabello-Olmo, M., Barajas, M., Encío, I., (2020) „Influence of Storage Temperature and Packaging on Bacteria and Yeast Viability in a Plant-Based Fermented Food“:  
[https://www.researchgate.net/publication/339771357\\_Influence\\_of\\_Storage\\_Temperature\\_and\\_Packaging\\_on\\_Bacteria\\_and\\_Yeast\\_Viability\\_in\\_a\\_Plant-Based\\_Fermented\\_Food](https://www.researchgate.net/publication/339771357_Influence_of_Storage_Temperature_and_Packaging_on_Bacteria_and_Yeast_Viability_in_a_Plant-Based_Fermented_Food) (17.05.2023)
12. Capita, R., Llorente-Marigomez, S., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2006) „Microbiological Profiles, pH, and Titratable Acidity of Chorizo and Salchichó n (Two Spanish Dry Fermented Sausages) Manufactured with Ostrich, Deer, or Pork Meat“:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22074385?via%3Dihub>  
(19.05.2023)

13. Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocione, I., Monaco, R., Mauriello, G., Villani, F., Ercolini, D. (2011) "Spoilage-Related Activity of *Carnobacterium maltaromaticum* Strains in Air-Stored and Vacuum-Packed Meat": <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3194841/> (23.11.2022)
14. Chen, W., Hu, H., Zhang, C., Huang, F., Zhang, D., Zhang, H. (2017) "Adaptation response of *Pseudomonas fragi* on refrigerated solid matrix to a moderate electric field": <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-0945-2#:~:text=Pseudomonas%20fragi%20is%20a%20psychrotrophic,17%2C%2020%2E2%80%9322%5D>. (17.11.2022)
15. Dakic, I., Morrison, D., Vukovic, D., Savic, B., SHITTU, A., Ježek, P., Hauschild, T., Stepanovic, S. (2005) "Isolation and Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* in the Hospital Environment": <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1151920/> (23.11.2022)
16. Davin-Regli, A., Pages, J. M. (2015) „Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment“: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4435039/> (15.05.2023)
17. Desmasures, N. (2014) „Encyclopedia of Food Microbiology: Cheese Mod-Ripened Varieties“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780123847300000604> (2.05.2023)
18. Dijkstra, A. J. (2016) „Encyclopedia of Food and Health: Vegetable Oils: Composition and Analysis“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012384947200708X> (08.5.2023)
19. Egan, A. F. (1983) „Lactic acid bacteria of meat and meat products“: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6354082/#:~:text=When%20the%20growth%20of%20aerobic,films%20of%20low%20gas%20permeability>. (19.05.2023)
20. EU nr 142/2011 XIII LISA, II peatükk, 2. punkt: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:054:0001:0254:ET:PDF> (27.04.2023)
21. EU 2003/100/EC (31.10.2003) „COMMISSION DIRECTIVE 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed“: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0100&rid=1> (30.05.2023)
22. EU 2016/1319 (29.07.2016) „Komisjoni soovitus (EL) 2016/1319, 29. juuli 2016, millega muudetakse soovitus 2006/576/EÜ seoses desoksüivalenooli, zearalenooni ja ohratoksiini A esinemisega lemmikloomatoidus“: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2016/1319/oj/est> (30.05.2023)
23. FEDIAF (2018) "Guide to Good Practice for the Manufacture of Safe Pet Foods": [https://europeanpetfood.org/wp-content/uploads/2022/03/FEDIAF\\_Safety\\_Guide\\_February\\_2018\\_online.pdf](https://europeanpetfood.org/wp-content/uploads/2022/03/FEDIAF_Safety_Guide_February_2018_online.pdf) (01.11.2022)
24. Fernández, M., Conde, S., Torre, J., Molina-Santiago, C., Ramos, J. (2012) „Mechanisms of Resistance to Chloramphenicol in *Pseudomonas putida* KT2440“: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3264264/> (15.05.2023)
25. Fiore, E., Tyne, D. V., Gilmore, M. S. (2019) "Pathogenicity of Enterococci": [https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.GPP3-0053-2018?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed) (23.11.2022)
26. Fleet, G.H. (2011) "The yeasts: Yeast spoilage of foods and beverages": <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521491000057> (17.11.2022)



27. Gibello, A., Galan-Sanchez, F. Blanco, M. M., Rodriguez-Iglesias, M., Dmoingues, L., Fernandez-Garayzabal, J. (2016) "The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods": <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27892875/> (23.11.2022)
28. Giraffa, G. (2002) "Microbiology reviews: Enterococci from foods": <https://academic.oup.com/femsre/article/26/2/163/653308> (23.11.2022)
29. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. (2018) "The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns - An Update": <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01791/full#B126> (23.11.2022)
30. Hanson, E.M. (2022) „Food Bacteria – What temperature kills bacteria in food?": <https://www.fooddocs.com/post/what-temperature-kills-bacteria-in-food> (27.04.2023)
31. Horiba Ltd kodulehekülg: <https://www.horiba.com/sgp/water-quality/applications/food-beverage/ph-measurement-of-meat-products/> (26.11.2022)
32. Howard, A., O`Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R. D. (2012) „*Acinetobacter baumannii*": <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3442836/> (17.11.2022)
33. Jin, Q., Kirk, M. F. (2018) „pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective": <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2018.00021/full#B39> (29.05.2023)
34. Kazimierska, K., Biel, W., Witkiewicz, R., Karakulska, J., Stachurska X. (2021) "Evaluation of nutritional value and microbiological safety in commercial dog food" : <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-021-09791-6> (01.11.2022)
35. Kerns, N., (2021) "Hidden killers in dog food": <https://www.whole-dog-journal.com/food/hidden-killers-in-dog-food/> (26.09.2022)
36. Kerns, N., (2021) "Toxins that can arise in dry dog food": <https://www.whole-dog-journal.com/food/toxins-that-can-arise-in-dry-dog-food/> (26.09.2022)
37. Leung, M. C. K., Diaz-Llano, G., Smith, T. K. (2006) „Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies": <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17177480/> (30.05.2023)
38. Li, B., Zhan, M., Evivi, S. E., Jin, D., Zhao, L., Chowdhury, S., Sarker, S. K., Huo, G., Liu, F. (2018) "Evaluating the Safety of Potential Probiotic *Enterococcus durans* KLD56.0930 Using Whole Genome Sequencing and Oral Toxicity Study": <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01943/full> (23.11.2022)
39. Liu, X. Y., Wang, Q. M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A. V. (2015) „Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes": <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777781/> (19.05.2023)
40. Martinez, R. M. (2013) "Brenner's encyclopedia of Genetics: *Bacillus subtilis*": <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012374984000125X> (23.11.2022)
41. Mabitoba.ca, Water content and Water Activity: Two Factors That Affect Food Safety: [https://www.gov.mb.ca/agriculture/food-safety/at-the-food-processor/water-content-water-activity.html#:~:text=Water%20activity%20\(aw\)%20is,aw%3D%20P%2FP0](https://www.gov.mb.ca/agriculture/food-safety/at-the-food-processor/water-content-water-activity.html#:~:text=Water%20activity%20(aw)%20is,aw%3D%20P%2FP0) (19.03.2023)
42. MayoClinic "E.coli" 2022: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058> (23.11.2022)

43. Nielsen, D. S., Jacobsen, t., Jespersen, L., Koch, A. G., Arneborg, N. (2008) „Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174008001149?via%3Dihub> (17.05.2023)
44. NIH Standard nucleotide blast kodulehekülg mikroorganismide identifitseerimiseks: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (26.11.2022)
45. Pala Petfoods veebilehekülg: <https://palapets.com/et/collections/complete-recipes/products/pala-s-recipe-3-for-adult-dogs-1kg> (19.06.2022)
46. Pala Petfoods veebilehekülg: <https://palapets.com/et/pages/our-food> (26.09.2022)
47. Pet Food Institute: „Handling and Storage“ (2023): <https://www.petfoodinstitute.org/about-pet-food/safety/handling-and-storage/> (27.04.2023)
48. Pet Food Institute: „How is Pet Food Made“ (2023): <https://www.petfoodinstitute.org/about-pet-food/safety/pet-food-made/> (27.04.2023)
49. Pratt, J., (2021) “pH ja tiitritava happesuse erinevus“: <https://et.strephonsays.com/ph-and-titratable-acidity-5266> (19.09.22)
50. Processing of Horticultural Crops, topic 24: <http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/page/view.php?id=17110> (08.05.2023)
51. Ramos, G., Guimaraes, J., Pimentel, T., Cruz, A., Souza, S., Vendramel, S. (2021) “Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products: Whey: generation, recovery and use of relevant by-product“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128240441000301> (17.11.2022)
52. Rubi, C. A., Mesquita, E., (2018) „Lactococcus garvieae: emergent pathogen usually misidentified as enterococcal species“: <https://medcraveonline.com/MOJBM/lactococcus-garvieae-emergent-pathogen-usually-misidentified-as-enterococcal-species.html> (16.05.2023)
53. Santos, J. L. P., Samapundo, S., Djunaidi, S., Vermeulen, A., Sant’Ana, A. S. (2020) „Effect of storage temperature, water activity, oxygen headspace concentration and pasteurization intensity on the time to growth of *Aspergillus fischerianus* (teleomorph *Neosartorya fischeri*)“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002019310160> (30.05.2023)
54. Santos, J. L. P., Samapundo, S., Pimentel, G. C., Impe, J. V., Sant’Ana, A. S., (2019) „Assessment of minimum oxygen concentrations for the growth of heat-resistant moulds“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000201930276X> (30.05.2023)
55. Schaer, B. D., Orsini J. A. (2014)“Equine Emergencies: Gastrointestinal süstem“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455708925000180> (23.11.2022)
56. Serhan, M., Hadid, M., Dimassi, H., Deghel, M., Hassan, H.F., (2022) “Microbiological safety in commercial canned and dry food in Lebanon“: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.995184/full> (27.10.2022)
57. Sessou, P. (2022) “Encyclopedia of dairy science: Yeasts in milk and dairy production“: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187661000088> (17.11.2022)
58. Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. (2010) „The Bacterial Cell Envelope“: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2857177/#:~:text=Gram%2Dnegative%20bacteria%20are%20surrounded,found%20in%20the%20Gram%2Dnegatives>. (17.05.2023)
59. Singh, R. L., Mondal, S. (2019) “Food safety and human health: Hazards and safety issues of meat and meat products“:

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/staphylococcus-hominis> (26.11.2022)

60. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010) "The population genetics of commensal *Escherichia coli*": <https://www.nature.com/articles/nrmicro2298> (23.11.2022)

61. UK Pet Food „What`s in dog food“ (2022): <https://www.ukpetfood.org/resource/whats-in-dog-food.html> (27.04.2023)

62. US Pet Market Focus: „Pet Food Update“ (2021): <https://www.freedoniagroup.com/packaged-facts/u-s-pet-market-focus-pet-food-update,-2021> (27.04.23)

63. Vázquez-López, R., Solano-Gálvez, S. G., Vignon-Whaley, J. J. J., Vaamonde, J. A. A., Alonzo, L. A. P. (2020) „Acinetobacter baumannii Resistance: A Real Challenge for Clinicians“: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7235888/> (17.05.2023)

64. Yadav, J. S. S., Bezawada, J., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli R.Y. (2012) "Candida krusei: biotechnological potentials and concerns about its safety": <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22823163/#:~:text=Among%20the%20yeast%20species%2C%20Candida,production%20of%20biochemicals%20and%20enzymes.> (17.11.2022)

## LISAD

### *LISA 1. Katseskeem*

Kuupäev	Proovi tähistus	Lahjendus
8.02.22	A, B, C	$10^{-1}$ ja $10^{-2}$
15.03.22	A, B, C	$10^{-2}$ ja $10^{-3}$
	D, E, F	$10^{-1}$ ja $10^{-2}$
13.04.22	A, B, C	$10^{-1}$ ja $10^{-2}$
	D, E, F	
	G, H, I	
18.05.22	A, B, C	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-4}$ , $10^{-6}$
	D, E, F	
	G, H, I	
	J, K, L	
	U1, U2, U3	

Proovid A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L – pärinesid partiist, mis ol valmistatud 3.02.2022, aegumiskuupäev oli 17.05.2022.

Proovid U1, U2, U3 – pärinesid partiist, mis oli valmistatud 10.05.2022, aegumiskuupäev oli 24.08.2022.

## **LISA 2. Lihtlitsents**

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina, Kerit-Lii Joason,

Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**PALA PETFOODS KOERATOIDUS MIKROOBSE KVALITEEDI MÄÄRAMINE SÄILITAMISEL**

mille juhendaja on Inga Sarand,

reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

30.05.2023

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.