



EESTI MAAÜLIKOOL

Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut

Aljona Kuzina

**BIOKILE MIKROBIOOTA LEIVATÖÖSTUSE
SEADMETEL**

MICROBIOTA IN BIOFILMS ON BAKERY EQUIPMENTS

Bakalaureusetöö

Toiduainete tehnoloogia õppekava

Juhendaja: dotsent Helena Andreson, PhD

Tartu 2020

| | | | |
|--|--------------|-----------------------------------|------------|
| Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014 | | Bakalaureusetöö lühikokkuvõte | |
| Autor: Aljona Kuzina | | Õppekava: Toiduainete tehnoloogia | |
| Pealkiri: Biokile mikrobioota leivatööstuse seadmetel | | | |
| Lehekülgi: 60 | Jooniseid: 8 | Tabeleid: 4 | Lisasid: 1 |
| <p>Osakond / Õppetool: Toiduteaduse ja toiduainete tehnoloogia õppetool</p> <p>ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: 1.7. Toiduteadused, Toiduainete ja jookide tehnoloogia T430</p> <p>Juhendaja(d): dotsent Helena Andreson, PhD</p> <p>Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu 2020</p> | | | |
| <p>Toiduga seotud bakterite poolt põhjustatud toiduainete riknemine on alati olnud suureks probleemiks toiduainete tööstuses. Toidu riknemine on sageli tingitud biokilest, mida moodustavad bakterid toiduga kokkupuutuvatel pindadel, mistõttu seadmete puhtuse jälgimine ning biokile tekkimise vältimine on toiduohutuse tagamiseks väga oluline.</p> <p>Bakalaureusetöö eesmärk on anda ülevaade leivatööstuses juuretistega kokkupuutuvatel seadmetel esinevate biokilede mikroobikoosluste kohta ning teostada mikrobioloogiline ja molekulaarne uuring ühe Eestis tegutseva leivatööstuse seadmetelt kogutud biokileproovidega.</p> <p>Mikrobioloogilise uuringu käigus kirjeldati väljakasvanud mikroobide morfoloogiat, isoleeriti ning säilitati mikroobide puhaskultuurid. Seejärel eraldati uuritavast materjalist DNA ning teostati sellele PCR analüüs <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>B. subtilis</i> ja <i>Klebsiella pneumoniae</i> tuvastamiseks.</p> <p>Leiti, et 26% uuritavas materjalis esines <i>B. cereus</i>, <i>B. subtilis</i> ja <i>K. pneumoniae</i>. <i>S. aureus</i>'e DNAd antud proovides ei tuvastatud. Samuti selgus, et ühes biokileproovis võivad esineda mitmed patogeene liigid korraga, mis tõenäoliselt muudab biokile hävitamisele veelgi resistentsemaks ning millega suureneb leivajuuretise saastumise oht. Kokkuvõtteks võib öelda, et leivatööstuse seadmetel esinevad potentsiaalselt patogeensed bakterid on võimelised moodustama bakteriaalseid kooslusi ning püsima biokiles pika perioodi jooksul. Töö raames isoleeritud mikroobide puhaskultuurid ning biokilest eraldatud DNA säilitatakse edasisteks uuriguteks temperatuuril -80 °C.</p> | | | |
| Märksõnad: biokirime, kvoorumtunnetus, PCR, toiduohutus, patogeen | | | |

| | | | |
|---|------------|-------------------------------|---------------|
| Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014 | | Abstract of Bachelor's Thesis | |
| Author: Aljona Kuzina | | Curriculum: Food technology | |
| Title: Microbiota in biofilms on bakery equipments | | | |
| Pages: 60 | Figures: 8 | Tables: 4 | Appendixes: 1 |
| <p>Department / Chair: Chair of Food Science and Technology</p> <p>Field of research and (CERC S) code: 1.7. Food Sciences, Food and drink technology T430</p> <p>Supervisors: docent Helena Andreson, PhD</p> <p>Place and date: Tartu 2020</p> | | | |
| <p>Food spoilage caused by food-related bacteria has always been a significant problem in the food industry. Food spoilage is often associated with biofilm formation on food contact surfaces, therefore monitoring the cleanliness of equipment and preventing the formation of biofilm is essential for food safety.</p> <p>The aim of this bachelor's thesis was to provide an overview of the microbes that are present in biofilms on sourdough contact bakery equipments and also to conduct a microbiological and molecular study of biofilm samples collected from the industry equipments of one Estonian bakery.</p> <p>In the course of the microbiological study, the morphology of the microbes was described and pure microbial cultures were isolated and stored. DNA was then extracted from the biofilm samples in order to identify <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>B. subtilis</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> in it by the PCR analysis.</p> <p><i>B. cereus</i>, <i>B. subtilis</i> and <i>K. pneumoniae</i> were present in 26% of the studied samples. <i>S. aureus</i> DNA was not detected in these samples. Moreover, it was found that one biofilm sample could consist several species of pathogens, which is likely to make the biofilm even more resistant to destruction and increase the risk of contamination of sourdough.</p> <p>In conclusion, potentially pathogenic bacterial species, present on bakery equipments, are able to form bacterial communities and persist in the biofilm for a long period of time. During the research, microbial isolates and DNA extracted from the biofilm samples, were stored at -80 °C for further studies.</p> | | | |
| Keywords: biofilm, quorum sensing, PCR, food safety, pathogen | | | |

SISUKORD

| | |
|---|----|
| LÜHENDID | 5 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ANALÜÜS | 7 |
| 1.1. Biokile | 7 |
| 1.2. Kvoorumtunnetus | 9 |
| 1.2.1. Kvoorumtunnetuse signaalid toiduainete tööstuste biokiledes | 10 |
| 1.3. Biokilede mikrobiota | 12 |
| 1.3.2. Mittepatogeensed mikroobid..... | 12 |
| 1.3.3. Patogeensed mikroobid..... | 15 |
| 1.4. Biokile toiduainete tööstuses | 20 |
| 1.4.1. Biokile leivatööstuse seadmetel | 21 |
| 1.5. Biokile hävitamisviisid toiduaine tööstuses..... | 24 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 26 |
| 2.1. Töö eesmärk ja ülesanded..... | 26 |
| 2.2. Materjal ja meetodika..... | 26 |
| 2.2.1. Uuritav materjal..... | 26 |
| 2.2.2. Mikrobioloogilised väljakülvid | 27 |
| 2.2.3. DNA eraldamine..... | 28 |
| 2.2.4. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon | 29 |
| 2.2.5. Geelelektroforees..... | 31 |
| 3. TULEMUSED JA ARUTELU | 33 |
| 3.1. Mikroobide väljakasv biokileproovidest | 33 |
| 3.2. PCR analüüsi tulemused | 34 |
| 3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'e esinemine leivatööstuse seadmete biokiles..... | 35 |
| 3.2.2. <i>Bacillus</i> spp. esinemine leivatööstuse seadmete biokiles | 36 |
| 3.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> esinemine leivatööstuse seadmete biokiles..... | 37 |
| KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED | 40 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 42 |
| LISAD | 54 |
| Lisa 1. Mikroobide pesa- ja rakumorfoloogiate kirjeldus leivatööstuse seadmete biokileproovide väljakülvides..... | 55 |

LÜHENDID

| | |
|-------------|---|
| AHL | atsüül-homoseriinlaktoon |
| AI | autoinduktor |
| DNA | desoksüribonukleinhape |
| <i>femA</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> spetsiifiline geen |
| KS | katseseeria |
| KT | kvoorumtunnetus (<i>quorum sensing</i> , ingl. k.) |
| LAB | piimhappebakterid (<i>lactic acid bacteria</i> , ingl. k.) |
| PCR | polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i> , ingl. k.) |
| PMÜ | pesa moodustav ühik |
| SE | stafülokokkide enterotoksiinid (<i>staphylococcal enterotoxins</i> , ingl. k.) |
| TSA | trüptikaas-sojaagar (<i>Tryptic Soy Agar</i>), universaalsööde bakteritele |
| UV | ultraviolettkiirgus |

SISSEJUHATUS

Bakteritega seotud toiduainete riknemine on alati olnud suureks probleemiks toiduainetetööstuses. Mikroobide kasv ja areng toiduainetes põhjustab nii majanduslikke probleeme, kui ka ohtu tarbija tervisele. Toidus tekivad mikroorganismide ainevahetuse lõpp-produktid, mis võivad kutsuda esile muutusi toidu lõhnas, maitstes ja värvuses. Kui toit on riknenud, on see tarbijale vastuvõetamatu ehk inimtoiduks kõlbmatu.

Paljud mikroorganismid esinevad keskkonnas biokilena. Biokile kaitseb baktereid ja annab neile toitained ellujäämiseks. Kõik tuntumad toidupatogeenid on võimelised biokile moodustama. Toiduainete tööstuse vaatepunktist võib biokile olla nii kahjulik kui ka kasulik. Biokile on tihti seotud toidu riknemisega ja ohu tekkega tarbija tervisele. Samas aga võib biokile parendada toode kvaliteedi ja pikendada selle säilivusaega. Toidu riknemises ja biokile tekkimises mängib olulist rolli kvooruntunnetus, mis on bakterite omavaheline kommunikatsiooniviis. Biokile mikroobikoosluse ning selles sisalduvate mikroorganismide tuvastamine ning vastastikmõju uurimine võib aidata vältida toidu riknemist ja/või selle kvaliteedi halvenemist. Biokile moodustamine toiduainetetööstuses on väga lai ja oluline teema, mis vajab täiendavaid uuringuid. Ka leivatööstuse seadmetel esinevate biokilede kohta nii Eestis kui mujal maailmas teatakse veel väga vähe.

Bakalaureusetöö eesmärk on anda ülevaade toiduainete tööstuses, täpsemalt leivatööstuses, leivajuuretisega kokkupuutuvatel seadmetel esinevate biokilede mikroobikoosluste kohta. Töö praktilises osas püstitati hüpotees, et leivatööstuse seadmetel olevas biokiles on võimalik tuvastada patogeene, mis võivad olla potentsiaalselt ohtlikud inimese tervisele, mistõttu teostati mikrobioloogiline ja molekulaarne uuring *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. ja *Klebsiella pneumoniae* tuvastamiseks ühe Eestis tegutseva leivatööstuse seadmetelt kogutud biokileproovides.

1. KIRJANDUSE ANALÜÜS

1.1. Biokile

Biokile ehk biokirme ehk biofilm on õhuke ekstratsellulaarne polümeerne materjal, mis koosneb peamiselt eksopolüsahhariididest, glükoproteiinidest ja glükolipiididest ning mis ümbritseb eluvõimelisi ja -võimetuid mikroorganisme (Donlan 2002, Bacterial Glycocalyx...2016). Biokile massist moodustavad 5-25% bakterid, ülejäänud osast 95% on vesi (Wirtanen *et al.* 2003:484). Biokilet on võimelised moodustama nii bakterid kui ka seened, moodustudes veepinnal, taimedel, kivimitel, toiduainetel aga ka loomade ja inimeste kehas (Donlan 2002). Joonisel 1 on näitena toodud biokile, mis tekib kauavalmivate juustude pindadel.



Joonis 1. Juustu pinnal moodustunud biokile läbilõikes. Küpsev biokile juustu pinnal (A), juustupinna naturaalne biokile (B) ja biokile pärast juustupinna puhastamist (C) (Allikas: Wolfe *et al.* 2014).

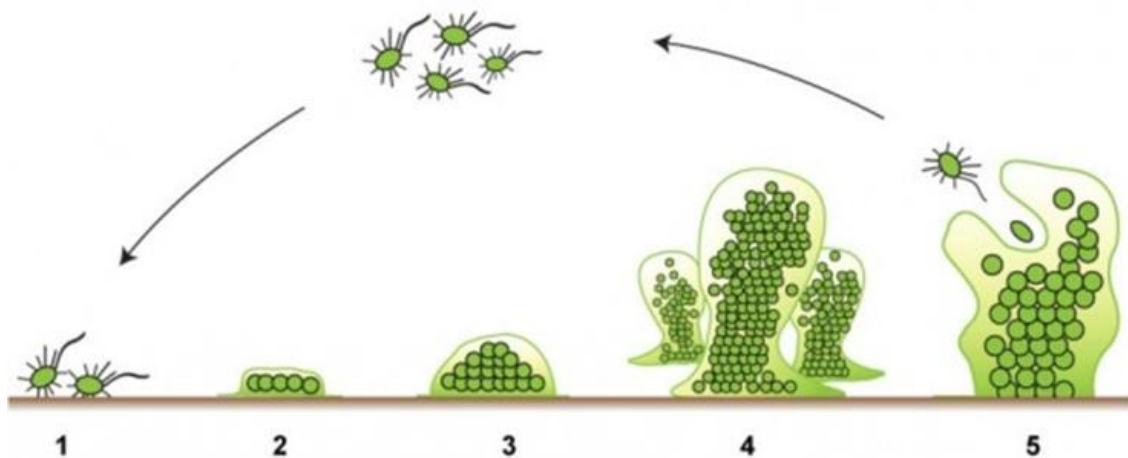
Biokile kaitseb baktereid keskkonnafaktorite eest (Hall-Stoodley *et al.* 2004). Pinda, millele bakterid biokile moodustavad, nimetatakse substraadiks. Substraadist sõltub, kui kiiresti biokile moodustub (Oh *et al.* 2009). Biokile tekib hüdrofoobsetel pindadel (nt plastik) kiiremini, kui hüdrofiilsetel pindadel (klaas, metall) (Morohoshi *et al.* 2018). Biokiled, kus esinevad erinevad mikroobiliigid, on hävitamisele resistentsemad (Donlan 2002). Arvatakse, et looduses esineb rohkem kui 95% bakteritest biokiledes (Saini *et al.* 2011).

Inimese tervise vaatepunktist on biokile potentsiaalne infektsiooniallikas. Bakterite resistentsus on tervishoius suureks probleemiks (Donlan 2002). Biokile esineb nt. hambakatuna, kus esineb rohkem kui 7000 bakteriliiki (Keijser *et al.* 2008). Mõned bakterid

soodustavad erinevate suukaudsete haiguste tekkimist nagu hambakaaries, periodontiit, põletik (Saini *et al.* 2011). Biokile esineb ka kroonilistes haavades, mis tekib kas haavade peale või nende sisse, pidurdades haavade paranemist (Licker 2017). Biokile on sage haiglainfektsioonide põhjus läbi patogeenide kinnitumise kateetritele jm implantaatidele (Bryers 2009). Bakterid võivad biokile kaudu koloniseerida meditsiinilisi seadmeid, kontaktläätsede pindu (olles nii silmapõletiku tekitajaks) ja põhjustada kroonilisi infektsioone nagu krooniline obstruktiivne kopsuhaigus, endokardiit, kuseteede infektsioonid ja periodontiit (Licker 2017, Jamal *et al.* 2018).

Toiduainetetööstustes esinevad biokiled võivad põhjustada suuri hügieeniprobleeme. Biokile kogub tolmu, pinnaseosakesi, orgaanilisi jääke ja spore (Gilbert *et al.* 2003). Biokiled moodustuvad tihti põrandatel, kanalisatsioonil ja seadmetel, mis omakorda võib põhjustada toodete ristsaastumist. Tööstustes tuleks biokile teket vältida, kuna selle eemaldamine ja hävitamine on päris raske protsess. (Brooks 2009)

Biokile areng on mitmeastmeline, koosnedes viiest osast (joonis 2) (Monroe 2007).



Joonis 2. Biokile moodustumine viies etapis (allikas: Eterska 2017).

Esimeses etapis kinnituvad mikroobid pinnale. Toimub pöörduv kinnitumine, see tähendab, et bakterid võivad pinna jätta ja naasta vabasse olekusse (Armbruster, Parsek 2018). Teine on rakk-rakk agregatsioon ehk bakterite kogunemine. Seda etappi nimetatakse pöördumatuks kinnitumiseks, kus bakterid moodustavad tugeva sideme pinnaga ja hakkavad seal paljunema. Pöördumatult kinnitunud biokile on raskem eemaldada, kuna see talub hästi nii füüsilist kui ka keemilist mõju. (Garrett *et al.* 2008) Kolmandas etapis toimub biokile moodustumine. Bakterid moodustavad mikrokolooniad, tekib maatriks, mis kaitseb

baktereid antibiootikumide, raskmetallide, ultraviolettkiirguse ja algloomade eest (Monroe 2007). Maatriks koosneb eksopolüsahhariididest, nukleiinhapetest, lipiididest ja valkudest (Flemming, Wingender 2010). Neljandas etapis biokile küpseb – toimub biokile struktuuride ja toitainekanalite moodustumine ning tekib suur bakterite kogum, mis on kaetud maatriksiga (Donlan 2001). Viimane, viies, etapp on bakterite vabanemine biokilest. Bakterid võivad biokilet jätta paljude põhjuste tõttu, milleks on näiteks toitainete puudumine, suur konkurents ja liiga tihe populatsioon. Vabanenud bakter võib moodustada uue biokile või liituda teise biokilega. (Rabin *et al.* 2015)

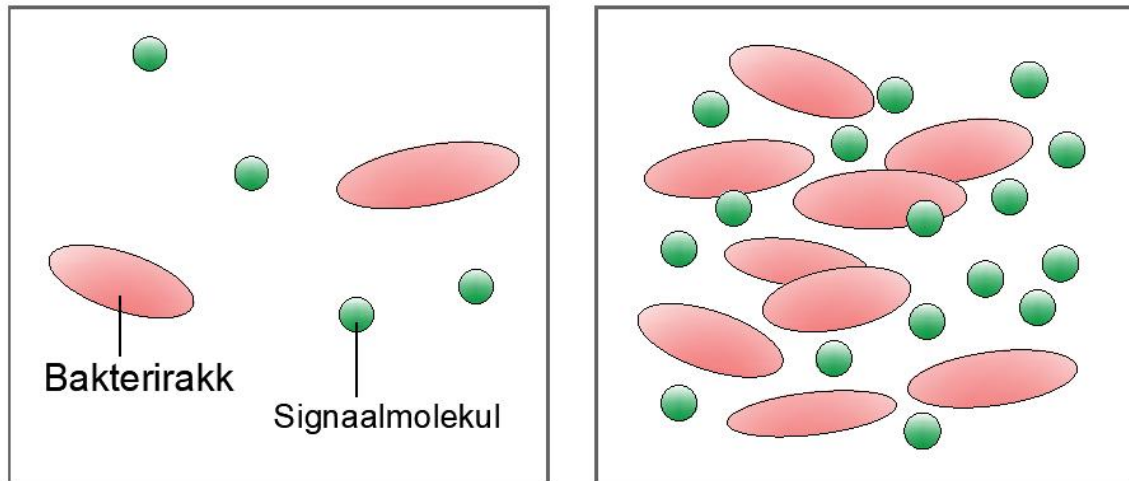
1.2. Kvoorumtunnetus

Kvoorumtunnetus (KT) on nii bakterite kommunikatsiooniviis kui ka bakterite ellujäämisstrateegia (Miller, Bassler 2001). Võrreldes KT mitteomavate bakteritega KT mehhanisme omavad bakterid tajuvad paremini keskkonnamuutusi ja adapteeruvad uutes tingimustes – selle abil bakterid paljunevad, moodustavad biokilet ja toodavad antibiootikume (Skandamis, Nychas 2012). Rakk-rakk kommunikatsioon hõlmab hormoonimolekulide tootmist, nende vabanemist rakust, signaali tuvastamist ja sellele reageerimist. Rakkude poolt toodetud keemilised signaalid läbivad teiste bakterirakkude membraani difusiooni teel. Signaale võivad tunda nii sama bakteriliigi liikmed, kui ka teise sugukonda kuuluvad bakterid. (Kent 2010; Miller, Bassler 2001)

Bakterid kasutavad kvoorumtunnetust biokile pöördumatu kinnitumise faasis. Signaalide abil võivad nad kutsuda uusi bakteriliike biokillesse liitumiseks (Skandamis, Nychas 2012). Biokiles olevad bakterid hakkavad teatud tiheduse saavutamisel saatma teineteisele signaalmolekule, mis annab võimaluse moodustada bakteriaalseid kooslusi. Mittepatogeensete bakterite poolt moodustatud biokile võib sisaldada patogeenseid tüvesid, mis läbi biokile soodustab patogeenide ellujäämist. (Tutelyan *et al.* 2019; Solano *et al.* 2014) Signaalide uurimine aitab tuvastada patogeenide esinemist ning vältida toiduriknemist (Skandamis, Nychas 2012).

Eristatakse nelja rakk-rakk signaalmolekuli: autoinduktor-1 (AI-1), autoinduktor-2 (AI-2), autoinduktor-3 (AI-3) ja polüpeptiidid. Gram negatiivsed bakterid kasutavad signaalmolekule autoinduktoreid. Gram positiivsed bakterid suhtlevad oligopeptiidide abil

(Bai, Rai 2011). Autoinduktorite abil jälgivad bakterid oma populatsiooni ja tunnetavad muutusi geenide ekspressioonis (Rutherford, Bonnie 2012). Rakk-rakk kommunikatsiooniks vajavad bakterid lähedast kontakti. Mida rohkem bakterid saadavad autoinduktoreid, seda tihedam on populatsioon. Signaal hajub läbi raku membraani, järgmiselt see aktiveerib reguleeriva valku ja seob DNA-ga. Pärast ilmuvad uued autoinduktorid ja protsess toimub uuesti. (Bassler 1999)



Joonis 3. Bakterirakkude tiheduse seos signaalmolekulide hulgaga (Quorum sensing in bacteria 2018 põhjal).

Joonis 3 illustreerib bakterirakkude ja signaalmolekulide tiheduse võrdlust. Madalama bakterirakkude tiheduse korral on signaalmolekulide kontsentratsioon väiksem kui suure rakutiheduse puhul (Quorum sensing in bacteria 2018).

1.2.1. Kvoorumtunnetuse signaalid toiduainete tööstuste biokilledes

Maailmas on läbi viidud palju uuringuid kvoorumtunnetuse signaalidest toidus – nende uuringute eesmärk on olnud tuvastada KT signaale riknenud toidus ja uurida millised bakterid neid saadavad (Kendall, Sperandio 2007). Peamiselt kasutavad toidu riknemist põhjustavad bakterid AI-1 ja AI-2 signaale (Ammor *et al.* 2008). Signaalid esinevad nii piima, liha kui puuviljade biokilledes (Bruhn *et al.* 2004).

Gram negatiivne bakter *Pseudomonas* spp. toodab piimas kvoorumtunnetuse signaalide alusel lipaase ja proteaase (Stepaniak 2004). Gram positiivne psührotroofne aeroobne

Bacillus spp. toodab kvoorumtunnetussüsteemi atsüül-homoseriinlaktooni (AHL) abil piimatoodetes fosfolipaase, mis põhjustavad toote riknemist (Ammor *et al.* 2008) ning *Serratia proteamaculans* toodab sarnasel moel lipolüütilisi ja proteolüütilisi ensüüme (Christensen *et al.* 2003).

Pseudomonas spp. põhjustab liha riknemist aeroobsete tingimuste (3- 8 °C) juures (Jay *et al.* 2003, Stellato *et al.* 2017). 2007. aastal Kanada toiduohutuse instituudis tuvastati aeroobsetes tingimustes jahutatud veiselihas AHL-signaale, mida produtseerisid sugukonnad *Pseudomonadaceae* (10^8 - 10^9 PMÜ/g) ja *Enterobacteriaceae* (10^3 - 10^4 PMÜ/g) (Lui *et al.* 2007).

Ashtowni toidu uurimiskeskuses tuvastati 2009. aastal AHL signaale värskes hakklihas, mida oli säilitatud modifitseeritud atmosfääris 5, 10, 15, ja 20 °C juures. Maksimaalne AHL tootmine oli 10 ja 15 °C juures – signaale tootsid sugukondade *Enterobacteriaceae* ja *Pseudomonadaceae* liikmed (Doulgeraki *et al.* 2011).

2003. aastal tuvastati Taanis AHL signaale mitmesugustes riknenud kalatoodetes nagu suitsutatud lõhe, kalafilee ja kala hakkliha. Leiti, et vaakumpakendatud külmsuitsutatud lõhe puhul on riknemise põhjuseks *Enterobacteriaceae* ja *Carnobacterium sp.* ja *Lactobacillus sp.* (Jørgensen *et al.* 2003). *Enterobacteriaceae* sugukonna liikmed põhjustavad ensümaatilist pruunistumist, lõhna- ja maitsevigu ning riknemist puuviljades, kasutades selle juures AHL signaale (Grumezescu, Holban 2017:93).

Kõik nimetatud ja mitmed muud uuringud tõestavad AHL signaalide seost toidu riknemisega (Bai, Rai 2011). Teiselt poolt võib kvoorumtunnetus olla kasulik toidu tootmises. Näiteks veini valmistamisel saadavad pärmseened kvoorumtunnetuse signaale teistele mikroorganismidele, mõjutades seeläbi käärimisprotsessi ja seeläbi ka veini maitset (Avbelj *et al.* 2016). Piimhappebakterid kasutavad kvoorumtunnetust piimatoodete fermenteerimisel. Kui bakterite tihedus ületab teatud künnise, toimub rakkude lüüs ehk orgaaniliste struktuuride lagunemine lagundava aine toimel (Pag *et al.* 2016)

Biokilede mikroobikoosluse ja kvoorumtunnetuse uurimiseks on kasutusel erinevaid meetodikaid ja seadmeid. Kõige levinumad on: molekulaarne meetod PCR, biokeemilised testid (massispektromeetria, vedelikkromatograafia, gaaskromatograafia) ja biosensorite kasutamine (Anbazhagan *et al.* 2012). Neist esimene, polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR, *polymerase chain reaction*, ingl. k.) meetod põhineb nukleiinhapete järjestuste

kordistamisel. Meetodi põhiline eeslis on, et see võimaldab luua miljoneid koopiaid väga väikesest DNA kogusest. PCR meetodil paljundatakse DNAd polümeraasi, praimeripaaride ja nukleotiidide kasutamise abil reaktsioonisegus. Praimeripaarid on *in vitro* sünteesitud spetsiifilised lühikesed nukleotiidsed järjestused. (Walker-Daniels 2012; Valasek, Repa 2005) PCR meetodiga saab tuvastada ka mikroorganismide gene, mis on seotud biokile sünteesiga. Näiteks stafülokokke sisaldavas biokiles on enim uuritud komponent polüsahhariidne intertsellulaarne adhesiin PIA, mida kodeerib *icaADBC* operon. (Oliveira, Cunha 2010).

1.3. Biokilede mikrobiota

Biokiles võivad esineda mitmed erinevad mikroobiliigid nii patogeensed kui ka mittepatogeensed ning hallitus- ja pärmseened, (Kunicka-Styczyńska 2017). Samas biokiles esinevad nii Gram positiivsed kui ka Gram negatiivsed bakterid (Misba *et al.* 2017). Võrreldes vabalt esinevate mikroorganismidega, biokile koosluses olevad mikroobid toodavad rohkem metaboliite ja bioloogiliselt aktiivseid aineid. Biokiles muutub bakterite eluvõime ja käitumine. (Tutelyan *et al.* 2019) Biokile maatriksis olevad bakterid võivad muutuda patogeenseks, seal suureneb nende vastupidavus hävitamiseks kasutatavatele kemikaalide ja antibiootikumide suhtes (Gulgor, Korukluoglu 2017). Biokiles esinevate mikroobide uurimine on väga oluline, kuna bakterite seadmete ja toodete koloniseerimine ning biokile moodustumine põhjustab tihti hügieeniprobleeme ja toiduga seotud haigusi (Galié *et al.* 2018, Giaouris *et al.* 2012). Samas, mittepatogeensete biokile uurimine võib aidata kaasa tehnoloogiliste protsesside parendamisele (nt kääritamine, hapendamine) (Kawarai *et al.* 2007).

1.3.2. Mittepatogeensed mikroobid

Mittepatogeensed mikroorganismid ei põhjusta nakkushaigusi ega mürgistusi ning neid kasutatakse tihti toidu tootmises säilivusaja pikendamiseks ja toode lõhna, maitse, aga ka tekstuuri parandamiseks (Erten *et al.* 2014, Smith *et al.* 2004). Mittepatogeensed mikroorganismid moodustavad biokilet kääritatud toodete fermentatsiooni käigus.

(Furukawa 2015) Lisaks on teada, et mõnedel biokiles esinevatel mittepatogeensetel mikroorganismidel on antagonistlik mõju patogeenide suhtes. Kim *et al.* uurisid mittepatogeensete bakterite poolt roostevabal terasel tekkinud biokile omadusi ning tõestasid, et biokilest isoleeritud *Paenibacillus peoriae*, *Pseudomonas extremorientalis* ja *Streptomyces cirratus* omavad inhibeerivat toimet *Salmonella enterica* suhtes.

Alljärgnevalt on toodud mõned näited mikroorganismidest, mis on ohutud inimorganismile ning mis võivad olla kasulikud toidu tootmisprotsessis.

Pärmseened

Pärmseentel on oluline roll piima-, jookide- ja pagaritööstuses, osaledes käärimises ning andes tootele lõhna, maitset ja struktuuri (Erten *et al.* 2014). Tänapäeval on tuvastatud rohkem kui 1500 pärmseente liiki (Dujon, Louis 2017), kellest kõige tuntumad on *Saccharomyces cerevisiae* ja *Schizosaccharomyces pombe*, keda kasutatakse leiva ja jookide kääritamisel (Kurtzman, Piškur 2005). Piimatööstuses kasutatakse pärme enamasti juustu ja hapendatud jookide tootmises (nt keefir) (Erten *et al.* 2014). Loodudes esinevad pärmseened rohkem suhkrurikastes substraatides nt puuviljades ja lillede nektarites (Romano *et al.* 2006). Pärmseeni kasutatakse biotehnoloogias ensüümide ja toidulisandite tootmiseks (Jach *et al.* 2015). Geenitehnoloogias neid kasutatakse mudelorganismidena katsete läbiviimiseks (Botstein *et al.* 1997). Pärmseened moodustavad biokilet toidu käärimise käigus, näiteks moodustavad pärmid ja piimhappebakterid biokilet äädika naturaalse käärimise käigus (Kawarai *et al.* 2007). Furukawa (2015) oma uuringus leidis, et pärmide ja piimhappebakterite segakultuurid moodustavad biokilet intensiivsemalt kui puhaskultuurid. Lisaks on leitud, et intensiivne biokile moodustumine toimub *Lactobacillus casei* ja *Saccharomyces cerevisiae* koostoimel.

Piimhappebakterid

Piimhappebakterid (LAB, *lactic acid bacteria* ingl. k.) on Gram positiivsed anaeroobsed või fakultatiivselt anaeroobsed, liikumisvõimetud ja spore mittemoodustavad bakterid, kes anaeroobsetes tingimustes osalevad käärimises, produtseerides piimhapet (Hatti-Kaul *et al.* 2018). LAB saavad energiat suhkru metabolismist, mistõttu vajavad nad ellujäämiseks suhkrurikast keskkonda (Furukawa 2015). Tööstuslikult kasutatakse piimhappebaktereid nt piimatööstuses, kus LAB lisatakse tootele juuretisena hapendatud toodete tootmiseks ning kus käärimisel annavad bakterid tootele tekstuuri, lõhna ja maitse (Erten *et al.* 2014). Toidus

inhibeerivad LAB sinna mittesobivaid mikroobe mis aitab vältida toidu riknemist (Todar 2008).

Toidu kääritamiseks kasutatakse tihti *Lactobacillaceae* ja *Leuconostococcaceae* liike. Piimatööstuses kasutatakse peamiselt piimhappebaktereid *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* ja *Lactobacillus casei* (Hatti-Kaul *et al.* 2018). Mitmed piimhappebakterid on probiootikumid, rikastades soolestikule kasulikku mikrobiootat (Ljungh, Wadström 2006). Probiootilised tooted võivad olla nt keefir, jogurt, teeseenejook. (Erten *et al.* 2014) Võrreldes vabalt esinevate bakteritega, biokiles esinevad probiootilised piimhappebakterid on vastupidavamad temperatuuri, maohappe ja mehhanilise toime suhtes. Mõned piimhappebakterite liigid võivad aga põhjustada õlle, veini ja töödeldud liha riknemist (Rowland *et al.* 2010).

Hallitusseened

Hallitusseeni kasutatakse hallitusjuustu tootmiseks. Camemberti juust valmistamiseks lisatakse piimale hallitusseente liike *Penicillium candidum* ja *Penicillium camemberti* ja laagerdatakse 2 nädala jooksul. Valminud juust on tavaliselt kaetud valge hallitusega, andes juustule ainulaadse maitse, lõhna ja tekstuuri (Jackson, Dobson 2011). Kaua valmivate juustude pinnal tekib tihti koorik ehk sisuliselt biokile, mis koosneb toorpiimast, starterkultuurist ja mõnikord võõrmikrobiootast pärinevatest mikroobidest ja hallitusseentest (Wolfe *et al.* 2014).

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis on aeroobne Gram positiivne bakter, kes tavaliselt elab mullas, vees, loomade ja inimeste seedetraktis (Beranová *et al.* 2010). *B. subtilis* on võimeline moodustama resistentseid endospore, mis kaitsevad bakterit ekstreemsetes keskkonnatingimustes (Earl *et al.* 2018). Optimaalne kasvutemperatuur on neil 25-35 °C ning sobiv pH 5,5-8,5 (Ucar, Pogliano 2015).

B. subtilis't ei liigitata inimese patogeeniks, kuid bakter on seotud toidu riknemisega (Gopal *et al.* 2015). Samuti on teada mitmeid bakteri poolt põhjustatud toidumürgistuse juhtumeid. Toidus on *B. subtilis* võimeline tootma tsütotoksilisi ühendeid. (Phelps, Mckillip 2002) Tärkliserikka toidu tarbimine vegetatiivsete rakkude sisaldusega $<10^5 \text{ g}^{-1}$ võib põhjustada enteriiti ja oksendamist (Fratamico *et al.* 2009: 273). Mõned *B. subtilis*'e tüved on

võimelised moodustama biokilet toorpiimas (Elegbeleye, Buys 2020). Bakter soodustab piimavalgu käärimist, mille tulemusel tekib kibe maitse ning toode kaotab oma maitseomadusi. (Ucar, Pogliano 2015). Bakteriaalse saastumise allikaks on tihti piimatankid, sest tanki pinnal võib bakter samuti biokilet moodustada (Elegbeleye, Buys 2020). *B. subtilis* on sageli seotud pagaritoodete, eriti nisuleiva riknemisega (Saranraj, Sivasakthivelan 2015).

B. subtilis't kasutatakse mudelorganismina biokile moodustumise uurimisel (Lemon *et al.* 2008). Biotehnoloogias kasutatakse bakterit amülaasi ja proteaasi tootmiseks (Van Dijk, Hecker 2013). Veel kasutatakse *B. subtilis*'t farmakoloogias probiootikumi ja toidulisandina. Batsilluse spoorid on stabiilsed laias pH ja temperatuurivahemikus, mistõttu spoore sisaldav probiootikum on maohappele vastupidavam kui piimhappebakterid (Poormontaseri *et al.* 2007).

1.3.3. Patogeensed mikroobid

Mikroobe, mis inimese või looma organismi sattudes kutsuvad esile haigusi, nimetatakse patogeenideks. Suur osa neist toodavad mürkaineid ehk toksine (Casadevall, Pirofski 2014). Tööstuses mõjuvad patogeensed mikroobid negatiivselt tootmishügieenile ja toodete ohutusele (Brooks 2009). Suur osa patogeensetest mikroobidest on tugevad toidule ja seadmetele biokile moodustajad (Galié *et al.* 2018). Alljärgnevalt on toodud mõned näited patogeenidest, kellega toiduainetööstustes puututakse kokku kõige sagedamini.

Bacillus cereus

Bacillus cereus on anaeroobne või fakultatiivselt anaeroobne Gram positiivne bakter. *B. cereus* on võimeline moodustama kuuma, külma ja kemikaalide suhtes resistentseid spoore ning kasvama erinevates keskkonnatingimustes (Galié *et al.* 2018). Kui mikroobi spoor satub soodsasse keskkonda, siis areneb see vegetatiivseks vormiks. Spoorid, olles anabioosiseisundis, ei ole aga täielikult inaktiveeritud ning võivad kutsuda esile muutusi toiduainetes erinevate ensüümide toimel (Warda *et al.* 2016). Osad *B. cereus* tüved on külmatolerantsed ning on võimelised kasvama temperatuuril 4-5 °C, teised on aga mesofiilsed ning kasvavad temperatuuridel 15-50 °C (Wirtanen, Salo 2016:55). Tüvedel on ka erinev happetolerantsus, kuid üldiselt ei kasva nad keskkonnas, kus pH >4,8 (Soni *et al.*

2018). *B. cereus* on kuumuse, keemilise töötlemise ja kiirguse resistentne (Galié *et al.* 2018).

Bakterit leidub piimas, aga ka teistes jookides nagu õlu ja vein (Kim *et al.* 2014). Kõige kiiremini paljuneb ta homogeniseeritud toodetes nagu hakkliha, lihapallid, vorstid, kreemid. Piimas ja toores lihas on lubatud *B. cereus* hulk kuni 100 PMÜ/g; konserveeritud toidus *B. cereus* esinemine pole lubatud. (Baron 1996) *B. cereus* võib moodustada biokilet nii toidul kui ka roostevabades tankides ja torustikutes. Toitu sattudes produtseerib *B. cereus* toksiine, mis inimese organismis põhjustavad mürgistust. Esmase mürgistuse põhjustavad erinevat tüüpi enterotoksiinid (NHE, HBL, bc-D-ENT) ning hilisem mürgistus jätkub bakterite paljunemisega soolestikus (Fagerlund *et al.* 2008). Mürgistuse sümptomid on kõhulahtisus, kõhuvalu, oksendamine, suur veetustumine, mis võib kesta 4 kuni 6 päeva (Galié *et al.* 2018).

Bacillus cereus gruppi kuuluvad seitse liiki: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis* ja *B. cytotoxicus* and. Molekulaarse uuringu abil on neid liike omavahel sarnase genoomi tõttu raske eristada. (Oliwa-Stasiak *et al.* 2009)

Escherichia coli

Sugukonda *Enterobacteriaceae* kuuluv *Escherichia coli* on mesofiilne, fakultatiivselt anaeroobne Gram negatiivne bakter, optimaalse kasvutemperatuuriga 37 °C (alla 5 °C ei kasva) (Lim *et al.* 2010). *E. coli* on võimeline kasvama kuni 6%-lise soolakontsentratsiooni juures (Metris *et al.* 2014). *E. coli* elab põhiliselt imetajate soolestikus. Suurem osa bakteritest on organismile ohutud, kuid leidub haigust tekitavaid tüvesid, millest mõni võib põhjustada raskeid ja eluohtlikke kõhulahtisusi (Lim *et al.* 2010). Patogeenid võivad esineda joogivees, puuviljades, köögiviljades, toorpiimas ja värskes lihas (Seongbeom *et al.* 2006). *E. coli* võib moodustada biokilet roostevabal terasel, klaasil ja polüpropüleenil, olles resistentne nii kõrgele temperatuurile kui ka rõhule (Galié *et al.* 2018, Carter *et al.* 2016).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes on fakultatiivselt anaeroobne Gram positiivne bakter, kes võib esineda mereandides, piimatoodetes, lihas, valmistoidus, puuviljades ja külmutatud köögiviljades (Galié *et al.* 2018). *L. monocytogenes* on ohtlik patogeen, kes võib põhjustada listerioosi, mis ohustab eelkõige rasedaid ja immuunpuudulikkusega inimesi (Colagiorgi *et*

al. 2017). Nakatumise sümptoomid on iiveldus, palavik, kõhulahtisus (Farber, Peterkin 1991).

L. monocytogenes biokile võib moodustuda polüpropüleenil, terasel, kummil ja klaasil. Eripäraks on, et bakter jääb ellu madalal temperatuuril, mistõttu võib ta esineda külmutatud toodetes, nt jäätises (Galié *et al.* 2018). Optimaalne paljunemistemperatuur on 37 °C, aga bakter võib kasvada laias temperatuurivahemikus 1-45 °C ning pH väärtusel 4,1-9,6 (Tienungoon *et al.* 2000). Nii võib *L. monocytogenes* püsida toiduainetes eluvõimelisena pikka aega (Colagiorgi *et al.* 2017). Erinevad uuringud näitavad, et Gouda juustus püsib bakter 6 nädalat (Northolt *et al.* 1988), Feta juustus 4 °C juures rohkem kui 90 päeva (Papageorgiou, Marth 1989), jogurtis 4 °C juures 12 päeva ja petis kuni 13 nädalat (Schaack, Marth 1988). On teada, et kuivadel tellispindadel võib *L. monocytogenes* püsida 20-30 päeva (Snelling *et al.* 1991). Bakteri parim hävitamisviis piimatoodetes on pastöriseerimine (Galié *et al.* 2018).

Salmonella enterica

Salmonella enterica on fakultatiivselt aeroobne Gram negatiivne bakter. Salmonellabakter on üks ohtlikumatest toiduga ülekanduvatest patogeenidest (Andino, Hanning 2015). *S. enterica* serotüübid põhjustavad salmonelloosi, mille sümptomid on iiveldus, kõhulahtisus, palavik ja kõhuvalu (Voetsch *et al.* 2004). Kõige levinumad nakkusallikad on linnuliha ja munad (Cianflone 2008). 2018. aastal Euroopa Liidus oli registreeritud 91 857 salmonelloosi haigusjuhtumit, suurem osa neist oli seotud saastunud munade tarbimisega (Salmonella the most common...2019). *Salmonella* spp. on kõige sagedamini registreeritud patogeen loomse päritoluga toidu tootmisahelas, mille enim levinud serotüübid on *Salmonella* Enteritidis ja *Salmonella* Typhimurium (Afshari *et al.* 2018).

Salmonellabakter saab moodustada biokilet roostevabal terasel ja töötlemata metallil, kuid mitte klaasil (Galié *et al.* 2018). *S. enterica* on võimeline ellu jääma väga kuivas keskkonnas (Kim *et al.* 2012). Bakterit ei ole võimalik hävitada madala temperatuuriga – parim hävitamisviis on UV-kiirgus ja kuumtöötlemine (75 °C 10 minuti jooksul) (Beuchat, Heaton 1975), millele peab järgnema hügieeniline jahutamine (Kim *et al.* 2012).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus on fakultatiivselt anaeroobne Gram positiivne bakter, kes ei moodusta spore ega pole liikuv (Galié *et al.* 2018). *S. aureus* esineb inimese normaalses

mikrobiotas, kuid nõrga immuunsüsteemi korral võib ta põhjustada mitmeid haigusi (kopsupõletik, angiin, toksilise šoki sündroom) (Taylor, Unakal 2018). *S. aureus* tüved on võimelised tootma erinevate antigeensete omadustega stafülokokkide enterotoksiine (SE) (Al-Bahry *et al.* 2014), mis on suhteliselt lihtsad termostabiilsed valgud molekulmassiga vahemikus 25-35 kDA ning mis põhjustavad toidumürgistust (Fries, Varshney 2013). Lisaks produtseerib *S. aureus* ensüüme nagu DNA-aas, hemolüsiinid, lipaasid ja fibrinolüsiin, mis osalevad SE sektretsioonis (Al-Bahry *et al.* 2014). SEde esinemine toidus on peamine *S. aureuse* 'ga seotud mürgistuse põhjus. Infektsioonil on väga lühike inkubatsiooniperiood – 0,5-8 tundi ning nakatumise sümptomid on iiveldus, oksendamine, kõhukrambid ja kõhulahtisus (Argudín *et al.* 2010, Al-Bahry *et al.* 2014).

Bakteri optimaalne kasvutemperatuur on 30-37 °C, kuid ta võib kasvata vahemikus 7-48 °C, produtseerides toksiiine temperatuuril 10-46 °C. Kasvuks optimaalne pH on stafülokokil 7,0-7,5 (Missiakas, Schneewind 2013). Keetmisel stafülokokk hukkub, kuid tema termostabiilsed toksiiinid ei lagune (Fries, Varshney 2013). Bakterile sobib kasvuks madal veeaktiivsus ja kõrge suhkru- ning soolasisaldus toidus – stafülokokke leidub lihas, mereandides, munades, salatites, piima- ja kondiitritoodetes (Argudín *et al.* 2010). *S. aureus* saab moodustada biokilet nii biotilisel, kui ka abiotilisel pinnal, ehk elavas organismis (inimene ja loom) ja eluta keskkonnas (tööstuslikud seadmed) (Galié *et al.* 2018).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae on *Enterobacteriaceae* sugukonda kuuluv fakultatiivselt anaeroobne liikumatu Gram negatiivne pulkbakter ning on ümbritsetud polüsahhariidse kapsliga, mis kaitseb bakterit peremeesorganismi immuunsüsteemi eest (Ashurst, Dawson 2020). Bakter esineb tavaliselt mullas, taimedes ja vees (Qureshi 2017), kuid teda leidub ka inimorganismi soolestiku loomulikus mikrobiotas, põhjustades nõrgenenud immuunsüsteemiga inimestel nt. kopsupõletikku, haavainfektsioone, põiepõletikku või kõhulahtisust (Batt, Tortorello 2014:383). *K. pneumoniae* optimaalne kasvutemperatuur on 35-37 °C ja pH umbes 7,2 (Ristuccia, Burke 1984).

Varasemalt ei ole *K. pneumoniae*'t peetud toidu kaudu levivaks patogeeniks (Guo *et al.* 2016), kuid hiljutised uuringud näitavad, et antibiootikumiresistentsed *K. pneumoniae* tüved võivad esineda värsketes köögiviljades (Falomir *et al.* 2003), mereandides (Nawaz *et al.* 2012), lihas (Batt, Tortorello 2014:384) ja pagaritoodetes (Deshwa, Sharma 2017). Toidus

on bakter võimeline tootma nii soojuslabiilseid, kui ka termostabiilseid enterotoksiine (Boutin *et al.* 1986, Mousse *et al.* 2016).

Koduloomad nagu lehmad ja hobused on peamised *Klebsiella* liikide kandjad, mis võimaldab toorpiima ja liha saastumist, samas kui bakteri esinemine kuumtöödeldud (sh pastöriseeritud) toodetes viitab sanitaarnõuete rikkumisele tööstuses (Flynn 2015). *Klebsiella* perekonna liigid põhjustavad toidu riknemist, tootes lipaase ja proteaase ning moodustades biokilet toidu pinnal (Batt, Tortorello 2014:384-385). Mõned tüved on võimelised kohanema madalale temperatuurile ning paljunema ja saastama toitu külmkapis, bakter hävib aga 55 °C juures 30 minutiga (Anand *et al.* 2020).

Hallitusseened

Hallitusseente areng toidus on majanduslikult suureks probleemiks toiduainetetööstustele (Dagnas, Membre 2013). Hallitusseened on hulkraksed eukariootsed mikroorganismid, kes elavad abiootilisel pinnal, vees ja taimsetes või loomsetes organismides (Warnock 2012). Niisketes piirkondades hallitusseened moodustavad biokihte, mis võivad põhjustada toidu sekundaarset saastumist. Biokiles elavad hallitusseened on vastupidavamad tõrjeks kasutatavate biotsiidide toime suhtes (Costa-Orlandi *et al.* 2017). Maailmas on teada rohkem kui 100 000 hallitusseente liiki (Morey, Feeley 2011:101). Hallitusseened produtseerivad spoores, mis levivad õhu ja vee kaudu. Kasvamiseks vajavad hallitusseened niiskust ja toitaineid (toit on väga hea keskkond seente arenguks, kuna see on veerikas ja seda hoitakse tihti mikroorganismidele sobivates tingimustes) ning optimaalne temperatuur hallitusseente kasvuks on 25-35 °C (Sharma *et al.* 2016). Hallitusseened paljunevad hästi happelistes toodetes nagu puuviljad, mahlad, piimatooted ja keskmise niiskusega toodetes (pagaritooted) (Moss 2008). Toitu sattudes toodavad seened spoores, hüdrofüütilisi ensüüme ja toksiine, mis põhjustavad toidu riknemist ja toidumürgistusi (Paterson, Lima 2017). Peamiselt leidub mükotoksiine teraviljatoodetes, pähklites, kuivatatud puuviljades ja seemnetes (Baquião *et al.* 2013; Balendres *et al.* 2019). Mükotoksiinide suurte koguste söömisel võivad tekkida näiteks maksa- või neerukahjustused, raskematel juhtudel võivad mürgistused lõpetada surmaga (Omotayo *et al.* 2019).

Pärmseened

Pärmseened ehk pärmid on eukariootsed mikroorganismid suurusega 3-40 µm (Walker *et al.* 2002). Sobivates tingimustes toodavad nad metaboolseid aineid ja ensüüme, mis põhjustavad toidu riknemist (Dujon, Louis 2017). Ensüümid põhjustavad toote kiiret

küpsemist ja üleküpsemist (Erten *et al.* 2014). Pärmid suudavad kasvada happelises keskkonnas (pH 4,5-5,5) ja madala temperatuuri juures (5-10 °C), optimaalse kasvutemperatuuriga 25-30 °C (Arroyo-López *et al.* 2009). Kõige sobivamad on suure niiskusega kasvukeskkonnad (juurviljad, puuviljad) (Fleet, Praphailong 2001).

Mõned pärmseente perekondade liigid on inimestele patogeensed (nt *Candida albicans*) ning võivad põhjustada seenhaigusi (Kumamoto 2002). *Candida* spp. tüved on võimelised moodustama biokilet nii biotilistel kui ka abootilistel pindadel, põhjustades paljudes tööstusharudes olulisi probleeme ja ohustades inimeste tervist. Biokiles olevad pärmseened on vastupidavamad seenevastaste keemiliste ühendite ja keskkonnamuutuste suhtes (Targalska, Kunicka-Styczyńska 2017; Kumamoto 2002). *Candida* sp. poolt moodustatud biokile võib ulatuda 25–450 µm läbimõõduni (Rosseti *et al.* 2015).

1.4. Biokile toiduainete tööstuses

Kõik toiduained on sobivaks keskkonnaks bakteritele ning hallitus- ja pärmseentele, mistõttu biokile olemasolu toiduainetetööstuses on väga levinud ja seda on sealt raske täielikult eemaldada. Biokile võib esineda erinevatel pindadel, alates plastikust, klaasist, metallist ja puidust, tekkides tavaliselt märja ja kuiva pinna piirile (Frank 2001). Biokile olemasolu mõjutab sageli toiduohutust – eriti suureks riskiks on minimaalselt töödeldud ja värsked toiduained (värске liha, kala, piim, puuviljad), mis ei läbi termotöötlust (Bai, Rai 2011). Jahutatud liha esimeseks riknemistunnuseks on tavaliselt lima tekkimine liha pinnale – pind muutub kleepuvaks, halveneb liha lõhn ja värvus (Wang 2019). Giaouris *et al.* 2012 väitsid, et seadmetel biokile maatriksi moodustanud *Listeria monocytogenes* ja *Salmonella* spp. võivad olla suurte hulga toidutoodete nakatamise allikaks.

Biokile mõjutab negatiivselt tööstuslike torustike tehnilisi näitajaid ja põhjustab ummistusi torustikes. Mõned bakterid on võimelised hävitama metalli, mis toob esile vajaduse kasutada antibakteriaalseid aineid (Galié- *et al.* 2018). Biokile põhjustab süsteemide kulumist ja riknemist ning võib saastada terve tootmisliini (Brooks 2009). Biokile võib moodustuda pakkematerjalil ja sel viisil toitu saastada (Bai, Rai 2011). Biokile võib saastada ka joogiveesüsteeme, mis põhjustab veekvaliteedi alanemist (Mahapatra *et al.* 2015).

Biokile mõju võib olla nii kahjulik, kui ka kasulik. Bakterid osalevad mõnede toodete valmistamisel, annavad maitset, lõhna ja värvust (Erten *et al.* 2014). Biokile soodustab proteolüüsi ehk valkude lagunemist lahustuvateks ja organismile omastatavateks aineteks (Caplice, Fitzgerald 1999).

Üks näide biokile kasutamisest toiduainete tööstuses on teeseenejook ehk kombucha tootmine. Teeseenejoogi valmistamiseks kasutatakse kombucha kultuuri, mida pannakse suhkrustatud tee sisse viimase kääritamiseks. Käärimise protsessis osalevad erinevad äädikhapetbakterid ja pärmseente omavahelises sümbioosis olevad kultuurid, moodustades tselluloosikihi, mille külge edaspidi kinnituvad bakterid ja seened. (Jayabalan *et al.* 2014; Talawat *et al.* 2006).

Biokile kasutatakse vee ja reovee puhastamiseks. Inglise insenerid töötasid välja filtri biokilega, mis “sööb” vees olevaid kahjulikke aineid (Seha, Naz 2016).

Biokile tekib oliivide naturaalse käärimise protsessis ning koosneb erinevatest pärmseentest ja piimhapetbakteritest, mis saavad dominantseks mikrobiotaks ja kaitsevad sel viisil puuvilja patogeenide eest (Gulgor, Korukluoglu 2017).

Seega võib biokile mõjuda toidu tootmisele nii positiivselt kui ka negatiivselt. Biokilega seotud aspektid on toiduainetetööstuses oluline uurimisvaldkond, mis võib kaasa aidata patogeenide vältimisele ja toodete kvaliteedi tõstmisele.

1.4.1. Biokile leivatööstuse seadmetel

Mikrobioloogiline saastumine on peamine tegur pagaritoodete säilivusaja vähenemisel, põhjustades suure majandusliku kahju tootjatele ja luues ohtu tarbija tervisele. Saastumine võib juhtuda erinevates leiva tootmisetappides, nt töötlemisel, pakendamisel või ladustamisel (Saranraj, Geetha 2012). Pagaritööstuste seadmeid katvatest biokiledest on lisaks pagaritoodete riknemist soodustavatele mikroobidele tuvastatud ka rida patogeenseid või potentsiaalselt patogeenseid mikroorganisme (tabel 1).

Bacillus spp. põhjustab leiva mikrobioloogilist riknemist ning kvaliteedi langemist, kuna produtseerib kuumakindlaid spore, mis jäävad ellu isegi pärast leiva küpsetamist (Jääskeläinen *et al.* 2002). Mikrobioloogilise saastumise tõttu omandab leib imeliku

puuviljalõhna, mis sarnaneb üleküpsenud meloni lõhnaga (Saranraj, Sivasakthivelan 2015). Hiljem muutub leib väga pehmeks, kleepjaks ja söödamatuks. Leiva struktuuri muutumine on tingitud biokilest, mille moodustavad *Bacillus*'e eosed proteolüütiliste ensüümide abil (Saranraj, Geetha 2012). *Bacillus subtilis* ja/või *B. licheniformis* kõrge arv tootes võib põhjustada ohtliku toidumürgistuse (Pepe *et al.* 2003).

Tabel 1. Leivatööstuse seadmete biokiles tuvastatud patogeensed mikroorganismid

| Perekond | Liik | Autor(id) |
|-----------------------|--|------------------------------------|
| <i>Staphylococcus</i> | <i>aureus</i> | Adesetan jt. 2013 |
| <i>Bacillus</i> | <i>cereus</i> <i>subtilis</i> | Adesetan jt. 2013 |
| <i>Aspergillus</i> | sp. | Roessler, Ballenger 1996 |
| <i>Penicillium</i> | sp. | Viljoen ,Von Holy 1997 |
| <i>Listeria</i> | <i>monocytogenes</i> <i>welsimeri</i> | Blatter jt. 2010 |
| <i>Gluconobacter</i> | sp. | Scheirlinck jt. 2009 |
| <i>Enterococcus</i> | sp. | Scheirlinck jt. 2009 |
| <i>Lactobacillus</i> | spp. | Scheirlinck jt. 2009 |
| <i>Escherichia</i> | <i>coli</i> | Dykes jt. 1991, Geornaras jt. 1996 |
| <i>Salmonella</i> | <i>enterica</i> | Evans jt. 1996 |
| <i>Micrococcus</i> | sp. | Viljoen ,Von Holy 1997 |
| <i>Pseudomonas</i> | sp. | Viljoen ,Von Holy 1997 |

Hallitusseened võivad samuti saastada seadmete pinda. Hallitusseened perekondadest *Aspergillus*, *Penicillium* ja *Cladosporium* on võimelised kiiresti kasvama õhus ja toiduga kokkupuutuvatel pindadel (Jarvis 2001). *Aspergillus* ja *Penicillium* toodavad leivas mükotoksiine, mis on ohtlikud inimeste tervisele (Omotayo *et al.* 2019). Leivatööstused kaotavad 1-5% oma toodangust hallitusseentega saastumise tõttu, protsent sõltub aastaajast ja toodete töötlemise tehnoloogiast (Saranraj, Geetha 2012).

Patogeenid kasvavad paremini küpsetuseelsete seadmete pinnal, kuna need puutuvad kokku niiskete toiduainetega (nt taigen, juuretis). Pärast küpsetamist omandab aga leib kõva ja kuiva struktuuri, mis on bakterite eluks halb keskkond ning mis takistab nende paljunemist (Viljoen, Von Holy 1997; Smith *et al.* 2004).

Pärmseened on veel üheks leiva riknemise põhjuseks. Pärmseened kasvavad sagedamini küpsetusjärgsete seadmete pinnal, kus saastumise allikateks on näiteks viilutusmasinad, jahutid ja lintransportöörid (Hocking 2008: 57-72). Leiva saastumist pärmseentega iseloomustab nähtav kasv toote pinnal (valged või kreemjad plekid) (Saranraj, Geetha 2012). Kõige rohkem probleeme põhjustav pärmseen leivatööstustes on *Pichia butonii*, mida tihti

nimetatakse “kriit hallituseks” – pärmseen kasvab leivas väga kiiresti, mille tulemusena tekivad valged plekid ja kõrvalaroomid (Hocking 2008: 57-72). Pärmseened toodavad CO₂ gaasi, mis põhjustab leivapakendi paisumist (Saranraj, Sivasakthivelan 2015).

Piimhappebakterite tõttu võib toimuda leiva tooraine saastumine (Hassan *et. al* 2008). Taina töötlemisega seotud seadmete hooletu puhastamine toob kaasa piimhappebakterite kasvu seadmete pinnal (Scheirlinck *et. al* 2009). Saastatud taina mikrobioota sisaldab enamasti liike *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* ja *Lactobacillus* perekonna liike (Remenant *et. al* 2015). Külmutatud tainast võivad saastada *Lactobacillaceae* sugukonna liikmed (Hassan *et. al* 2008). Heterofermentatiivsed piimhappebakterid toodavad tainas gaasi ja põhjustavad maitsevigu ning pakendi paisumist (Doyle, Sperber 2009: 235-236).

2013. aastal viidi Nigeerias läbi uuring, mille eesmärk oli identifitseerida baktereid, mis kasvavad erinevate pagaritööstuse seadmete seintel. Kokku oli steriilsete švammidega võetud 78 proovi nii küpsetuseelsete kui küpsetusjärgsete seadmete pindadelt. Proove võeti lõikamismasinaga, veski, mikseri, kaalude, laudade ja küpsetuspannade pinnalt. Tuvastati 3 patogeeni: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ja *B. cereus*. 66,7% seadmetest olid saastunud *S. aureus*'ga, 14,1% *B. subtilis*'ga, 7,7% *B. cereus*'ga ja vaid 11,5% olid täiesti puhtad. Uuringu järelduseks oli, et seadmete pinna saastumine *S. aureus*'ga oli tingitud tööstuste töötajate hügieenireeglite rikkumise tõttu. (Adesetan *et al.* 2013)

Eelnevates uuringutes on leitud, et pakendamislüüsi võib olla toodete saasteallikaks *E. coli*'ga. Bakter võib esineda erinevatel konveieritel, dosaatoritel ja ka pakkematerjali pinnal (Dykes *et al.* 1991, Geornaras *et al.* 1996).

Evans jt. (1996) leidsid, et salmonelloosi puhangu 1992. aastal Inglismaal põhjustas ebapiisav seadmete puhastus tööstuses, haiguse allikaks olid kondiitritooted. Uuring näitas, et dosaatori otsad, mida kasutati kreemikookide igapäevaseks valmistamiseks ei olnud korralikult pestud, mis põhjustas toodete ristsaastumist.

Roessler ja Ballenger (1996) uurisid, millised on küpsiste tootmisel potentsiaalsed hallituseentega saastumise allikad. Selleks oli võetud proovid õhust, seadmete ja toiduga kokkupuutuvate materjalide pinnalt. Uuringutulemused näitasid, et küpsiste saastumine kserofiilsete hallituseentega toimus jahutamise ajal linttransportööril. Ventilaatorid, mida kasutati küpsiste jahutamiseks, olid kaetud tolmu ja selle pinnaproovid sisaldasid kõrget mikroorganismide hulka, sealhulgas *Aspergillus* jt. hallituseente perekondade liike.

Scheirlinck jt. 2009. a. viisid läbi uuringu, mille eesmärk oli tuvastada, millised piimhappebakterid esinevad juuretises ja sellega kokku puutuvate seadmete pindadel kahes Belgias asuvas pagariettevõttes. Katsete käigus võeti pinnaproovid taina mikseritelt, lõikuritelt, rullimismasinalt ja kaaludelt. Autorid leidsid, et dominantsed *Lactobacillus* perekonna liikmed, mis esinesid seadmete pinnal olid *L. spicheri*, *L. plantarum* ja *L. sanfranciscensis*. Samuti tuvastati, et piimhappebakterid tsirkuleerisid tootmisruumi ja lao õhus. PCR analüüsid näitasid, et mõned proovid sisaldasid perekondade *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Gluconobacter* ja *Enterococcus* tüvesid.

Blatter jt. 2010 a. uurisid *L. monocytogenes*'e esinemist ühes Šveitsi võileibade tootja ettevõttes. Uuringu käigus koguti pinnaproovid steriilsete švammidega erinevate seadmete pindadelt nagu viilutajad, leivamasinad ja konveierid. Proove võeti enne ja pärast seadmete puhastamist. Kokku koguti 1779 proovi, millest *Listeria* spp. tuvastati 65 (3,7%) proovis. Enne seadmete puhastamist võetud proovides leiti 59 *L. monocytogenes* tüve ja üks *L. welshimeri* tüvi, samas kui pärast seadmete puhastamist võetud proovides identifitseeriti ainult 5 *L. monocytogenes* tüve.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et leivatööstuses on vajalik jälgida, et biokile ei moodustuks seadmete pinnal, kuna biokiles asuvad mikroorganismid võivad migreeruda toodetesse, põhjustades toidu riknemist ja probleeme toiduohutuse tagamisel.

1.5. Biokile hävitamisviisid toiduaine tööstuses

Biokile arengu jooksul toimub mikroobide lisandumine biomassi ning eksopolüsahhariidide lisandumine, mistõttu tuleb biokile kahjustamisel kõigepealt eemaldada mikroobide massi kaitsev eksopolüsahhariidide kiht ja alles seejärel on võimalik mikroobide kahjustamine (Kaplan 2010; Coughlan *et al.* 2016). Puhastuse tulemust mõjutavad: kasutatava pesu- ja desoaine keemiline koostis, pesu ehk töötamise mehhaaniline toime, puhastuslahuse temperatuur ja selle toimimise kestvus (Lin *et al.* 2011). Biokile eemaldamisel tuleb kasutada aineid, mis suudavad seda läbida ja hävitada ka patogeene (Coughlan *et al.* 2016).

Kõige efektiivsem meetod biokile eemaldamiseks koosneb mitmest etapist:

Kuiv puhastamine. See hõlmab suurte biokile osakeste eemaldamist kraapimisega, harjamisega, tolmuimeja kasutamisega ja pühkimisega (González-Rivas *et al.* 2018).

Veega loputamine. Vee temperatuur peab olema 50-55 °C, aga mitte üle 60 °C, et vältida küpsetatud pinna tekkimist, mis muudaks biokile eemaldamise veelgi raskemaks (Cramer 2012).

Kemikaalide kasutamine. Soovitav on kasutada klooriühendeid (De Beer *et al.* 1994). Kasutatakse ka ammoniumiühendeid, peroksüaadikhapet ja vesinikperoksiidi (Lin *et al.* 2011). Kemikaalide kasutamise aeg sõltub biokile suurusest, aga nende toime peab kestma rohkem kui 5 minutit, et võimaldada kattekihi lagunemist ja eemaldamist (Cramer 2012; Ban, Kang 2016).

Lõplik veega loputamine. Vee temperatuur peab olema taas 50 °C, et eemaldada kõiki puhastuskemikaale (Cramer 2012).

Desinfitseerimine. Mõned bakterirakud võivad pärast puhastamist ellu jääda, nii et desinfitseerimisvahendite kasutamine peaks vähendama järelejäänud bakterite arvu. Mineraalse kile eemaldamiseks võib kasutada happelisi desinfitseerimisvahendeid ja osooni (Farklas *et al.* 2012). Osoneeritud vesi on tugev oksüdeerija, mis toimib kiiresti paljude mikroorganismide vastu (Tachikawa *et al.* 2008). Veel võib biokile vastu kasutada ultraheli, mis lõhub rakumembraane (Carmen *et al.* 2006). Samuti kasutatakse ensüüme (amülaasid, proteaasid), kuna mõned mikroobid on ensüümide suhtes tundlikud (Baker *et al.* 2016).

Pagari- ja kondiitritööstuses kasutatakse seadmete pesemiseks ja biokile eemaldamiseks enamasti surve-, vahu- või käsitsipesu. Samuti biokile eemaldamiseks on väga efektiivne ultraheli töötlus (37 kHz, 200 W, 30 minutit) millega kaasneb keemikaalidega pesu (10% alkoholid, 2,5% bensalkooniumkloriid ja 2,5% didetsüüldimetüülammooniumkloriid). (Grigore-Gurgu *et al.* 2019)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärk ja ülesanded

Bakalaureusetöö eesmärk on anda ülevaade leivatööstuses leivajuuretisega kokkupuutuvatel seadmetel esineva biokile mikroobikoosluste kohta ning teostada mikrobioloogiline ja molekulaarne uuring ühe Eestis tegutseva leivatööstuse seadmetelt kogutud biokileproovidega.

Bakalaureusetöö ülesanded:

- teostada väljakülvid leivatööstuse seadmetelt kogutud biokileproovidest;
- kirjeldada väljakasvanud kolooniate ja mikroobirakkude morfoloogiat;
- eraldada leivatööstuse seadmetelt kogutud biokileproovidest DNA;
- läbi viia PCR analüüsid *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. ja *Klebsiella pneumoniae* tuvastamiseks leivatööstuse seadmetelt kogutud biokileproovides.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Uuritav materjal

Bakalaureusetöös kasutatav materjal oli kogutud perioodil jaanuar kuni oktoober 2018 neljas katseseerias ajavahemikul 08.-10.01.18 (I KS e. katseseeria), 26.-28.03.18 (II KS), 27.-29.06.18 (III KS) ja 15.-17.10.18 (IV KS) ühest Eestis tegutsevast leivatööstusest nooremteadur/doktorant Liis Lutteri poolt.

Uuritavaks materjaliks oli leivatööstuse seadmete toormega otseselt kokkupuutuvatel pindadel (seadmete sisepinnad) steriilse, peptonveega niisutatud vatitampooniga (*NRS II Transwab*®, *Medical Wire & Equipment*, Inglismaa) u. 10 cm² suuruselt alalt kogutud proovid, mis pärast proovivõttu sukeldati 10 ml peptonlahusesse. Proovid koguti kaheteistkümnest proovivõtupunktist nelja katseseeria käigus (tabel 2).

Tabel 2. Leivatööstuse seadmete sisepindadelt kogutud proovid ja nende märgistus

| Jrk. Nr. | Proovivõtukoht | Proovide (n=47) tähistused | | | |
|-------------|---|----------------------------|--------|-----|-----|
| | | KS1 | KS2 | KS3 | KS4 |
| 1 | Jahutustõrde sisepind | A1 | D1 | C1 | B1 |
| 2 | Mesofiilse juuretise põhitanki sisepind | A2 | D2 | C2 | B2 |
| 3 | Mesofiilse juuretise vahetanki sisepind | A3 | D3 | C3 | B3 |
| 4 | Nr. 1 peenleiva keedukatla sisepind | A4 | D4 | C4 | B4 |
| 5 | Peenleiva keedukatla segaja-keetja sisepind | A5 | D5 | C5 | B5 |
| 6 | Rukkikroovjuuretise põhitanki sisepind | A6 | D6 | C6 | B6 |
| 7 | Rukkikroovjuuretise vahetanki sisepind | A7 | D7 | C7 | B7 |
| 8 | Rukkikroovjuuretise toitesegukatla sisepind | A8 | D8 | C8 | B8 |
| 9 | Jahutustõrde kohal oleva otsa sisepind | A9 | puudub | C9 | B9 |
| 10 | Jahudosaatori sisepind | A10 | D10 | C10 | B10 |
| 11 | Mesofiilse juuretise väljalasketoru otsa sisepind | A11 | D11 | C11 | B11 |
| 12 | Rukkikroovjuuretise väljalasketoru otsa sisepind | A12 | D12 | C12 | B12 |

Kuni käesoleva töö eksperimentide alguseni, 2019. aasta sügisel, seisid seadmetelt kogutud biokileproovid temperatuuril -80 °C.

2.2.2. Mikrobioloogilised väljakülvid

Mikrobioloogilised väljakülvid teostati kõigi nelja katseseeria proovidest (n=47). Selleks - 80 °C temperatuurilt võetud, proovivõtutampooni sisaldavaid, 10 ml tuube soojendati kuni peptoonlahuse sulamiseni, misjärel neid vorteksiti (*Vortex Genie 2 Mixer, Scientific Industries Si™*, Inglismaa) 3 min jooksul maksimumpööretel. Järgnevalt tehti tuubis olnud tampoonidega ühtlane pindkülv steriilsetele trüptikaas-sojaagarsöötmetele (TSA, *Tryptic Soy Agar, LabM Ltd.*, Inglismaa) Petri tassidel.

Külve inkubeeriti termokapis (*Memmert*, Saksamaa) temperatuuril 30 °C kuni 72 h. Seejärel kirjeldati väljakasvanud kolooniate värvust, kuju ja suurust. Erineva morfoloogiaga kolooniatest valmistati Gram'i preparaadid, mida mikroskopeeriti valgusmikroskoobi abil 1000- kordse suurendusega ning kirjeldati mikroobirakkude morfoloogilisi tunnuseid (suurus, värv, kuju, endosporide olemasolu).

Kõikidest mikroskopeeritud kolooniatest (n=83) teostati ümberkülvid uutele TSA tassidele, mida taas inkubeeriti 30 °C juures kuni 36 h. Väljakasvanud isolaadid koguti steriilse

külviaasaga kriiotuubi, mida seejärel vorteksiti ning viidi temperatuurile -80 °C säilitamiseks (võimalike tulevaste katsete tarbeks).

2.2.3. DNA eraldamine

DNA eraldati kaht liiki proovidest:

1. Igast proovist (n=47) tehti pärast proovivõtutampooni väljavõtmist (vt. 2.2.2.) 10 alikvooti – selleks pipeteeriti uuritav materjal steriilsetesse 1,5 ml kogumistuubidesse. 10 ml materjali jagati kümnesse tuubi (igasse tuubi pipeteeriti 1 ml materjali). Igast proovist võeti 1 alikvoot DNA eraldamiseks ning ülejäänud 9 alikvooti viidi -80 °C juurde säilitamiseks.
2. Esimese ja neljanda katseseeria proovide puhul, igal TSA söötmetassil tamponikülvil (vt. 2.2.2.) väljakasvanud kolooniad (pärast nende mikroskopeerimist ning huvipakkuvatest pesadest teostatud väljakülve) koguti steriilse külviaasaga kokku ning kanti 1 ml steriilsesse peptoonlahusesse. Proovid tähistati A1b...A12b (I KS) ja B1b...B12b (IV KS), n=23 (kuna A9 tassil kasv puudus, jäi proov A9b DNA eraldamiseks saamata).

Järgnevalt, 1 ml alikvoot (või rakkude suspensioon peptoonlahuses) tsentrifugeeriti (*Sigma I-14K*, Saksamaa) 4 °C juures 20 min (5000 x g) ja valati ära sademele tekkinud supernatant.

Edasiseks DNA eraldamiseks kasutati DNeasy PowerFood Microbial Kit'i (*QIAGEN*, Saksamaa) järgides tootjapoolset kasutusprotokolli, millesse tehti väikeseid modifikatsioone:

1. Tuubis olevale sademele lisati 450 µl eelnevalt soojendatud MBL lahust ning suspendeeriti läbi.
2. Seejärel pipeteeriti proov MicroBead tuubi (*QIAGEN*, Saksamaa), vorteksiti läbi, soojendati ning tsentrifugeeriti 21°C juures 1 minuti jooksul (13000 rpm).
3. Supernatant kanti uude kogumistuubi, lisati 100 µl IRS lahust, inkubeeriti 4 °C juures 5 minuti jooksul ning tsentrifugeeriti
4. Seejärel pipeteeriti supernatant uude kogumistuubi, millele lisati eelnevalt soojendatud 900 µl MR lahust ja vorteksiti läbi.

5. 650 µl supernatanti kanti üle Spin filter tuubi ja tsentrifugiti. Filtraat valati ära ning korrati antud etappi.
6. Tsentrifugimise järel Spin filter asetati uuele kogumistuubi. DNA puhastamiseks lisati 650 µl PW lahust, tsentrifugiti, valati ära filtraat ning korrati antud etappi etanooliga.

DNA elueerimiseks filtrit tuubi, pipeteeriti filtrile 50 µl EB lahust, tsentrifugiti 21°C juures 1 minuti jooksul (13000 rpm) ning korrati antud etappi. Kokku saadi iga proovi puhul DNA lahust 100 µl. Saadud DNA kontsentratsiooni mõõdeti seadmel *Thermo Scientific NanoDrop One* (USA). DNA proove säilitati -20 °C juures.

2.2.4. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon

PCR on mitmeastmeline protsess, mida viiakse läbi PCR masinas ehk termotsükleris (Cleary *et al.* 2003). Esimene etapp on DNA denatureerimine ehk ahelate lahknemine, mis toimub 94-96 °C juures. Seejärel reaktsioonisegu jahutatakse 50-70 °C-ni, et toimuks praimerite seondumine DNA ahelatega. Järgmisena sünteesitakse DNA-d 65-75 °C juures, mille käigus toimub amplifitseerimine ehk DNA koopiade paljundamine. Antud kolm etappi tavaliselt korratakse 20-40 korda, et tekiks piisavalt palju DNA lõike tulemuse visualiseerimiseks UV-kiirguses. Lõpus toimub praimerite lõplik elongatsioon ehk pikendamine DNA polümeraasi abil temperatuuril 72 °C. Reaktsiooni lõpus segu jahutatakse 4 °C-ni ning säilitatakse edasiseks materjali uurimiseks geelelektroforeesi abil. (Walker-Daniels 2012; Valasek, Repa 2005; Powledge 2004)

Kõikide DNA proovidega viidi esmalt läbi PCR analüüs 16S rDNA 1460 bp suuruse produkti detekteerimiseks universaalse praimeripaariga 27F ja 1492R. PCR reaktsioon viidi läbi mahus 20 µl, mis sisaldas 3 µl 5x PCR Mix Ready To Load (*Solis Biodyno OÜ*, Eesti), 0,3 µl kumbagi praimerit, 15,4 µl PCR vett ja 2 µl DNA-d. PCR reaktsioon teostaati termotsükleris (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, *Eppendorf*, USA) kasutades programmi: polümeraasi aktivatsioon 94 °C juures 5 minutit, mille järgnes 30 tsüklit amplifikatsiooni (94 °C 1 min; 60 °C 1 min; 72 °C 1,5 min) ning lõplik elongatsioon 72 °C juures 10 minutit.

Seejärel viidi läbi PCR analüüs *S. aureus* – spetsiifilise *femA* praimeripaariga 132 bp produkti determineerimiseks reaktsioonisegu mahuga 20 µl, millesse lisati 2 µl DNA-d, 2 µl

5x PCR Mix Ready To Load, 0,3 µl *femA* praimeripaari ning 15,4 µl PCR vett. DNA amplifitseerimiseks kasutati järgmist programmi: polümeraasi aktivatsioon 94 °C juures 2 minutit, 30 tsüklit amplifikatsiooni (94 °C 30 sek; 50 °C 30 sek; 72 °C 1 min) ning lõplik elongatsioon 72 °C juures 10 minutit.

Bacillus subtilis spetsiifilise geeni 1311 bp suuruse produkti tuvastamiseks kasutati EN1 praimeripaari. Reaktsioonisegu valmistamiseks lisati 2 µl DNA-d, 1 µl praimerit EN1F ja EN1R, 3 µl 5x PCR Mix Ready To Load ning 13 µl PCR vett. DNA amplifitseerimiseks kasutati järgmist programmi: polümeraasi aktivatsioon 94 °C juures 5 minutit, mille järgnes 10 tsüklit *touchdown* programmi 94 °C 30 sek; 70 °C 30 sek; 74 °C 45 sek (iga järgneva tsükliga praimerite seondumistemperatuur langes 1 °C võrra). Pärast *touchdown* programmi lõpetamist toimus 25 tsüklit (94 °C 30 sek, 60 °C 20 sek, 74 °C 45 sek) amplifikatsiooni ning lõplik elongatsioon 74 °C juures 10 minutit.

Bacillus cereus spetsiifilise geeni 575 bp suuruse produkti determineerimiseks lisati reaktsioonisegusse 2 µl DNA-d, 3 µl 5x PCR Mix Ready To Load, 1,2 µl spetsiifilise *B. cereus* grupi praimeripaari BCF ja BCR ning 11,6 µl PCR vett. PCR reaktsioon teostati kasutades programmi: polümeraasi aktivatsioon 94 °C juures 5 minutit, 30 tsüklit amplifikatsiooni (94 °C 30 sek; 54,5 °C 1 min; 72 °C 1 min), lõplik elongatsioon 72 °C juures 7 minutit.

Viimasena teostati PCR analüüs *Klebsiella pneumoniae* spetsiifilise geeni 130 bp ja 260 bp suuruse produkti determineerimiseks kahe praimeripaariga PF/PR1 ja PF/PR2. Reaktsioonisegusse lisati 2 µl DNA-d, 3 µl 5x PCR Mix Ready To Load, 2 µl kumbagi praimerit ning 11 µl PCR vett. DNA amplifitseerimiseks kasutati järgmist programmi: polümeraasi aktivatsioon 95 °C juures 15 minutit, 35 tsüklit amplifikatsiooni (94 °C 30 sek; 57 °C 90 sek; 72 °C 90 sek) ning lõplik elongatsioon 72 °C juures 10 minutit. Tabelis 3 on välja toodud eksperimendi käigus kasutatud praimeripaaride järjestused.

Tabel 3. Eksperimendi käigus kasutatud praimeripaarid

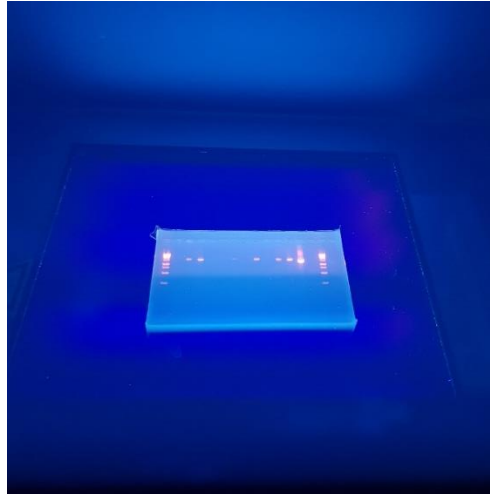
| Bakter | Primer | Praimeri järjestus (5'-3') | Viide |
|----------------------|---------------|----------------------------|----------------------------------|
| <i>S. aureus</i> | <i>femA</i> F | AAAAAAGCACATAACAAGCG | Singh <i>et al.</i> 2014 |
| | <i>femA</i> R | GATAAAGAAGAACGAGCAG | |
| <i>B. subtilis</i> | EN1F | CCAGTAGCCAAGAATGGCCAGC | Ashe <i>et al.</i> 2014 |
| | EN1R | GGAATAATCGCCGCTTTGTGC | |
| <i>B. cereus</i> | BCF | ATCGCCTCGTTGGATGACGA | Oliwa-Stasiak <i>et al.</i> 2009 |
| | BCR | CTGCATATCCTACCGCAGCTA | |
| <i>K. pneumoniae</i> | Pf | ATTTGAAGAGGTTGCCAAACGAT | Liu <i>et al.</i> 2008 |
| | Pr1 | TTCACTGTGAAGTTTTCTTGTGTTC | |
| | Pr2 | CCGAAGATGTTTCACTTCTGATT | |

Iga PCRga käis kaasas positiivne kontrollproov (kõik kontrolltüved pärinevad Tartu Ülikoolis asuvast Inimese Mikrobioota Biopangast HUMB), mis annab kasutatavate praimeritega alati positiivse tulemuse. Reaktsioonisegu puhtuse kontrollimiseks kasutati negatiivset kontrollproovi, millesse DNA-d ei lisatud.

2.2.5. Geelelektroforees

Polümeraasi ahelreaktsiooni abil amplifitseeritud DNA lõikude kontrollimiseks valmistati 1,8-2,5%-line agarosigeel, olenevalt PCR produkti pikkusest (väiksema puhul kõrgema agarosisisaldusega ning suurema produkti puhul väiksema sisaldusega). Geeli valmistamiseks kaaluti nt. 1,8 g agarosi (*Atlas Agarose Ultra Pure, Bioatlas OÜ, Eesti*) ja lisati 100 ml 1xTBE (*Bioatlas OÜ, Eesti*) puhvrit. Segu kuumutati mikrolaineahjus aeg-ajalt segades kuni see muutus läbipaistvaks. Seejärel segu jahutati 60 °C-ni ning lisati 5 µl etiidumbromiidi (EtBr) PCR produktide UV-valguses visualiseerimiseks (joonis 4).

Geelilahus valati geelialusele ning asetati „kamm“ süvendite tekitamiseks. Kammi abil tekkis 16 süvendit, millest 2 tuli reserveerida suurusmarkeritele, 1 negatiivsele ning 1 positiivsele kontrollproovile. Tardunud geel asetati geelelektroforeesi aparati (*nanoPAC-300 MINI Power Supply, Cleaver Scientific Ltd., Inglismaa*). Geeli süvenditesse lisati 10 µl DNA proovi ning kahele küljele 5 µl suurusmarkerit. *Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* markerit kasutati 1460 bp suurusega produkti puhul ja *Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* markerit alla 1000 bp suurusega produktide puhul.



Joonis 4. UV-kiirguses visualiseeritud elektroforeesi tulemused (Foto: Aljona Kuzina).

Elektroforees teostati 120 V juures 30 minutit. Selle jooksul negatiivselt laetud DNA molekulid liikusid agarosgeelis elektrivälja rakendamisel katoodilt anoodile. Saadud tulemused visualiseeriti UV-kiirguses *UVsolo touch* geeli visualiseerimisseadmega (*Analytikjena*, Inglismaa).

3. TULEMUSED JA ARUTELU

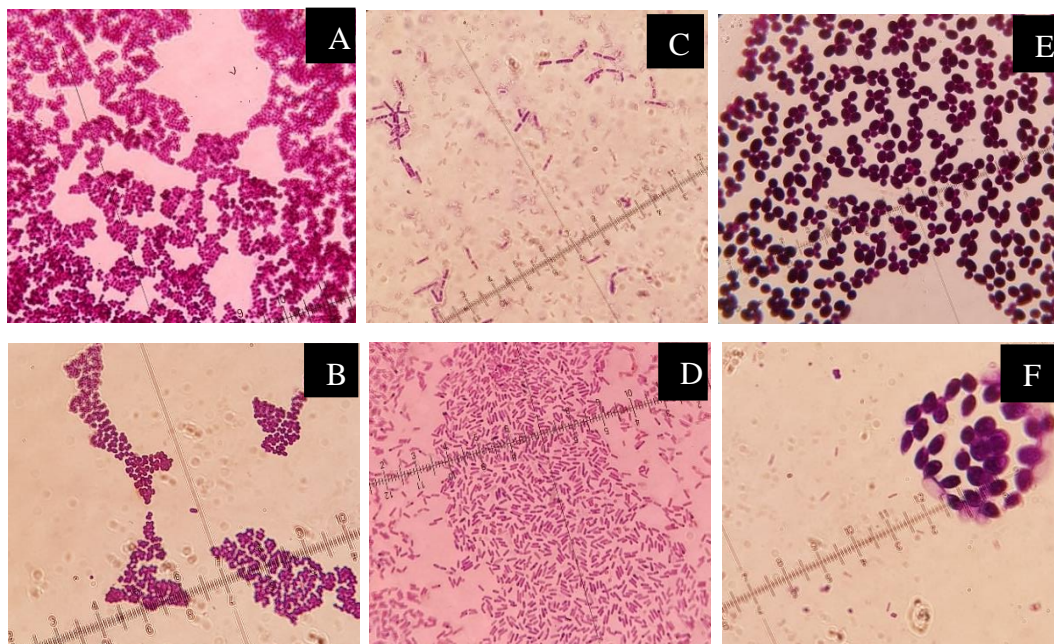
3.1. Mikroobide väljakasv biokileproovidest

Mikroobid kasvasid välja 94% (44/47) proovitamponiga teostatud külvist TSA söötmetel. Kasv puudus proovides A9, C10, D4. Selgus, et pesade hulk, sh erineva morfoloogiaga kolooniate hulk, oli kõige suurem III KS (n=21) ja kõige väiksem I KS (n=18) proovides. Nelja katseseeria peale kirjeldati kokku 83 erineva morfoloogiaga mikroobipesa.

Mikroskopeerimisel tuvastati nii gram positiivsed kui ka gram negatiivsed bakterid (lisa 1). Gram positiivsete mikroobide hulk oli kõige suurem 95% (79/83). Mikroskopeerimisel kirjeldati mitmeid kokke (kokku 26 isolaati), millest suurem osa esinesid II ja III katseseerias. Väljakasvanud kolooniad olid kollast, valget, beeži või roosat värvi, ümara kujuga, läikivad ning kumerad või siledad. Bakterirakkude läbimõõt oli 1 µm ning nad moodustasid kobaraid (joonis 5 A, B). Tulemus võib viidata stafülokokkide esinemisele antud proovides.

Pulkbaktereid (kokku 49 isolaati) esines enim IV katseseerias (pesade värv oli kollakast beežini, ebakorrapärase kujuga, läikivad ja kumerad). Bakterid paiknesid ühekaupa või moodustasid pikki ahelaid. Mikroobirakkude suurus varieerus vahemikus 0,5-1 x 2-10 µm (joonis 5 C, D). Mõned pulkbakterid sisaldasid endospore, mis võiks viidata *Bacillus* perekonna liikmete esinemisele proovides. Neljas proovis (C5, D3, D6, D11) esinesid gram negatiivsed pulkbakterid, mis eeldatavasti võisid olla *K. pneumoniae*'d.

Mikroskopeerimisel tuvastati, et kaheksas proovis esinesid pärmseened suurusega 2-3 x 3-7 µm (joonis 5 E, F). Uuritavast materjalist väljakasvanud mikroobide pesa- ja rakumorfoloogiatega kirjeldus on koondatud lissele 1.



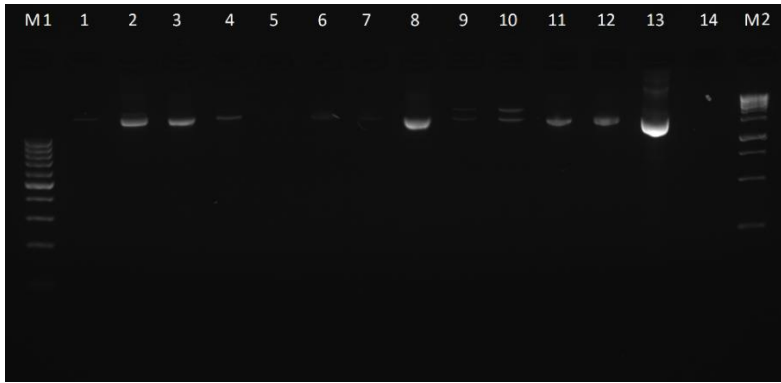
Joonis 5. Näide leivatööstuse seadmete biokiles esinevatest kokkidest (A, B), pulkbakteritest (C, D) ja pärmseentest (E, F).

Mikroskopeerimise tulemus vastab kirjanduse ülevaates toodud leivatööstuse seadmetel esineda võivatele mikroobidele. On leitud, et leivatööstuse seadmete biokiles võivad esineda *Bacillus* perekonna liikmed, stafülokokid, piimhappebakterid, hallitus- ja pärmseened (Adesetan jt. 2013; Roessler, Ballenger 1996; Scheirlinck jt. 2009; Saranraj, Geetha 2012).

Kuna mikroobide identifitseerimine mikroskopeerimise meetodiga ei ole piisavalt usaldusväärne (eriti kui tegu on sarnase morfoloogiaga mikroorganismidega), siis teostati kõikide DNA proovidega PCR analüüs, et tuvastada uuritavates proovides *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis* ja *K. pneumoniae* spetsiifiliste geenide olemasolu.

3.2. PCR analüüsi tulemused

Esmalt teostati PCR analüüs universaalse praimeripaariga 27F/1492R, et kontrollida bakteriaalse DNA esinemist – 16S rDNA olemasolu tuvastati 98% (46/47) uuritud proovides (joonis 6).



Joonis 6. PCR analüüs 27F/1492R praimeripaariga. M1 – 100 bp DNA ladder, 1-12 biokileproovid A katseseeriast, 13 – LGG positiivne kontroll, 14 – negatiivne kontroll, M2 – 1 kb DNA ladder

Mõnedes proovides DNA bänd on halvasti nähtav või koos ebaspetsiifiliste bändidega – see võis olla tingitud väikesest DNA kontsentratsioonist ning sellest, et leivajuuretis võib sisaldada selliseid inhibeerivaid ühendeid, mis mõjub negatiivselt kvaliteetse DNA eraldamisele.

3.2.1. *Staphylococcus aureus*'e esinemine leivatööstuse seadmete biokiles

Adesetan *et. al* 2013 oma uuringus tuvastasid *S. aureus*'e esinemist leivatööstuse erinevatel seadmetel, mis andis aluse arvamusele, et patogeen võiks esineda ka meie uuritavas materjalis, seda enam, et mikrobioloogilistes väljakülvides olid kobarkokid mitmetes proovides. Käesolevas töös testiti kõiki DNA proove *femA* praimeripaariga ning selgus, et mitte üheski uuritud biokileproovis *S. aureus*'e DNAd ei esinenud (joonis 7).



Joonis 7. PCR analüüs *femA* praimeripaariga. 1-12 biokileproovid A katseseeriast; 13 – positiivne kontroll *S. aureus*, 14 – negatiivne kontroll, M – 100 bp DNA ladder.

Saadud tulemus on positiivne ja ootuspärane tulemus, kuigi bakteri puudumine võib, aga ei pruugi olla tingitud *S. aureus*'e vähesest kogusest uuritud materjalis.

3.2.2. *Bacillus* spp. esinemine leivatööstuse seadmete biokiles

Bacillus cereus on väga levinud patogeen leivatööstustes. Bakter on spooride moodustaja, mistõttu seda on raske keskkonnast kõrvaldada. Erinevate uuringute käigus on bakterit tuvastatud tainas, pagaritoodetes (Jääskeläinen *et al.* 2002) ja erinevatel seadmetel (Adesetan *et al.* 2013). Jääskeläinen *et al.* 2002 väitsid, et pagaritoodetes võivad esineda emeetilised *B. cereus* tüved, mis põhjustavad toidumürgistust. Haigus on enamasti kerge kuluga ning iseparanev, kuigi bakter võib põhjustada toote kvaliteedidefekte, mistõttu seadmete puhtuse kontroll on tähtis bakteri tootesse sattumise ennetamiseks.

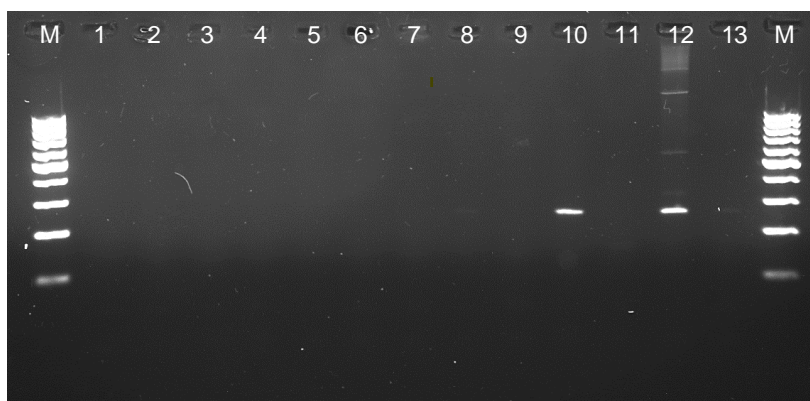
B. cereus identifitseerimiseks kasutati käesolevas töös PCR analüüsil *B. cereus* grupile spetsiifilist praimeripaari. *B. cereus* tuvastati neljas proovis – A5b (peenleiva keedukatla segaja sisepind, väljakülvist isoleeritud DNAs), A8, B8 ja C8 (rukkikroovjuuretise toitesegukatla sisepind). Viimased kolm positiivsed tulemused on pärit ühest proovivõtmiskohast erinevate katseseeriade korral. Seega, bakteri esinemine seadme pinnal võiks põhjustada leivataina saastumise riski.

Lisaks viidi läbi PCR analüüsid *Bacillus subtilis*'e esinemise kontrollimiseks biokileproovides. Antud bakter võib samuti olla leiva riknemise ja kvaliteedilanguse põhjustajaks ning võib esineda tööstuse seadmetel (Saranraj, Sivasakthivelan 2015). *B. subtilis* sai tuvastatud neljas proovis – A6b (rukkikroovjuuretise põhitanki sisepind, väljakülvist isoleeritud DNAs), A8, B8, C8 (rukkikroovjuuretise toitesegukatla sisepind). Viimased kolm positiivset tulemust on samuti pärit ühest kohast ja langevad kokku *B. cereus*'e positiivsete proovidega. PCR analüüsid langevad kokku ka mikroskopeerimistulemustega, kuna antud proovides tuvastati Gram positiivseid endosporidega pulkbaktereid.

3.2.3. *Klebsiella pneumoniae* esinemine leivatööstuse seadmete biokiles

Klebsiella pneumoniae võib esineda leivas ning teistes pagari- ja kondiitritoodetes. Deshwa ja Sharma (2017) viisid läbi uuringu, mille eesmärk oli ühe pagariettevõtte toodete mikrobioloogiline ja biokeemiline analüüs ning tuvastasid *Klebsiella* spp. esinemist leivas ja kondiitritoodetes. Autorid järeldasid, et bakter võiks tootesse sattuda seadmetega kokkupuutuvate materjalide või töötajate kaudu. *K. pneumoniae* esinemine toodetes on halb näitaja, kuna bakter võib toota toidus oma toksine ning põhjustada selle riknemist.

K. pneumoniae esinemise kontrollimiseks uuritavas materjalis teostati PCR analüüs kahe praimeripaariga (joonis 8).



Joonis 8. PCR analüüs *Pf/Pr2* praimeripaariga. 1-11 biokileproovid D katseseeriast; 12 – positiivne kontroll *K. pneumoniae*, 13 - negatiivne kontroll, M – 100 bp DNA ladder

Bakter tuvastati kaheksas proovis – A3 (mesofiilse juuretise vahetanki sisepind), A11 (mesofiilse juuretise väljalasketoru otsa sisepind), B1 (jahutustõrde sisepind), B8 (toitesegukatla sisepind) C5 (peenleiva keedukatla segaja-keetja sisepind), C9 (jahutustõrde toru otsa sisepind), C11, D11 (mesofiilse juuretise väljalasketoru otsa sisepind). Kõige suurem *K. pneumoniae* positiivsete proovide hulk esines III katseseerias. Selgus, et mesofiilse juuretise väljalasketoru otsa sisepinnalt võetud proovid olid *K. pneumoniae* positiivsed kolme esimese katseseeria käigus ning oli negatiivne IV KS-s. Sellest võib järeldada, et perioodil jaanuar kuni juuni esines bakter seadme pinnal, ning oli potentsiaalne leivajuuretise saastumise allikas. Kaks positiivset PCR tulemust (C5, D11) langevad kokku mikroskopeerimise analüüsiga, kus oli leitud Gram negatiivsed pulkbakterid suurusega 1x3-5 µm (lisa 1).

Tabel 4. Leivatööstuse seadmete biokile molekulaarsete uuringutulemuste koondtabel

| Nr | Proovivõtukoht | KS1(A) | | | | | KS2(D) | | | | | KS3(C) | | | | | KS4(B) | | | | |
|----|---|----------|----|----|----|----|----------|----|----|----|----|----------|----|----|----|----|----------|----|----|----|----|
| | | 16S rDNA | SA | BS | BC | KP | 16S rDNA | SA | BS | BC | KP | 16S rDNA | SA | BS | BC | KP | 16S rDNA | SA | BS | BC | KP |
| 1 | Jahutustõrs | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + |
| 2 | Mesofiilse juuretise põhitank | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 3 | Mesofiilse juuretise vahetank | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 4 | Nr. 1 peenleiva keedukatel | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 5 | Peenleiva keedukatla segaja | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 6 | Rukkikroovjuuretise põhitank | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 7 | Rukkikroovjuuretise vahetank | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 8 | Rukkikroovjuuretise toitesegukatel | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | + | - | + | + | - | + | - | + | + | + |
| 9 | Keedukatla jahutustõrde toru ots | + | - | - | - | - | PM | PM | PM | PM | PM | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 10 | Jahudosaator | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 11 | Mesofiilse juuretise väljalasketoru ots | + | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 12 | Rukkikroovjuuretise väljalasketoru | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - |

Märkused: KS – katseseeria (proovide tähistusega A, B, C ja D), 16S rDNA – bakteriaalne DNA, SA – *Staphylococcus aureus*, BS – *Bacillus subtilis*, BC – *Bacillus cereus*, KP – *Klebsiella pneumoniae*, + positiivne tulemus, - negatiivne tulemus; PM – pole määratud

Kõik PCR analüüside tulemused on koondatud tabelisse 4. PCR tulemustest selgub, et 26% (12/47) uuritud biokileproovidest sisaldasid potentsiaalselt patogeenseid baktereid. Kõige rohkem positiivseid proove esines juuretisega kokkupuutuvate seadmete pinnal. Tulemus vastab kirjanduse analüüsil väljatoodule, kus on mainitud, et patogeenid kasvavad paremini küpsetuseelsete seadmete pinnal, mis puudutab kokku niiskete toiduainetega. Käesolevas töös selgus, et ühes biokileproovis võivad esineda mitmed potentsiaalselt patogeensed bakteriliigid, mis tõenäoliselt muudab biokile hävitamisele resistentsemaks.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et leivatööstuse seadmete biokiles olevad patogeenid on võimelised moodustama bakteriaalseid kooslusi ning püsima biokiles pika perioodi jooksul.

KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärk oli anda ülevaade leivatööstuses juuretise ga kokkupuutuvatel seadmetel esineda võivate biokilede mikroobikoosluste kohta ning teostada mikrobioloogiline ja molekulaarne uuring ühe Eestis tegutseva leivatööstuse seadmetelt kogutud biokileproovidega.

Kirjanduse analüüsil leiti, et biokile on õhuke ekstratsellulaarne polümeerne materjal, mis kaitseb mikroorganisme keskkonnafaktorite eest. Biokiles olevad bakterid hakkavad teatud tiheduse saavutamisel saatma teineteisele signaalmolekule, mis annab võimaluse moodustada bakteriaalseid kooslusi, kiiresti paljuneda ning kontrollida populatsiooni. Toiduainete tööstuses seadmetel moodustunud biokile võib tekitada kahju tootmisprotsessile ning põhjustada suuri hügieeniprobleeme. Leivatööstuste seadmeid katvas biokiles võivad esineda nii toodete riknemist soodustavad mikroobid, kui ka inimese tervisele patogeensed mikroorganismid. Seadmete biokillesse võivad bakterid sattuda kokkupuutuvast toorainest või ümbritsevast keskkonnast. Seadmetel moodustunud biokile on toidu potentsiaalne saastumise allikas, mistõttu tootmishügieeni reeglite jälgimine toiduainete tööstuses on väga oluline.

Mikrobioloogilise uuringu käigus teostatud väljakülvidest selgus, et ühe Eestis tegutseva leivatööstuse seadmete sisepindadelt kogutud biokileproovides leidub nii gram positiivseid kerabaktereid, gram positiivseid kui -negatiivseid pulkbaktereid ning pärmseeni. Uuringu käigus kirjeldati ja isoleeriti 83 mikroobikultuuri, mida säilitatakse temperatuuril -80 °C tulevaste uuringute tarbeks.

Uuritavast materjalist eraldatud DNAGA teostati PCR analüüsid, mille tulemused näitasid, et potentsiaalselt patogeenseid mikroobe esines 26% (12/47) uuritud biokileproovis, sh. *Bacillus subtilis* esines 4 proovis ja *B. cereus* oli samuti tuvastatud 4 proovis. Kuus positiivset tulemust on pärit ühest proovivõtmiskohast erinevate katseseeriade korral, mistõttu võib arvata, et *Bacillus* perekonna liikmed teatud perioodi jooksul on seadme pinna koloniseerinud ning moodustanud seal biokile.

Klebsiella pneumoniae esines kaheksas proovis – kõige suurem positiivsete proovide arv oli

tuvastatud kolmandas katseseerias, mis oli võetud juunis 2018. Samuti selgus, et *K. pneumoniae* esines püsivalt kolme esimese katseseeria jooksul mesofiilse juuretise väljalasketoru otsa sisepinnal. See näitab, et bakter on võimeline püsima seadme pinnal pika perioodi jooksul.

Katsete käigus selgus, et mitte üheski uuritud biokileproovis ei esinenud *Staphylococcus aureus*, mis on väga hea ja oodatud tulemus.

Kokkuvõtteks võib öelda, et bakalaureusetöö alguses püstitatud hüpotees on kinnitatud, kuna leivatööstuse seadmetel olevas biokiles sai tuvastatud mitmeid patogeene, mis võivad olla potentsiaalselt ohtlikud inimese tervisele. On raske täpselt öelda, millest on tingitud *B. cereus*'e, *B. subtilis*'e ja *K. pneumoniae* esinemine uuritavates proovides – põhjuseks võib olla ebapiisav seadmete pesemine või muude hügieenitavade rikkumine. Kindlasti aga vajab antud teema täiendavaid uuringuid.

Bakalaureusetöö teostamisel tekkinud mõtted teema edasiuurimiseks:

- Kuna uuritavates proovides on tuvastatud *B. cereus*'e esinemine, võiks edaspidi kontrollida enterotoksiinide olemasolu leivajuuretistes.
- Võiks teostada biokeemilise analüüsi kvoorumtunnetuse signaalide tuvastamiseks leivatööstuse seadmete biokiles ning kontrollida millist tüüpi signaale bakterid teineteisele saadavad.
- Huvitav oleks uurida, millised hallitus- ja pärmseente liigid esinevad uuritavas materjalis ning kontrollida tervisele ohtlike mükotoksiinide olemasolu selles.
- Veel võiks uurida, kas toiduga kokkupuutuvate leivatööstuse seadmete seintel olevas biokiles esinevad bakterid, mis võivad tooraine sattudes anda leivale hoopis lisaväärtust.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adesetan T., Ilusanya O., Sobowale A., Jamani U.** (2013). Bacteria Commonly Associated with Bakery Equipments in Selected Areas Around Olabisi Onabanjo University Environ, Ago – Iwoye, Nigeria. - *Advances in Environmental Biology*. 7: 177-181.
- Afshari A., Baratpour A., Khazade S., Jamshidi A.** (2018) Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimorium identification in poultry carcasses. - *Iranian journal of microbiology* 10: 45–50.
- Al-Bahry S. N., Mahmoud I. Y., Al-Musharafi S. K., and Sivakumar N.** (2014) Staphylococcus aureus Contamination during Food Preparation, Processing and Handling. - *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 388-392.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff M., Roberts K., Walter, P.** [e-book] Molecular biology of the cell. 4th edn. Völjaandja: Garland Science, New York
- Ammor M., Michaelidis C., Nychas G.** (2008) Insights into the Role of Quorum Sensing in Food Spoilage. - *Journal of Food Protection*. 71: 1510–1525.
- Anand T., Virmani N., Kumar S., Mohanty A., Pavulraj S., Bera B., Vaid R., Ahlawata U., Tripathia B.** (2020) Phage therapy for treatment of virulent Klebsiella pneumoniae infection in a mouse model - *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 21: 34-41.
- Anbazhagan D, Mansor M, Yan G., Yusof M., Hassan H., Sekaran S.** (2012). Detection of Quorum Sensing Signal Molecules and Identification of an Autoinducer Synthase Gene among Biofilm Forming Clinical Isolates of Acinetobacter spp. - *PLoS One*. 7: 1-25.
- Andino A., Hanning I.** (2015) Salmonella enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars - *Scientific Worldm Journal* 2015: 520.
- Argudín M., Mendoza M., Rodicio M.** (2010) Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. - *Toxins* 2:1751–1773.
- Armbruster C., Parsek M.** (2018). New insight into the early stages of biofilm formation. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 15: 4317-4319.
- Arroyo-López F., Orlic S., Querol A., Barrio E.** (2009) Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii and their interspecific hybrid - *International Journal of Food Microbiology* 13:120–127.
- Ashe S., Maji U., Sen R., Mohanty S., Maiti N.** (2014) Specific oligonucleotide primers for detection of endoglucanase positive Bacillus subtilis by PCR. - *Biotech* 4: 461–465

- Ashurst J., Dawson A.** (2020) [e-book] *Klebsiella Pneumonia*. Väljaandja: StatPearls Publishing
- Avbelj M., Zupan J., Raspor R.** (2016). Quorum-sensing in yeast and its potential in wine making. - *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:7841-7852.
- Bacterial Glycocalyx: Capsule & Slime Layer (2016) [veebileht] <http://www.scienceprofonline.com/cell-biology/bacterial-glycocalyx-capsule-slime-layer.html> (4.03.2020)
- Bai A., Rai V.** (2011). Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. - *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 10: 183-193.
- Baker P., Hill P., Snarr B., Alnabelseya N., Pestrak M., Lee M., Jennings L., Tam J., Melnyk R., Parsek M., Sheppard D., Wozniak D., Howell P.** (2016). Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. - *Science Advances*. 2: 1-32.
- Balendres M., Karlovsky P., Cumagun C.** (2019) Mycotoxigenic Fungi and Mycotoxins in Agricultural Crop Commodities in the Philippines: A Review. – *Foods* 8:249
- Ban G. H., Kang D. H.** (2016). Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. 55:47–54
- Baquião A., De Oliveira M., Reis T., Zorzete P., Atayde D., Corrêa B.** (2013) Monitoring and determination of fungi and mycotoxins in stored Brazil nuts. - *J Food Prot.* 76:1414-20
- Baron S.** (1996) [e-book] *Bacillus*. Medical Microbiology. 4th edition. Väljaandja: University of Texas Medical Branch at Galveston
- Bassler B.**(1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. - *Elsevier Science*. 2: 582-587.
- Batt C., Tortorello M.** (2014) [e-book] *Encyclopedia of Food Microbiology*. Väljaandja: Elsevier, Inglismaa.
- Beranová J., Mansilla M., Mendoza D., Elhottová D., Konopásek I.** (2010) Differences in Cold Adaptation of *Bacillus subtilis* under Anaerobic and Aerobic Conditions - *American Society for Microbiology Journals* 192: 4164–4171.
- Beuchat L., Heaton E.** (1975). Salmonella Survival on Pecans as Influenced by Processing and Storage Conditions. - *American Society for Microbiology*. 29: 795-801.
- Blatter S., Giezendanner N., Stephan R., Zweifel C.** (2010) Phenotypic and molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated from the processing environment and products of a sandwich-producing plant. - *Food Control* 21: 1519-1523.
- Botstein D., Chervitz S., Cherry M.** (1997). Yeast as a Model Organism. - *Author manuscripts*. 277: 1259–1260.

- Boutin B., Spauling P., Twedt R.** (1986) Evaluation of the Enteropathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Summer-Harvested Louisiana Oysters. - *Journal of Food Protection*. 49:442-444.
- Brooks J.** (2009) Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions - *Food Science and Technology* 23:30-32.
- Bruhn J. B., Christensen A. B., Flodgaard L., Nielsen K., Larsen T., Givskov M., Gram L.** (2004) Presence of acylated homoserine lactones (AHLs) and AHL-producing bacteria in meat and potential role of AHL in spoilage of meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4293–4302.
- Bryers J.** (2009). Medical Biofilms. - *Biotechnology and bioengineering*. 100: 1-18.
- Caplice E, Fitzgerald G.** (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. - *International journal of food microbiology*. 15: 131-49.
- Carmen J., Roeder B., Nelson J., Ogilvie R., Robison R., Schaalje B., Pitt W.** (2006). Treatment of Biofilm Infections on Implants with Low-frequency Ultrasound and Antibiotics. - *Author manuscripts*. 33: 78–82.
- Carter M. Q., Louie J. W., Feng D., Zhong W., Brandl M. T.** (2016). Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157: H7 for initial attachment and biofilm formation. - *Food Microbiol.* 57:81–89.
- Casadevall A., Pirofski L.** (2014) Ditch the term pathogen. - *Comment. Nature* 516: 165–6.
- Christensen A., Riedel K., Eberl L., Flodgaard L., Molin S., Gram L, Givskov M.**(2003). Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. - *Microbiology*. 149:471–483.
- Cianflone N.** (2008). Salmonellosis and the GI Tract: More than Just Peanut Butter. - *Author manuscripts*. 10: 424–431.
- Cleary T.J, Roudel G., Casillas O., and Miller N.** (2003) Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe. - *J Clin Microbiol* 41: 4783–4786.
- Colagiorgi A., Bruini I., Di Ciccio P.A., Zanardi E., Ghidini S., Ianieri A.** (2017) *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. - *Pathogens*. 6:41-66
concerns of bakery products-A review. - *Critical Reveiws in Food Science and Nutrition*. 44: 19-55.
- Costa-Orlandi C. B., Sardi J., Pitangui N. S., et al.** (2017) Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. - *J Fungi (Basel)* 3:22.
- Coughlan L., Cotter P., Hill C., Alvarez-Ordóñez A.** (2016) New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. - *Front Microbiol* 7: 1641.

- Cramer M. (2012)** Biofilms: Impact on the Food Industry. [veebileht] <https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/junejuly-2012/biofilms-impact-on-the-food-industry/> (9.05.2019)
- Crielaard Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. - *Journal of dental research* 87:1016-20.
- Dagnas S., Membre J. (2013).** Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products. - *Journal of Food Protection*. 76: 538–551.
- De Beer D., Srinivasan R., Stewart PS. (1994).** Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms during Disinfection. - *Applied and environmental microbiology*. 60: 4339-434
- Deshwa V., Sharma L. (2017)** Assessment of Bake Products at Dehradun. - *International Journal of Research -GRANTHAALAYAH* 5:46-50.
- Donlan R. (2001)** Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. - *Clinical Infectious Diseases* 33:1387–1392.
- Donlan R. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. - *Emerging infectious diseases*. 8:881–890.
- Doulgeraki A., Blana V., Nychas G. (2011).** Autoinducer-2–like Activity in Lactic Acid Bacteria Isolated from Minced Beef Packaged under Modified Atmospheres. - *Journal of Food Protection*. 74: 631–635.
- Doyle M., Sperber W. (2009).** [e-book] Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Väljaandja: Springer Science.
- Dujon B., Louis E. (2017)** Genome Diversity and Evolution in the Budding Yeasts (Saccharomycotina) - *Genetics Society of America* 206:717-750.
- Dykes G. A., Cloete T. E., von Holy A. (1991)** Quantification of microbial populations of vacuum-packaged, smoked vienna sausages. – *International Journal of Food Microbiology* 13, 239 – 248.
- Earl A., Losick R., Kolter R. (2008)** Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. - *Trends in microbiology*. 16: 269.
- Elegbeleye J., Buys E. (2020)** Molecular characterisation and biofilm formation potential of *Bacillus subtilis* and 1 *Bacillus velezensis* in Extended Shelf-life Milk - *Journal of Dairy Science* 1-32.
- Erten H., Ağırman B., Pelin C., Gündüz B., Çarşamba E., Sert S., Bircan S., Tangüler H. (2014)** Importance of Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Food Processing - *Springer Science* 351-377.
- Eterska (2017)** Bakterije [veebileht] <http://provansaesencije.com/bakterije/> (9.05.2019)
- European Food Safety Authority (2017).** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2016. - *EFSA journal*. 15:528-550.

- Evans M. R., Tromans J. P., Dexter E. L., Ribeiro C. D., Garner D.** (1996) Consecutive salmonella outbreaks traced to the same bakery. - *Epidemiology and Infection*. 116:161-7.
- Fagerlund A., Lindbäck T., Storset A., Granum P., Simon H.** (2008). Bacillus cereus Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. – *Microbiology*.154: 693-704.
- Falomir M., Rico H., Gozalbo D.** (2003) Enterobacter and Klebsiella species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathog Dis* 10: 1002–1007.
- Farber J., Peterkin P.** (1991). Listeria monocytogenes, a Food-Borne Pathogen. - *Microbiological Reviews*. 55: 476-511.
- Farkas A., Bocos B., Dragan-Bularda M., Crăciunaş C.** (2014) Effect Of Different Disinfectants Against Biofilm Bacteria. - *Studia universitatis babeş-bolyai biologia* 1:5-20.
- Fleet G., Praphailong** (2001). Yeasts, In: Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnosis. - *Southwood Press*. 383—397.
- Flemming H., Wingender J.** (2010). The biofilm matrix. - *Nature Reviews Microbiology*. 623-633
- Flynn D.** (2015) Study: Some Klebsiella Pneumonia Illnesses are Foodborne [veebileht] <https://www.foodsafetynews.com/2015/07/study-some-klebsiella-pneumonia-illnesses-are-foodborne/> (24.04.2020)
- Frank** (2001). Microbial attachment to food and food contact surfaces. – *Elsevier Science*. 43:319-370
- Fratamico P., Annous B., Guenther N.** (2009) [e-book] Biofilms in the Food and Beverage Industries. Väljaandja: Elsevier Science
- Fries B. C., Varshney A. K.** (2013) Bacterial Toxins-Staphylococcal Enterotoxin B. - *Microbiol Spectr*. 1:10-46.
- Furukawa S.** (2015) Studies on formation, control and application of biofilm formed by food related microorganisms - *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 79: 1050-1056.
- Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E., Villar C., Lombó F.** (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. - *Journal of Applied Microbiology*. 109: 1117-1131.
- Garibyan L., Avashia N.** (2003). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR) - *Author manuscripts*. 113:1-4.
- Garrett T., Bhakoob M., Zhang Z.** (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. - *Progress in Natural Science*. 18: 1049-1056.
- Geornaras I., Jesus A. E., van Zyl E., von Holy, A.,** (1996) Bacterial populations associated with poultry processing in a South African abattoir. - *Food Microbiology* 13:457 – 465.

- Giaouris E., Chorianopoulos N., Skandamis P., Nychas G.** (2012) Attachment and Biofilm Formation by Salmonella in Food Processing Environments. - *Intech Open Access Publisher* 158-180.
- Gilbert P., McBain A., Rickard A.** (2003) Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. - *International Biodeterioration & Biodegradation* 51:245-248.
- González-Rivas F., Ripolles-Avila C., Fontecha-Umaña F., Ríos-Castillo A., Rodríguez-Jerez J.** (2018) Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. - *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 1261-1276.
- Gopal N., Hill C., Ross P., Beresford T., Fenelon M., Cotter P.** (2015) The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. - *Frontiers in microbiology* 6: 1418.
- Grigore-Gurgu L., Ionela Bucur F., Borda D., Alexa E., Neagu C., Nicolau A.** (2019) Biofilms Formed by Pathogens in Food and Food Processing Environments - *ONLINE FIRST*
- Grumezescu A., Holban A.** (2017) [e-book] Microbial Contamination and Food Degradation. Völjaandja: Academic press
- Gulgor G., Korukluoglu M.** (2017). Biofilms and Their Advantages/Disadvantages in Food Industry. -*Novel bioknowledge and educational programs.* 308-314.
- Guo Y., Zhou H., Qin L., Pang Z., Qin T., Ren H., Pan Z., Zhou J.** (2016) Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of Klebsiella pneumoniae in Food Samples. *PLoS ONE* 11:4-13.
- Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P.** (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. - *Nature Reviews Microbiology* 2:95–108.
- Hardman A., Stewart G., Williams P.** (1998). Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. - *PubMed.* 74: 199-210.
- Hassan Y.I., Bullerman L.B.** (2008) Antifungal activity of Lactobacillus, Paracasei sp., tolerans isolated from a sourdough bread culture. - *International Journal of Food Microbiology* 121:12-115.
- Hatti-Kaul R., Chen L., Dishisha T., Enshasy H.** (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. - *FEMS Microbiology Letters.* 365: 266-279.
- Hocking A.D.** (2008) [e-book] Mould and yeast associated with foods of reduced water activity. Ecological interactions. Food preservation by moisture control. Völjaandja: Elsevier, London
- Jach M., Serefko A., Sajnaga E., Kozak E., Poleszak E., Malm A.** (2015) Dietary Supplements Based On The Yeast Biomass - *Current Topics In Nutraceutical Research* 13: 83-88.
- Jackson S., Dobson A.** (2011) Yeasts and Molds: Penicillium camemberti. - *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 776-779.

- Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M., Hussain T., Ali M., Rafiq M., Kamil M.** (2008) Bacterial biofilm and associated infections. - *Journal of the Chinese Medical Association* 81:7-11.
- Jarvis B.** (2001) Mould spoilage of food. - *Process Biochemistry* 7:11-14.
- Jay J., Vilai J., Hughes M.** (2003). Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 °C. - *International Journal of Food Microbiology*. 81:105-111.
- Jayabalan, Malbaša, Lonča, Vitas, Sathishkumar** (2014). A Review on Kombucha Tea— Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. - *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 13: 538-550.
- Jørgensen L., Huss H., Dalgaard P.** (2003). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. - *Journal of Applied Microbiology*. 89: 920-934.
- Jääskeläinen E. L., Häggblom M., Adersson M., Vanne L., Salkinoja-Salonen S.M.** (2002) Potential of *Bacillus cereus* for Producing an Emetic Toxin, Cereulide, in Bakery Products: Quantitative Analysis by Chemical and Biological Methods. - *Journal of Food Protection* 66: 1047–1054.
- Kaplan J. B.** (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. - *J Dent Res* 89:205–218.
- Kawarai T., Furukawa S., Ogihara H., Yamasaki M.** (2007) Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. - *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4673- 4676.
- Keijser B., Zaura E., Huse S., Vossen M., Schuren F., Montijn R., Cate J., Crielaard W.** (2008)
- Kendall M. M., Sperandio V.** (2007) Quorum sensing by enteric pathogens. - *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23:10–15.
- Kent A.** (2010) Steam biofilm. [veebileht] https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Stream_biofilm (9.05.2019)
- Kim J., Diao J., Shepherd M., Singh R., Heringa S., Gong C., Jiangcorresponding X.** (2012) Validating Thermal Inactivation of *Salmonella* spp. in Fresh and Aged Chicken Litter - *Applied Environmental Microbiology* 78: 1302–1307.
- Kim S., Kim N., Lee S., Hwang I., Rhee M..** (2014). Survival of foodborne pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) and *Bacillus cereus* spores in fermented alcoholic beverages (beer and refined rice wine). - *Journal of food protection*. 77: 419-426.
- Kim Y., Kim H., Beuchat L., Ryu J.** (2018) Development of non-pathogenic bacterial biofilms on the surface of stainless steel which are inhibitory to *Salmonella enterica*. - *Food Microbiology* 69: 136-142.
- Kumamoto C.** *Candida* biofilms (2002) - *Current Opinion in Microbiology*. 5: 608-611.

- Kurtzman C., Piškur J.** (2005). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. - *Topics in Current Genetics*. 15: 29-46.
- Lemon K. P., Earl A. M., Vlamakis H. C., Aguilar C., Kolter R.** (2008) Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. - *Curr Top Microbiol Immunol*. 322:1–16.
- Liao C.** (1989). Analysis of Pectate Lyases Produced by Soft Rot Bacteria Associated with Spoilage of Vegetables. - *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1677-1683.
- Licker M., Moldovan R., Hogeia E., Muntean D., Horhat F., Baditoiu L., Rogobete A., Tîrziu E., Zambori C.** (2017). Microbial biofilm in human health- an updated theoretical and practical insight. - *Revista Română de Medicină de Laborator*. 25:9-26.
- Lim J., Yoon J., Hovde C.** (2010) A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157 - *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 5–14.
- Lin S., Svoboda K., Giletto A., Seibert J., Puttaiahe R.** (2011). Effects of Hydrogen Peroxide on Dental Unit Biofilms and Treatment Water Contamination. - *European Journal of Dentistry*. 5:47–59.
- Liu M., Wang H., Griffiths M.** (2007). Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. - *Journal of applied microbiology*. 103: 2174-2184.
- Liu Y., Liu C., Zheng W., Zhang X., Yu J., Gao Q., Hou Y., Huang X.** (2008) PCR Detection of *Klebsiella Pneumoniae* in Infant Formula Based on 16S-23S Internal Transcribed Spacer. - *Int J Food Microbiol* 125:230-5
- Ljungh A., Wadström T.** (2006) Lactic acid bacteria as probiotics. - *Curr Issues Intest Microbiol* 7:73-89.
- Mahapatra A., Padhi N., Mahapatra D., Bhatt M., Sahoo D., Jena S., Dash D., Chayani N.**(2015). Study of Biofilm in Bacteria from Water Pipelines. - *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9:109-111.
- Metris A., George S., Mulholland F., Carter A., Baranyi J.** (2014) Metabolic Shift of *Escherichia coli* under Salt Stress in the Presence of Glycine Betaine. - *Applied and environmental microbiology* 15: 4745–4756.
- Miller M., Bassler B.** (2001) Quorum Sensing in Bacteria. - *Annual review of microbiology* 55:165-99.
- Misba L., Zaidi S., Khan A.** (2017) A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. - *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 18: 24-33.
- Missiakas D., Schneewind O.** (2013) Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. - *Curr Protoc Microbiol*. 9:1-23.
- Monroe D.** (2007) Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms - *PLOS Biology* 5: 307.

- Morey P., Feeley J.** (2011) [e-book] Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living. Völjaandja: Wageningen academic publishers, Taani
- Morohoshi T., Oi T., Aiso H., Suzuki T., Okura T., Sato S.** (2018) Biofilm Formation and Degradation of Commercially Available Biodegradable Plastic Films by Bacterial Consortia in Freshwater Environments. - *Microbes and environments* 33:332–335.
- Moss M.** (2008) Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. - *Journal of Applied Microbiology* 104: 1239-1243.
- Mousse W., Adjanohoun A., Sina H., Baba-Moussa L.** (2016) Klebsiella pneumoniae isolated from street foods: characterization for extended spectrum β -lactamases production and antibiotics resistance profile - *Biochemistry and Biotechnology Research* 4: 27-37.
- Nawaz M., Khan S., Tran Q., Sung K., Khan A., Adamu I., Steele R.** (2012) Isolation and characterization of multidrug-resistant klebsiella spp. Isolated from shrimp imported from Thailand. - *International Journal of Food Microbiology*. 155: 179–184.
- Oh Y., Lee N., Jo W., Jung W., Lim J.** (2009) Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. - *Ultramicroscopy* 109:874-80.
- Oliwa-Stasiak K., Molnar C., Arshak K., Bartoszcze M., Adley C.** (2009) Development of a PCR assay for identification of the Bacillus cereus group species. - *Journal of applied microbiology* 108: 266-273
- Oliveira A., Cunha M.** (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. - *BMC Research Notes*. 3: 260-275.
- Omotayo O., Omotayo A., Mwanza M., Babalola O.** (2019) Prevalence of Mycotoxins and Their Consequences on Human Health. - *Toxicol Res*. 35:1–7.
- Pag X., Liu C., Lyu P., Zhang S., Liu L., Lu J.** (2016). Identification of Quorum Sensing Signal Molecule of Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus. *Journal of agricultural food chemistry* 64: 9421–9427.
- Papageorgiou D., Marth E.** (1989) Fate of Listeria monocytogenes during the Manufacture, Ripening and Storage of Feta Cheese - *Journal of food protection* 52:82-87.
- Paterson R., Lima N.** (2017) Filamentous Fungal Human Pathogens from Food Emphasising Aspergillus, Fusarium and Mucor. – *Microorganisms* 5:44.
- Pepe O., Blaiotta G., Moschetti G., Greco T., Villani F.** (2003) Rope-Producing Strains of Bacillus spp. from Wheat Bread and Strategy for Their Control by Lactic Acid Bacteria - *Appl Environ Microbiol* 69:2321–2329.
- Phelps R., McKillip J.** (2002) Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the Bacillus cereus group. *Appl Environ Microbiol* 68:3147-51.

- Poormontaseri M., Hosseinzadeh S., Shekarforoush S., Kalantari T.** (2007) The effects of probiotic *Bacillus subtilis* on the cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type a in Caco-2 cell culture. - *BMC Microbiology*. 17:21-29.
- Powledge T.** (2004) The polymerase chain reaction. - *Advances in Physiology Education* 28:44-50
- Quorum sensing in bacteria (2018) [veebileht] <https://www.accessscience.com/content/quorum-sensing-in-bacteria/BR1220171> (7.05.2019)
- Qureshi S.** (10.06.2019) *Klebsiella* Infections [veebileht] <https://emedicine.medscape.com/article/219907-overview> (4.03.2020)
- Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.** (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. - *Future Medicinal Chemistry*. 7: 493–512.
- Remenant B., Jaffrès E., Dousset Xavier D., Zagorec M.** (2015) Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties - *Food Microbiology* 45:45-53.
- Ristuccia P., Burke A.** (1984) *Klebsiella*. - *Infection Control*. 5: 343–348.
- Roessler P. F, Ballenger M. C.** (1996) Contamination of an Unpreserved Semisoft Baked Cookie with a Xerophilic *Aspergillus* species. - *Journal of Food Protection* 59: 1055-1060.
- Romano P., Capece A., Jespersen L.** (2006). Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. - *Yeasts in Food and Beverages*. 13-14.
- Rosseti I., Rochab J., Costa M.** (2015) Diphenyl diselenide (PhSe)₂ inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. - *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 29:289-295.
- Rowland I, Capurso L, Collins K, et al.** (2010). Current level of consensus on probiotic science. - *Gut Microbes*. 1: 436–439.
- Rutherford S., Bonnie B.** (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. - *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2: 5-15.
- Saini R, Saini S, Sharma S.** (2011). Biofilm: A dental microbial infection. - *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 7:71–75.
- Salmonella the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union (2019) [veebileht] <http://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union> (13.04.2020)
- Saranraj P., Sivasakthivelan P.** (2015). Microorganisms Involved in Spoilage of Bread and Its Control Measures. - *ResearchGate*. 113-149.
- Saranraj P., Geetha M.** (2012). Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. - *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 3:38-48.
- Schaack C., Marth M.** (1988) Survival of *Listeria monocytogenes* in cultured buttermilk and yoghurt - *Letters in Applied Microbiology* 43:790-792.

- Scheirlinck I., Van der Meulen R., De Vuyst L., Vandamme P., Huys G.** (2009) Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments - *Journal of Applied Microbiology*. 106:1081-1092.
- Sehar S., Naz I.** (2016). Role of the Biofilms in Wastewater Treatment. - *IntechOpen*. 529-570.
- Seongbeom C., Bender J., Diez-gonzalez F., Fossler C., Hedberg C., Kaneene J., Ruegg P., Warnick L., Wells S.** (2006) Prevalence and Characterization of Escherichia coli O157 Isolates from Minnesota Dairy Farms and County Fairs. - *Journal of Food Protection* 69:252–259.
- Sharma V., Sharma A., Seth R.** (2016) Effect of Temperature and pH variations on Growth Pattern of keratinophilic fungi from Jaipur, India - *Entomology and Applied Science Letters* 3:177-181.
- Singh S., Anwar S., Sharma H., Chaudhary U., Verma S.** (2014) FemA gene in Indian isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus – isolation and amplification through real time PCR - *European journal of experimental biology* 4:90-94
- Skandamis P, Nychas G.** (2012). Quorum Sensing in the Context of Food Microbiology. - *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 5473–5482.
- Smith J.P., Daifas D.P., El-Khoury W., Koukoutsis, El- Khoury A.** (2004) Shelf life and safety
- Snelling A., Kerr K., Heritage J.** (1991) The Survival of Listeria monocytogenes on Fingertips and Factors Affecting Elimination of the Organism by Hand Washing and Disinfection 54: 343-348.
- Solano C., Echeverz M., Lasa I.** (2014) Biofilm dispersion and quorum sensing - *Curr. Opin. Microbiol.* 18:96–104.
- Soni A., Oey I., Silcock P., Bremer P.** (2018) Impact of temperature, nutrients, pH and cold storage on the germination, growth and resistance of Bacillus cereus spores in egg white. - *Food Research International* 106: 394-403.
- Stellato G., Utter D., Voorhis A., Angelis M, Eren M., Ercolini D.** (2017) A Few Pseudomonas Oligotypes Dominate in the Meat and Dairy Processing Environment. – *Fontiers in Microbiology* 8:264.
- Stepaniak** (2004). Dairy enzymology. - *International Journal of Dairy Technology*. 57: 153-171.
- Tachikawa M., Yamanaka K., Nakamuro K.** (2008). Studies on the Disinfection and Removal of Biofilms by Ozone Water Using an Artificial Microbial Biofilm System. - *The Journal of the International Ozone Association*. 31:3-9.
- Talawat S., Ahantharik P., Laohawiwattanukul S., Premasuk,A., Ratanapo S.** (2006) Efficacy of Fermented Teas in Antibacterial Activity. - *Kasetsart Journal* 40: 925 – 933.
- Targalska M., Kunicka-Styczyńska A.** (2017) Candida Biofilms: Environmental and Clinical Aspects. – *IntechOpen*

- Taylor T., Unakal C.** (2018) [e-book] *Staphylococcus Aureus*. Väljaandja: StatPearls Publishing
- Tienungoon S, Ratkowsky D.A., McMeekin T.A., Ross T.** (2000) Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. - *Appl Environ Microbiol.* 66 :4979–4987.
- Todar K.** (2008). Lactic Acid Bacteria. - *SCIENCE Magazine.* 304: 1421
- Tutelyan A.V., Yushina Y., Sokolova O.V., Bataeva D.S., Fesyun A.D., Datiy A.V.** (2019) Formation of biological films by microorganisms in food productions. - *Problems of Nutrition* 88: 32–43. (vene keeles)
- Ucar M., Pogliano K.** (07.06.2015) *Bacillus subtilis* [veebileht] https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_subtilis (15.02.2020)
- Valasek M., Repa J.** (2005) The power of real-time PCR. - *Advances in Physiology Education* 29:151-159.
- Walker K., Skelton H., Smith K.** (2002) Cutaneous lesions showing giant yeast forms of *Blastomyces dermatitidis*. - *Journal of cutaneous pathology* 29: 616-618.
- Walker-Daniels J.** (2012). Current PCR Methods. - *Materials and Methods.* 119-122.
- Van Dijk J., Hecker M.** (2013) *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. - *Microbial Cell Factories.* 12:3.
- Wang R.** (2019). Biofilms and Meat Safety: A Mini-Review. - *International Association for Food Protection.* 120-127.
- Warda A., Tempelaars M., Abee1 T., Nierop Groot M.** (2016) Recovery of Heat Treated *Bacillus cereus* Spores Is Affected by Matrix Composition and Factors with Putative Functions in Damage Repair - *Frontiers in Microbiology* 7:1096.
- Warnock D.W.** (2012). Fungi. Superficial, subcutaneous and systemic mycoses. - *Medical Microbiology.* 616-641.
- Viljoen R., Von Holy A.** (1997). Microbial populations associated with commercial bread production. - *Journal of Basic Microbiology* 37:439-444.
- Wirtanen G., Salo S.** (2016) [e-book] Handbook of Hygiene Control in the Food Industry (Second Edition) Väljaandja: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition
- Wirtanen G., Storgårds E., Mattila-Sandholm T.** (2003) [e-book] Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Väljaandja: Academic press
- Voetsch A., Van Gilder T., Angulo F., Farley M., Shallow S., Marcus R., Cieslak P., Deneen V., Tauxe R.** (2004) FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States *Clinical Infectious Diseases* 38: 127–134.
- Wolfe B., Button J., Santarelli M., Dutton R.** (2014) Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. - *Cell* 158:422–433.

LISAD

Lisa 1. Mikroobide pesa- ja rakumorfoloogiate kirjeldus leivatööstuse seadmete biokileproovide väljakülvides

| Nr. | Proovi nr. | Pesa nr. | Koloonia morfoloogia | Rakkude morfoloogia |
|-----|------------|----------|---|--|
| 1 | A1 | 1 | kollane, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates, suurus 1 µm |
| 2 | | 2 | roosa, ümar, läikiv, kumer | pungad võrgus suurus 3x5 µm ja 5x7 µm |
| 3 | | 3 | valge, ümar, läikiv, kumer | pungad kobarates 2x3 µm |
| 4 | | 4 | beež, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 5 | A2 | 5 | valge, ebakorrapärane kuju, läikiv, sile | G+pulkbakterid ahelates, endosporidega, 1x3 µm |
| 6 | | 6 | kollane, ümar, läikiv, kumer | G+ pulgad ahelates 1x2-3 µm |
| 7 | A3 | 7 | valge, ühtlane, puujuure kuju, matt, sile | G+pulkbakterid ahelates, endosporidega, 2x4 µm |
| 8 | A4 | 8 | beež, ebakorrapärane kuju, ühtlane, läikiv, sile | G-kokid kobarates 1 µm |
| 9 | | 9 | oranž, keskelt tume, ebakorrapärane kuju, läikiv, kumer | G+ pulkbakterid ahelates 1x3-10 µm |
| 10 | A5 | 10 | kollane, puujuure kuju, läikiv, sile | G+ kokid võrgus 1 µm |
| 11 | A6 | 11 | valge, ühtlane, puujuure kuju, matt, sile | G+ pulkbakterid endosporidega 1x2 µm |
| 12 | A7 | 12 | valge, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+ pulkbakterid endosporidega 1x4 µm |
| 13 | | 13 | valge, ebakorrapärane kuju, tuhm, sile | G+ pulkbakterid endosporidega 1x4 µm |
| 14 | A8 | 14 | valge, ühtlane, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+ pulkbakterid endosporidega 1x2-4 µm |
| 15 | A9 | | kasv puudub | |
| 16 | A10 | 15 | beež, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates, suurus 1 µm |
| 17 | | 16 | kollane, puujuure kuju, läikiv sile | G+ pulkbakterid võrgus 1x2 µm |
| 18 | A11 | 17 | beež, keskelt kollane, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates, suurus 1 µm |

| Nr. | Proovi nr. | Pesa nr. | Koloonia morfoloogia | Rakkude morfoloogia |
|-----|------------|----------|---|---|
| 19 | A11 | 18 | valge, keskelt beež, ümar, läikiv, kumer | G+ pulkbakterid võrgus 1x2µm |
| 20 | A12 | 19 | läbipaistev, ümar, läikiv, sile | G+pulkbakterid 1x2-6µm, G+ pulgad ahelates 1x2-3 µm |
| 21 | B1 | 1 | valge, ümar, tihedalt kasvanud, läikiv, sile | pungad kobarates 3x4 µm |
| 22 | B2 | 2 | valge, ühtlane, läikiv, sile | G+pulkbakterid ahelates 1x3 µm, seest tühjad |
| 23 | B3 | 3 | valge, ebakorrapärane, tuhm, sile | G+pulkbakterid, ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 24 | | 4 | läbipaistev, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+ pulkbakterid 1x3-5 µm |
| 25 | B4 | 5 | beež, ümar, tuhm, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-7 µm |
| 26 | | 6 | beež, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates, suurus 1 µm |
| 27 | B5 | 7 | beež, ümar, läikiv, kumer | pungad kobarates 3x4 µm |
| 28 | B6 | 8 | oranž, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates, suurus 1 µm |
| 29 | | 9 | beež, ebakorrapärane kuju, tuhm, sile | G+pulkbakterid võrgus endosporidega 1x2-4 µm |
| 30 | B7 | 10 | beež, keskelt tume, ebakorrapärane kuju, tuhm, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x4-5µm |
| 31 | | 10(1) | valge, ebakorrapärane, tuhm, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x5-6 µm |
| 32 | | 11 | beež, ebakorrapärane kuju, tuhm, sile | G+ pulkbakterid ahelates 1x3-5 µm |
| 33 | B8 | 12 | valge, ühtlane, läikiv, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x4-6 µm |
| 34 | B9 | 13 | beež, ümar, tuhm, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 35 | | 14 | tume beež, ebakorrapärane kuju, tuhm, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x2-5µm |

| Nr. | Proovi nr. | Pesa nr. | Koloonia morfoloogia | Rakkude morfoloogia |
|-----|------------|----------|--|--|
| 36 | B10 | 15 | beež, ümar, tuhm, sile | G+ pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 37 | B10 | 16 | kollane, puujuure kuju, läikiv, sile | G+ pulkbakterid võrgus 1x2 µm |
| 38 | B11 | 17 | kollane, ümar, läikiv, kumer, tihedalt kasvanud | G+pulkbakterid ahelates 1x2 µm |
| 39 | | 17(1) | läbipaistev, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1µm |
| 40 | B12 | 18 | valge, ebakorrapärane, tuhm, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x5-10 µm |
| 41 | | 19 | valge, ümar, läikiv, kumer | pungad kobarates 3x5 µm |
| 42 | C1 | 1 | valge, ääred läbipaistvad, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 0,5x3-6µm |
| 43 | | 2 | kollane, ümar, keskelt kõrgenenud, läikiv | G+pulkbakterid ahelates 1x2µm |
| 44 | C2 | 3 | läbipaistev, ühtlane, läikiv, sile | G+pulkbakterid ahelates 1x3µm |
| 45 | C3 | 4 | valge, ebakorrapärane, ääred läbipaistvad, natuke kõrgenenud, läikiv | G+kõverad pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 46 | | 5 | beež, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 47 | C4 | 6 | valge, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 48 | C5 | 7 | läbipaistev, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 49 | | 8 | beež, puujuure kuju, läikiv, sile | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 50 | | 9 | läbipaistev, ebakorrapärane, läikiv, sile | G- pulkbakterid 1x3-5 µm |
| 51 | C6 | 10 | beež, keskelt kollane, ebakorrapärane kuju, tuhm, sile | G+ pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 52 | | 11 | valge, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid 1 µm |
| 53 | | 12 | valge, ebakorrapärane, tuhm, sile | G+ kokid kobarates 1µm, G+ pulkbakterid endosporidega 1x3 µm |

| Nr. | Proovi nr. | Pesa nr. | Koloonia morfoloogia | Rakkude morfoloogia |
|-----|------------|----------|---|---|
| 54 | C7 | 13 | valge, keskelt beež, ebakorrapärane, tuhm, lame | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 55 | | 14 | valge, ümar, läikiv, kumer | kerabakterid kobarates 3x4 µm |
| 56 | C8 | 15 | beež, ühtlane, läikiv, lame | G+ pulkbakterid endosporidega 1x3µm, G+ kokid 1 µm |
| 57 | C9 | 16 | valge, ümar, läikiv | pungad kobarates 3x5 µm, pisikesed pulkbakterid 1x2µm |
| 58 | C10 | | kasv puudub | |
| 59 | C11 | 17 | kollane, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid 1 µm |
| 60 | | 18 | beež, keskelt roosakas, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid 1 µm |
| 61 | | 19 | oranž, ümar, läikiv, kumer | G+ pulkbakterid 1x2 µm |
| 62 | C12 | 20 | beež, kortsustega, ebakorrapärane, tuhm, lame | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 63 | | 21 | valge, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-5 µm |
| 64 | | 22 | beež, ääred läbipaistvad, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+ pulkbakterid ahelates endosporidega 1x3-6 µm |
| 65 | D1 | 1 | valge, ümar, tihedalt kasvanud, läikiv, kupliga | pungad võrgus 3x5 µm |
| 66 | D2 | 2 | beež, ebakorrapärane, ühtlane, puujuure kuju, läikiv sile | G+pulkbakterid ahelates endosporidega 1x2-5 µm |
| 67 | | 3 | valge, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 68 | | 4 | kollane, ümar, läikiv, kumer | G+ pulkbakterid 1x2-3 µm |
| 69 | D3 | 5 | läbipaistev, ümar, läikiv, kumer | G- pulkbakterid ahelates 1x2-5 µm |
| 70 | D4 | | kasv puudub | |
| 71 | D5 | 6 | valge, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 72 | | 7 | beež, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 73 | D6 | 8 | valge, ümar, läikiv, sile | G- pulkbakterid ahelates 1x3-6 µm |

| Nr. | Proovi nr. | Pesa nr. | Koloonia morfoloogia | Rakkude morfoloogia |
|-----|------------|----------|---|--|
| 74 | D7 | 9 | beež, ebakorrapärane, läikiv, sile | G+ pulkbakterid 1x2-3 µm |
| 75 | D8 | 10 | valge, ümar, tuhm | G+ pulgad 1x2 µm |
| 76 | | 11 | valge, ümar, läikiv, sile | G+ pulgad 1x2-3 µm |
| 77 | D10 | 12 | beež, ebakorrapärane, läikiv, kumer | G+ kokid ahelates 1µm |
| 78 | D10 | 13 | kollane, ümar, tihedalt kasvanud, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1µm |
| 79 | D11 | 14 | oranž, ümar, läikiv, keskelt kõrgenenud | G- pulkbakterid 1x2 µm |
| 80 | | 15 | beež, ebakorrapärane, läikiv, kumer | G+ pulkbakterid ahelates 1x2-3 µm |
| 81 | | 16 | läbipaistev, ühtlane, puujuure kuju, läikiv, sile | G+ kokid kobarates 1µm |
| 82 | | 16(1) | valge, ümar, läiliv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 83 | | 17 | vage, puujuure kuju, läikiv, sile | G+ pulkbakterid, seest tühjad 1x2-3 µm |
| 84 | | 18 | beež, ümar, kortsustega, tuhm, lame | G+ pisikesed pulgad 1x2 1µm |
| 85 | | 19 | kollane, ümar, läikiv, kumer | G+ kokid kobarates 1 µm |
| 86 | | D12 | 20 | valge, ümar, tihedalt kasvanud, tuhm, sile |

**Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja
kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Mina, Aljona Kuzina,

sünniaeg 16.04.1998,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda koostatud lõputöö
Biokile mikrobioota leivatööstuse seadmetel,
mille juhendaja(d) on Helena Andreson,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks
kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____
(allkiri)

Tartu, 13.05.2020

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Helena Andreson _____
(juhendaja nimi ja allkiri)

13.05.2020
(kuupäev)