



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Niina Kauppila

Listerian kasvu kasviproteiinivalmisteessa

Opinnäytetyö

Kevät 2023

Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Tutkinto-ohjelma: Insinööri (AMK), Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Elintarviketeknologia

Tekijä: Niina Kauppila

Työn nimi alaotsikoineen: Listerian kasvu kasviproteiinivalmisteessa

Ohjaaja: Merja Kyntäjä ja Tiina Laitila

Vuosi: 2023

Sivumäärä: 36

Liitteiden lukumäärä: 2

Elintarvikeala on muuttunut kasvipohjaisten elintarvikkeiden lisääntyneen kulutuksen myötä. Markkinoilla on kasvava määrä erilaisia lihaa ja eläinperäisiä elintarvikkeita korvaavia valmisteita. Alan koulutussisältö on kuitenkin siitä huolimatta pysynyt pitkään melko samana. Tämän opinnäytetyön toimeksiantajan, European Qualifications & Competences for the Vegan Food Industry (EQVEGAN) -hankkeen, tarkoitus onkin parantaa ja päivittää elintarvikealan koulutusta vastaamaan tätä kehityssuuntausta.

Vaikka *Listeria monocytogenes* on yksi tunnetuimmista ruokamyrkytyksiä aiheuttavista bakteereista, tietoa sen lisääntymisestä kasviproteiinivalmisteissa on vaikeasti saatavilla. *L. monocytogenes* aiheuttamia epidemioita ei ilmene usein, mutta sen aiheuttama taudinkuva voi kuitenkin olla riskiryhmiin kuuluville hengenvaarallinen. Tämä tekee sen valvonnasta erityisen tärkeää. Tutkimustavoitteena tässä työssä olikin selvittää, pystyykö *L. monocytogenes* kasvamaan kasviproteiinivalmisteessa, sekä millaisia vaikutuksia eri säilytyslämpötiloilla ja -ajoilla on bakteerikasvuun.

Tutkittavana näytteenä työssä käytettiin hernelproteiinipohjaista kasvismakkaraa. Mikrobia siirrostettiin näytteiden sisälle kahtena eri pitoisuutena, minkä jälkeen ne pakattiin vakuumpakkauksiin. Näytteitä säilytettiin 1, 3 ja 6 vuorokautta kahdessa eri lämpötilassa: +3,0–4,5 °C ja +5,5–7,5 °C. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä sekä nollanäytteet, jotka toimivat referenssinä. Yhteensä työssä tutkittiin 42 makkaranäytettä.

Tämän opinnäytetyön tulokset osoittavat, että *L. monocytogenes* pystyy lisääntymään hernelproteiinipohjaisessa kasvismakkarassa. Bakteerikasvu on myös mahdollista lämpötilan ollessa alhainen, vaikkakin sen noustessa myös bakteerien kasvu kiihtyy. Ensimmäisen päivän jälkeen bakteerikasvu tuotteessa oli maltillisempaa, mutta kolmannen päivän jälkeen kasvussa tapahtui selkeä muutos etenkin lämpötilan ollessa korkeampi. Saaduista tuloksista voidaan siis päätellä, että pienikin muutos lämpötilassa tai säilytysajassa voi heikentää tai parantaa elintarvikkeen mikrobiologista laatua, ja siten pidentää tai lyhentää tuotteen säilymisaikaa. Oikeanlaisilla säilytysolosuhteiden noudattamisella voidaan merkittävästi vähentää elintarvikkeista saatavia ruokamyrkytystapauksia.

¹ Asiasanat: *Listeria monocytogenes*, kasviproteiinivalmisteet, elintarviketurvallisuus

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Degree programme: Food Processing and Biotechnology

Specialisation: Food Technology

Author: Niina Kauppila

Title of thesis: The Growth of Listeria in Plant Protein Product

Supervisors: Merja Kyntäjä and Tiina Laitila

Year: 2023

Number of pages: 36

Number of appendices: 2

Food industry has changed because of the increased consumption of plant-based food. There is an increasing number of different products replacing meat and animal-based products in the market. However, the education content has been the same. The thesis was part of the European Qualifications & Competences for the Vegan Food Industry (EQVEGAN) project, which aims to improve and update the food industry education.

Listeria monocytogenes is one of the most well-known bacteria causing food poisoning. However, research results about its growth in plant-based protein products can be challenging to detect. Listeriosis, disease caused by *L. monocytogenes*, can be dangerous to people in risk groups. This makes its control important. The aim of the thesis was to investigate if *L. monocytogenes* can grow in plant-based meat product. The other aim was to research the effects of different storage temperatures and times on bacterial growth.

Pea-based sausages were used as samples in the research. Microbes were inoculated inside the sausages in two different concentrations. After this, they were packed in vacuum. The samples were stored for 1, 3 and 6 days at two different temperatures: +3,0–4,5°C and +5,5–7,5 °C. Three parallel samples were made from each sample as well as blank samples, which functioned as a reference. In total, 42 sausage samples were analyzed.

The results of the research show that *L. monocytogenes* is capable to grow in pea protein-based sausage. Bacterial growth is also possible in low temperatures. During the first days, bacterial growth was more slow, but after the third day a clear change can be seen. Especially when the temperature was higher. From the obtained results can be concluded that even a small change in temperature or storage time can affect the microbiological quality of the food product. By following the right storage conditions, cases of food poisoning can be reduced.

¹ Keywords: *Listeria monocytogenes*, plant protein products, food safety

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä	2
Thesis abstract	3
SISÄLTÖ	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkuuettelo	5
Käytetyt termit ja lyhenteet.....	6
1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET	7
2 KASVIPROTEIINI VALMISTE	8
3 ELINTARVIKETURVALLISUUS	10
4 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	12
4.1 <i>L. monocytogenes</i> elintarvikkeissa.....	12
4.2 Listerioosi	14
4.3 Ehkäisykeinot	14
4.3.1 Teollisuus.....	15
4.3.2 Kotitaloudet.....	16
5 MENETELMÄKUVAUS	17
6 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS.....	22
7 TULOKSET	25
8 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	31
LÄHTEET	33
LIITTEET	36

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. Seinäjoen ammattikorkeakoulun laminaarivirtauskaappi.	17
Kuva 2. <i>L. innocuan</i> muodostamia pesäkkeitä agarmaljalla.	20
Kuva 3. <i>L. innocualla</i> siirrostettua TSB:tä siirrostettuna agarmaljalle bakteeripitoisuuden laskemista varten.	22
Kuva 4. Herneproteiinista valmistettuja makkaroituja	23
Kuva 5. ”Päivä 1” -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille..	25
Kuva 6. ”Päivä 1” -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille..	26
Kuva 7. ”Päivä 3” -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille..	26
Kuva 8. ”Päivä 3” -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille..	27
Kuva 9. ”Päivä 6” -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille..	28
Kuva 10. ”Päivä 6” -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille.	28
Kuvio 1. Elintarvike- ja talousvesivälitteiset epidemiat vuosina 1975–2019.....	11
Kuvio 2. KWIK-STIK-yksikön käsittelyohje.....	18
Kuvio 3. Laimennossarjan valmistusperiaate.....	20
Kuvio 4. Bakteerikasvun kehitys päivien 1 ja 6 välillä, kun näytteisiin on siirrostettu <i>L. innocuaa</i> pitoisuutena 10^4 pmy/pakkaus.....	29
Kuvio 5. Bakteerikasvun kehitys päivien 1 ja 6 välillä, kun näytteisiin on siirrostettu <i>L. innocuaa</i> pitoisuutena 10^7 pmy/pakkaus.....	30

Käytetyt termit ja lyhenteet

Agar	Polysakkaridi, jota käytetään jähmettämään nestemäisiä elatusaineita. Valmistetaan ruskolevistä.
Autoklavointi	Sterilointi.
a_w-arvo	Veden aktiivisuuden arvo. Veden määrä, joka on mikrobien käytettävissä. Vaihtelee välillä 0–1.
Biofilmi	Koostuu mikrobeista ja niiden tuottamasta suojaavasta limakerroksesta johonkin pintaan kiinnittyneenä.
Dataloggeri	Tiedonkeruulaite. Mitattu tieto tallentuu laitteen sisäiseen muistiin.
Inkubointi	Valvotuissa ja säädellyissä olosuhteissa tehty mikrobien kasvatus.
MRD	Maximum Recovery Diluent. Laimennusliuos.
pmy	Pesäkkeen muodostava yksikkö.
Psykotrofinen	Kylmää sietävä.
TSA	Tryptone Soy Agar.
TSB	Tryptone Soy Broth.

1 JOHDANTO JA TYÖN TAVOITTEET

Kasvipohjaisten elintarvikkeiden suosio on kasvanut, eikä laantumisen merkkejä ole vielä havaittavissa. Monet yritykset ovatkin lähteneet mukaan tähän kehityssuuntaukseen tuomalla markkinoille uusia vaihtoehtoisia elintarvikkeita eläinperäisille tuotteille. Sen sijaan alan koulutus ja opetussisältö on pysynyt pitkään melko samana.

Tämän opinnäytetyön toimeksiantajan European Qualifications & Competences for the Vegan Food Industry (i.a.) (EQVEGAN) -hankkeen tarkoituksena onkin kehittää elintarvikealan koulutussisältöä vastaamaan kasvipohjaisten elintarvikkeiden kasvavaa kysyntää. Koulutussisällön päivittämisellä lisätään alan opiskelijoiden tietämystä sekä osaamista kasvipohjaisiin elintarvikkeisiin liittyen. Hankkeessa on mukana useita oppilaitoksia, yhteensä 11 eri maasta Seinäjoen ammattikorkeakoulu mukaan lukien. Materiaalia tähän hankkeeseen liittyen tuotetaan seitsemällä eri kielellä.

Vaikka *Listeria monocytogenes* on yksi tunnetuimmista ruokamyrkytyksiä aiheuttavista elintarvikevälikkeisistä bakteereista, tutkimuksia sen kasvusta kasviproteiinivalmisteissa ei ole yhtä helposti saatavilla verrattuna esimerkiksi eläinperäisiin elintarvikkeisiin. Tutkimuksia on ainakin tehty käyttäen näytteinä tofua sekä tempeä. Liun ym. (2010) tutkimuksessa selvitettiin *L. monocytogenes* kasvu kolmessa erilaisessa tofuvalmisteessa. Ashenafi (1991) sen sijaan tutki *L. monocytogenes* kasvu tempessä. Molemmat tutkimukset osoittivat *L. monocytogenes* olevan riski ihmisten terveydelle kontaminoidessaan tutkimuksissa käytetyt kasviproteiinivalmisteita. Tofu ja tempe ovat esimerkkejä vanhimmista kasvipohjaisista proteiinivalmisteista (Sudo Foods, 2023), joiden jälkeen markkinoille on kuitenkin tullut paljon muita vaihtoehtoja.

Ruokamyrkytyksen mahdollinen riski näissä uudemmissa kasvipohjaisissa elintarvikkeissa ei välttämättä ole vielä hyvin tiedossa. Tavoitteena tässä opinnäytetyössä olikin tutkia, pystyykö *L. monocytogenes* kasvamaan kasviproteiinista valmistetussa makkarassa. Lisäksi tutkimustavoitteena oli selvittää, millaisia vaikutuksia eri lämpötiloilla ja säilytysajoilla on bakteerikasvuun. Aihetta käsitellään aluksi työhön liittyvän teoriataustan kautta, minkä jälkeen perehdytään menetelmäkuvaukseen, käytännön osuuden toteutukseen sekä tutkimustuloksiin.

2 KASVIPROTEIINIVALMISTE

Kasvikunnan tuotteista saatavia valkuaisaineita kutsutaan kasviproteiineiksi. Tällaisia ovat muun muassa linssit, pavut, herneet, siemenet sekä pähkinät (Terveyskirjasto, 2020). Kasviproteiinivalmisteet ovat elintarvikkeita, jotka on valmistettu jostakin kasviproteiinista tarkoituksena esimerkiksi korvata vastaava eläinperäinen elintarvike.

Erilaisten kasviproteiinivalmisteiden suosio on kasvanut viimeisten vuosien aikana. Tämä näkyy muun muassa markkinoiden kasvaneessa kasvipohjaisten elintarvikkeiden valikoimassa. Osa näistä valmisteista jäljittelee hyvin paljon vastaavaa eläinperäistä elintarviketta. Pienimmistäkin päivittäistavarakaupoista on saatavilla vähintään yhtä vaihtoehtoa: kasvipohjainen korvike jauhelihalle tai kanalle, kasvikunnan tuotteista valmistettuja leikkeleitä ja juuston korvikkeita sekä erilaisia makkaroita. Näiden tuotteiden kasvaneeseen kulutukseen vaikuttavat esimerkiksi ympäristölliset, terveydelliset sekä eläinten oikeuksiin liittyvät tekijät.

Yksinomaan kasviproteiinivalmisteiden ja vaihtoehtoisten proteiinien kulutuksesta ja sen muutoksesta Suomessa oli hankalaa löytää tietoa. S-ryhmän (2022) vuosiraportista käy kuitenkin ilmi, että vuosien 2021–2022 aikana kasvipohjaisten elintarvikkeiden kulutus kokonaisuudessaan on ollut 59 % kaikesta myydystä ruoasta. Myös lihansyönnin lopettaneiden määrässä on näkynyt selkeää muutosta. Johanna Lehdon (2018) kirjoittama artikkeli, joka on kirjoitettu Tilastokeskuksen aineiston pohjalta, kuvaa lihansyönnin lopettaneiden määrän muutosta vuosien 2012 ja 2016 välillä. Kaikissa ikäryhmissä yli 75-vuotiaita lukuun ottamatta lihaa syövien määrä on vähentynyt. Nämä eivät tietenkään automaattisesti kerro kasviproteiinivalmisteiden lisääntyneestä kulutuksesta, mutta antavat viitteitä siihen, että liha korvataan kasvipohjaisilla proteiininlähteillä entistä useammin.

*L. monocytogenes*in riski erityisesti tietyissä eläinperäisissä elintarvikkeissa on yleisesti melko hyvin tiedossa. Sen sijaan bakteerin kasvua kasviproteiinivalmisteissa on tutkittu vähemmän. Wildin ym. (2014) mukaan kasviproteiinivalmisteiden lähellä neutraalia oleva pH sekä korkea proteiini- ja kosteuspitoisuus tekevät tuotteista kuitenkin helposti pilaantuvia. Siten *L. monocytogenes*in tai muidenkaan ruokamyrkytyksiä aiheuttavien bakteerien mahdollisuutta kasviproteiineista valmistetuissa elintarvikkeissa ei saa unohtaa.

Suomessa Paulig (2020) on aikaisemmin tiedottanut kahdesta tapauksesta, jossa kasviproteiinivalmisteesta on löytynyt *L. monocytogenes*. Molemmat tapaukset ovat olleet

Gold&Green Foodsin valmistamissa Nyhtökaura®-valmisteissa. Tuotteet oli valmistettu samalla tuotantolinjastolla ja tapaukset havaittiin yrityksen omavalvonnassa.

Nykyisin kasviproteiinivalmisteissa on yleistynyt herneen käyttö proteiininlähteenä. Etuna tässä on sopivuus monille kuluttajille. Soija on ollut paljon käytetty, mutta yleisenä allergeeninä sen käyttö rajaa sille allergiset henkilöt pois asiakasryhmästä. Allergia-, iho- ja astma-liitto ry:n (i.a.) mukaan herne kuuluu myös allergeeneihin, mutta aiheuttaa kuitenkin soijaa vähemmän oireita. Tässä opinnäytetyössä käytetty kasviproteiinivalmiste oli myös valmistettu herneproteiinista. Hernepohjaiset kasvimakkarat oli tehty tämän opinnäytetyön tavoin osana EQVEGAN-hanketta. Kumpulaisen sekä Wirtasen (sisäinen tietolähde, 2022) laatimasta, hankkeeseen liittyvästä esityksestä selviää, että makkarat valmistettiin kahdesta erillisestä massasta, jotka jauhettiin erillään ennen yhdistämistä yhdeksi massaksi. Toinen massa koostuu herneproteiinista, karrageenista, rapsiöljystä sekä konjakista (E425), kun taas toisen massan raaka-aineita ovat muun muassa mausteet, hiivauute, metyyliiselluloosa (E461) sekä rautaoksidi (E172). Kuorena makkaroissa käytettiin läpäisevää selluloosakuorta. Oikeanlaisen rakenteen saamiseksi kypsennys on tehty korkeassa lämpötilassa.

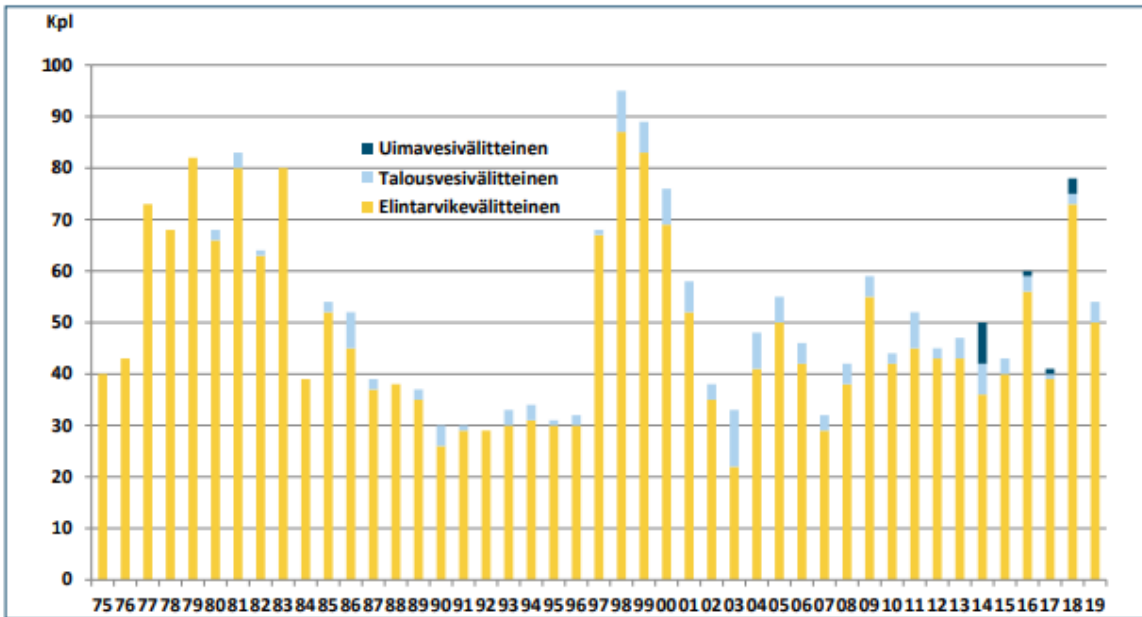
3 ELINTARVIKETURVALLISUUS

Suomessa elintarvikkeiden turvallisuutta ja laatua valvoo Ruokavirasto. Kunnallisella tasolla turvallisuudesta ja laadunvalvonnasta vastaa kunnan elintarvikeviranomainen.

Elintarvikevalvonnan avulla valvotaan EU:n sekä kansallisen lainsäädännön asettamien vaatimusten toteutumista tarkoituksena taata elintarvikkeiden riittävän hyvä laatu sekä turvallisuus. Elintarvikkeiden turvallisuus sekä asetusten ja lakien noudattaminen on alan toimijoiden vastuulla. Ruokaviraston (2018) mukaan tätä varten toimijoiden onkin laadittava omavalvontasuunnitelma, jonka riittävyden sekä toimivuuden viranomainen varmistaa. Viranomaisten tekemistä elintarvikevalvonnan tarkastuksista laaditaan Oiva-järjestelmän mukainen tarkastuspöytäkirja, jonka tiedot on myös annettava kuluttajien nähtäväksi (Ruokavirasto, 2022a).

Elintarvikeeturvallisuuteen liittyvien vaatimusten toteutumisessa, riskinhallinnassa sekä toiminnan jatkuvassa kehittämisessä apuna voidaan hyödyntää ISO 22000 -standardia. Suomen Standardisoimisliitto (SFS) (i.a.) kertoo, että kyseisen standardin käyttö on osoitus siitä, että yritys noudattaa kansainvälisiä kriteereitä taaten kuluttajille laadukkaita ja turvallisia elintarvikkeita. Lisäksi standardin käyttö vaatii, että paikallisia asetuksia ja lakeja noudatetaan. Kun elintarvikkeiden tuottaja on sertifioinut toimintansa ISO 22000 -standardilla, on se takaus kansainvälisten vaatimusten noudattamisesta.

Ruokaviraston (2021) mukaan vuosien 1975–2019 aikana elintarvikevälitteisiä epidemioita on kirjattu Suomessa 2183. Kyseisten vuosien aikana raportoitujen elintarvikevälitteisten epidemioiden määrä on ollut melko vaihtelevaa (kuvio 1). Tarkastelujakson aikana arviointiperusteissa on tapahtunut muutoksia, joten tulokset eivät ole täysin vertailukelpoisia keskenään. Ruokamyrkytyksiä aiheuttavia bakteereita on useita, mutta muutamia yleisimpiä niistä ovat *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp* sekä *Escherichia coli* (Ruokavirasto 2022d). Elintarvikevalvonnasta huolimatta elintarvikevälitteisiä epidemioita ei olla siis onnistuttu täysin ehkäisemään.



Kuvio 1. Elintarvike- ja talousvesivälitteiset epidemiat vuosina 1975–2019 (Ruokavirasto, 2021).

Ruokavirasto (2022c) kertoo, että listerian suhteen elintarvikevalvonnassa keskitytään riskielintarvikkeisiin lukeutuvien elintarvikkeiden valvontaan. Pelkkä viranomaisvalvonta ei itsessään riitä, vaan yrityksen oma valvonnan tulee olla toimintaan nähden riittävä. Oma valvontaan tulee olla sisällytettyä myös riittävän tiheä ja edustava näytteiden otto.

4 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Välimaan ym. (2014, s. 7) teoksesta selviää, että *Listeria*-suku koostuu useista eri lajeista, mutta niistä vain *Listeria monocytogenes* on patogeeninen eli tautia aiheuttava ihmisille. Sitä esiintyy kaikkialla ympäristössä: maassa, vedessä, kasveissa, eläinrehussa sekä jopa ihmisten ja eläinten suolistoissa. Sen kasvuolosuhteet ovat vaihtelevat, joten lisääntyminen useissa erilaisissa ympäristöissä on mahdollista. Sekä anaerobiset, että aerobiset olosuhteet ovat *L. monocytogenekselle* hyviä lisääntymisolosuhteita. Psykotrofisena eli kylmää sietävänä bakteerina se voi myös kasvaa kylmissä olosuhteissa laajalla lämpötila-alueella: $-0,4\text{ °C}$ – $+45\text{ °C}$. Kasvun kannalta pH:n tulisi olla 4,4–9,6, mutta optimaalinen pH-alue on kuitenkin 6–8 välillä. Korkealan (2007, s. 55) teoksesta selviää, että *L. monocytogenes* voi myös kasvaa korkeissakin suolapitoisuuksissa, jopa 10 %:n pitoisuuksissa. Mikäli lämpötila on alhainen, korkeammassakin suolapitoisuuksissa säilyminen voi silti olla mahdollista. Minimi- a_w -arvo eli veden aktiivisuuden arvo kasvun kannalta on 0,92. Se voi kuitenkin säilyä myös arvon ollessa alhaisempi.

4.1 *L. monocytogenes* elintarvikkeissa

L. monocytogenes on yksi tunnetuimmista elintarvikevälikkeistä ruokamyrkytyksiä aiheuttavista bakteereista. Korkeala (2007, s. 59) kirjoittaa, että elintarvikkeisiin se voi tulla lihan tai eläinten tuottaman maidon kautta. Eläinten ulosteesta listeria voi myös kulkeutua maaperän tai veden kautta esimerkiksi kaloihin sekä vihanneksiin ja hedelmiin. Maaperästä se voi kulkeutua myös rehuihin, ja sitä kautta takaisin eläimeen ja syömäämme elintarvikkeeseen.

Ruokavirasto (2022c) on tehnyt listauksen niistä elintarvikkeista, joissa *L. monocytogeneksen* lisääntyminen on todennäköisintä ja joissa listeriariski on korkeampi. Näitä ovat pitkään säilyvät elintarvikkeet, joiden valmistusprosessissa bakteeri ei tuhoudu ja jotka voidaan nauttia ilman kuumentamista. *L. monocytogenes* tuhoutuu pastörintilämpötilassa eli $+72\text{ °C}$:ssa. Kasvaminen anaerobisissa olosuhteissa tarkoittaa sitä, että bakteeri voi säilyä sekä kasvaa suojaakaasupakattujen lisäksi tyhjiöpakatuissa elintarvikkeissa. Esimerkiksi tyhjiöpakatut graa-visualatut ja kylmäsavustetut kalatuotteet lukeutuvat merkittävimpiin riskielintarvikkeisiin. Riskielintarvikkeita ovat lisäksi pastöroidun maito ja juustot, joiden valmistuksessa sitä on käytetty raaka-aineena. Sen lisäksi home- ja kittijuustot, vaikka ne olisikin valmistettu pastöroidusta maidosta, ovat myös riskielintarvikkeita. Kovissa juustoissa *L. monocytogenes* ei pysty kasvamaan. Sellaisenaan syötäviä elintarvikkeita, jotka eivät vaadi kuumennusta, ovat

esimerkiksi valmislihapullat ja -pitsat, nakit sekä muut valmisruoat. Näiden elintarvikkeiden listeriariski kasvaa, mikäli niitä ei kuumenneta bakteerin tuhoutumisen kannalta riittävän kuumaksi. Ruokaviraston mukaan (2022e) tyhjiöpakatut, graavisuolatut sekä kylmäsavustetut kalatuotteet ovat todennäköisimpiä tartunnanaiheuttajia.

L. monocytogenes kasvuolosuhteet määrittävät ne elintarvikkeet, joissa katsotaan, että bakteeri on kykenevä kasvamaan. Ruokaviraston ohjeesta (4095/04.02.00.01/2020/4) selviää, että nämä määräytyvät pH:n sekä veden aktiivisuuden mukaan (a_w). Kun pH on $\leq 4,4$ tai $a_w \leq 0,92$ tuotteet luokitellaan sellaisiksi, joissa *L. monocytogenes* ei voi kasvaa. Se ei voi myöskään kasvaa kun pH on $\leq 5,0$ ja $a_w \leq 0,94$. Samaan ryhmään kuuluvat alle 5 vuorokauden myyntiajan omaavat tuotteet sekä pakastetut ja jäädytetyt tuotteet. Niissä katsotaan, että *L. monocytogenes* on kyvytön kasvamaan. Kasvaakseen *L. monocytogenes* tarvitsee siis neutraalit, emäksiset tai lievästi happamat olosuhteet sekä käytettävissä olevaa vettä. Kuivissa elintarvikkeissa, kuten jauhoissa, pähkinöissä tai kuivatuissa hedelmissä *L. monocytogenes* ei katsota voivan kasvaa, sillä näissä elintarvikkeissa veden aktiivisuuden arvo on riittävän alhainen estämään bakteerin kasvu.

Komission asetus elintarvikkeiden mikrobiologista vaatimuksista (N:o 2073/2005) määrää raja-arvot, kuinka paljon *L. monocytogenes* saa esiintyä tutkitussa näytteessä. Ruokavirasto on lisäksi laatinut ohjeen (4095/04.02.00.01/2020/4) asetuksen soveltamisen tueksi sekä ohjeistamaan elintarvikealan toimijoita elintarvikkeiden mikrobiologisiin tutkimuksiin liittyen. Komission asetuksen sekä Ruokaviraston ohjeen perusteella elintarvikkeet on jaettu kolmeen kategoriaan. Niissä elintarvikkeissa, jotka on tarkoitettu imeväisille sellaisenaan syötäväiksi tai erityisiin lääkinnällisiin tarkoituksiin, sovelletaan tiukempaa raja-arvoa: ei todettu/25 g. Niissä elintarvikkeissa, joissa *L. monocytogenes* voi kasvaa ja joita voidaan nauttia sellaisenaan, sallittu enimmäismäärä pesäkkeitä on 100 pmy/g. Yhtä grammaa kohden hyväksytään siis enimmillään 100 pesäkettä muodostavaa yksikköä. Tässä tapauksessa elintarvikehuoneiston toimijan tulee pystyä osoittamaan pysyminen sallitun rajan alapuolella. Mikäli tätä ei pystytä luotettavasti todentamaan, sovelletaan tämänkin ryhmän tuotteita raja-arvoon ”ei todettu/25 g”. Kun elintarvikkeen ominaisuudet ovat sellaiset, ettei *L. monocytogenes* pysty siinä kasvamaan myyntiaikana, noudatetaan 100 pmy/g raja-arvoa. Tämä ryhmä sisältää myös alle 5 vuorokautta säilytettävät tuotteet, joissa *L. monocytogenes* kasvu on mahdollista.

4.2 Listerioosi

Ruokavirasto (2022e) kertoo, että *L. monocytogenes* aiheuttamaa sairautta kutsutaan listerioosiksi. Yleisin syy saada tartunta on elintarvikkeiden välityksellä, mutta tartunnan voi saada myös sairastuneesta eläimestä. Kotieläimistä saatavan tartunnan riski on kuitenkin hyvin vähäinen. 2000-luvulla esiintyneistä elintarvikevälitteisistä tartunnoista listerioosi on Suomessa neljänneksi yleisin. Infektion saadakseen, elintarvikkeessa tulee olla bakteereja riittävän suuri määrä (Duodecim Terveyskirjasto, 2021).

Duodecim Terveyskirjaston (2021) mukaan listerioosi voi aiheuttaa lievimmillään oksennusta ja ripulia, ja vakavimmillaan verenmyrkytyksen ja aivokalvontulehduksen. Riskiryhmiin kuuluvat iäkkäät, henkilöt, joiden vastustuskyky on alentunut, sekä raskaana olevat. Heillä taudin kuva voi olla rajumpi sekä vaarallisempi kuin riskiryhmiin kuulumattomilla henkilöillä. Itämisaika vaihtelee yhdestä päivästä jopa 70 päivään, mikä voi tehdä taudinmäärityksestä vaikeaa (Välimaa ym., 2014, s. 8).

Zoonosikeskus (Ruokavirasto, 2022b) on koonnut *L. monocytogenes* aiheuttamat epidemiatapaukset 2000-luvun aikana. Tapauksia on ollut yhteensä kahdeksana eri vuotena. Monissa tapauksissa tartunta on tullut kypsistä lihatuotteista, mikä kertoo esimerkiksi jälkikontaminaation mahdollisuudesta. Välittäjäelintarvikkeita ovat olleet lisäksi muun muassa riittämättömästi kuumentamattomat kasvispakasteet sekä ravintolan noutopöydässä tarjolla olleet elintarvikkeet. Kaikissa tapauksissa yhtä ainoaa elintarviketta ei ole voitu tunnistaa taudin aiheuttajaksi.

Vaikka *L. monocytogenes* aiheuttamia listerioosiepidemioita ei viime vuosien aikana ole ollut useita, yksittäisiä tapauksia sen sijaan todetaan vuosittain. Terveys- ja hyvinvoinnintieteen tutkimuskeskuksen (THL) (2023) listauksen mukaan 2000-luvulla on ollut vuosittain 18–91 tapausta.

4.3 Ehkäisykeinot

L. monocytogenes aiheuttamien tartuntojen ehkäisemisessä on tärkeää tuntee riskielintarvikkeet sekä miten niitä tulisi käsitellä ennen syömistä. Teollisuudella on suuri vastuu ehkäistä tartuntoja, mutta kotitaloudet voivat myös omalla toiminnallaan pienentää tartuntariskiä.

4.3.1 Teollisuus

Vaihtelevien kasvuolosuhteiden takia *L. monocytogenes* tuo haasteita elintarviketeollisuudelle. Korkeala ym. (2007, s. 252, 366) kirjoittaa, että kontaminaatioiden minimoimiseksi erityistä huomiota tulee kiinnittää ennaltaehkäisyyn huolehtimalla muun muassa tilojen, prosessointilaitteiden, sekä -välineiden puhtaudesta. Koska *L. monocytogenes* kontaminoi tuotteita usein lämpökäsittelyn jälkeen, on jälkikontaminaation riski näissä prosessivaiheissa suuri. Paras tartuntojen ennaltaehkäisy saavutetaan hygieenisten toimintatapojen tiedostamisella sekä niiden asianmukaisella toteutuksella. Tuotantotilojen oikeanlaisella layoutilla voidaan myös mahdollistaa kontaminaatioiden minimointi sekä ehkäistä jälkikontaminaatioita. Tuotantolaitteiden sijoittelu tulisi siis olla puhdistuksen kannalta optimaalinen. Materiaalivirtojen sekä henkilökunnan kulkeminen tiloissa tulisi toteuttaa siten, ettei epähygieenisimmiltä alueilta kuljettaisi hygieenisia toimia vaativien prosessien alueille ilman kulkua sulkujen kautta.

Korkealan ym. (2007, s. 252, 366) teoksesta selviää, että tuotantotilojen sekä prosessointilaitteiden puhdistuksessa hyödynnetään usein sekä fysikaalisia että kemiallisia puhdistusmenetelmiä. Kemiallisilla pesuaineilla lika saadaan pehmenemään ennen mekaanista puhdistusta. Käytettävät desinfektioaineet tulee lisätä oikeissa pitoisuuksissa, jotta voidaan varmistua bakteerien tuhoutumisesta. Lisäksi on varmistettava, ettei aineita lisätä jo valmiiksi märille pinnoille desinfektioaineen laimenemisen ehkäisemiseksi. *L. monocytogenes*in kohdalla, on myös tärkeää vaihtaa käytössä olevia desinfektioaineita tietyin väliajoin ehkäisemään bakteerin resistenssin syntymistä. Edellä mainitut puhdistusmenetelmät tulee olla sisällytettyinä elintarvikealan toimijan laatimaan omavalvontasuunnitelmaan. Omavalvontasuunnitelman tulee sisältää tietoja siitä, miten usein pesu suoritetaan ja mille pinnoille, sekä mitä aineita ja menetelmiä puhdistuksessa käytetään. Välimaa ym. (2014, s. 7) kirjoittaa, että tuotantotilojen ja -laitteiden puhdistuksessa tulee olla huolellinen, sillä *L. monocytogenes*in kyky muodostaa biofilmiä tuo puhdistukseen lisähaasteita.

Komission asetus elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista (N:o 2073/2005) määrää, että kun elintarvikealan toimija valmistaa tai prosessoi tuotteita, joissa *L. monocytogenes* -riski on olemassa, tulee näytteitä ottaa tuotteiden kanssa kosketuksiin joutuville pinnoille. Tällaisia pintoja ovat esimerkiksi tuotantolinjasto, prosessointilaitteisto sekä -välineet. Näytteitä tulee ottaa säännöllisesti sekä yrityksen omavalvontasuunnitelman mukaisesti.

4.3.2 Kotitaloudet

Ruokavirasto (2022c) on antanut ohjeistuksia kotitalouksille, miten elintarvikkeista saatavaa tartuntariskiä voidaan pienentää. Tärkeintä on noudattaa hyvää hygieniaa tuotteita käsiteltäessä. Koska *L. monocytogenes* tuhoutuu lämpökäsittelyssä, on tuotteiden riittävä kuumentaminen tehokas keino vähentää tartuntoja. Kuten aikaisemmin mainittiin, pastörintilämpötila (+72 °C) on riittävä bakteerin tuhoamiseksi. Yleisiä suosituksia ovatkin siten lihan ja kalan huolellinen kypsentyminen. Lisäksi raa'at lihat tulisi pitää erillään jo kypsennetyistä elintarvikkeista. Myös tuoreet vihannekset tulisi pestä ennen syömistä ja raa'at vihannekset sekä ennen kuorimista että sen jälkeen. Työvälineiden sekä käsien hyvästä puhdistuksesta tulisi huolehtia riittävällä tasolla. Ruokavirasto myös ohjeistaa, että kun tuote on avattu, se kannattaa käyttää mahdollisimman nopeasti. Kuitenkin viimeistään ennen pakkauksessa ilmoitettua viimeistä käyttöpäivää. Lisäksi on tärkeää säilyttää elintarvikkeet valmistajan määrittämän säilytysohjeen mukaisesti. Tämä tarkoittaa yleensä maksimissaan + 6 °C, mutta kalatuotteiden kohdalla säilytyslämpötilan tulisi olla enimmillään + 3 °C.

Riskiryhmiin kuuluville on edellä mainittujen lisäksi tiukempia ohjeistuksia. Ruokavirasto (2022c) kertoo, että tärkeää olisi välttää pastöroimatonta maitoa ja siitä valmistettuja tuotteita, lihahyytelöä sekä kylmänä tarjottavia pehmeitä juustoja. Pakastevihanneksia ei tulisi nauttia ilman huolellista kuumennusta. Ruokaviraston sivuilla ruoka suositellaan kuumennettavan kiehuvan kuumaksi. Esimerkiksi valmisruokien lämmitys mikrossa ei siis välttämättä riitä tuhoamaan elintarvikkeessa olevaa *L. monocytogenes* -bakteeria.

Lihojen ja kasvien käsittely olisi hyvä tehdä erillisiä leikkuulautoja ja työvälineitä käyttäen jälkikontaminaation välttämiseksi. Vaihtoehtoisesti välineiden huolellinen puhdistus tulisi tehdä siirryttäessä tuotteen käsittelystä toiseen. Tätä tulisi erityisesti noudattaa myös käsitellessä sekä raakoja, että jo kypsennettyjä elintarvikkeita vuorotellen samoilla työvälineillä ja -laitteilla. Mikäli samoilla työvälineillä käsitellään molempia, kypsien elintarvikkeiden käsittely olisi hyvä tehdä ennen raakoja, jotta välttyttäisiin mahdolliselta jälkikontaminaatiolta.

5 MENETELMÄKUVAUS

Käytännön työssä on erityisen tärkeää kiinnittää huomiota hygieenisiin työskentelytapoihin, jotta voidaan välttää mahdolliset ristikontaminaatiot. Työ suoritetaan siis laminaarivirtauskaapissa (kuva 1) steriloituja välineitä käyttäen. Kaikki käytettävät työvälineet steriloidaan autoklaavissa. Työvälineiden tai elatus- ja apuaineiden kontaminoitumisella tai epäonnistuneella autoklavoinnilla saattaisi olla merkittäviä vaikutuksia lopputuloksiin.



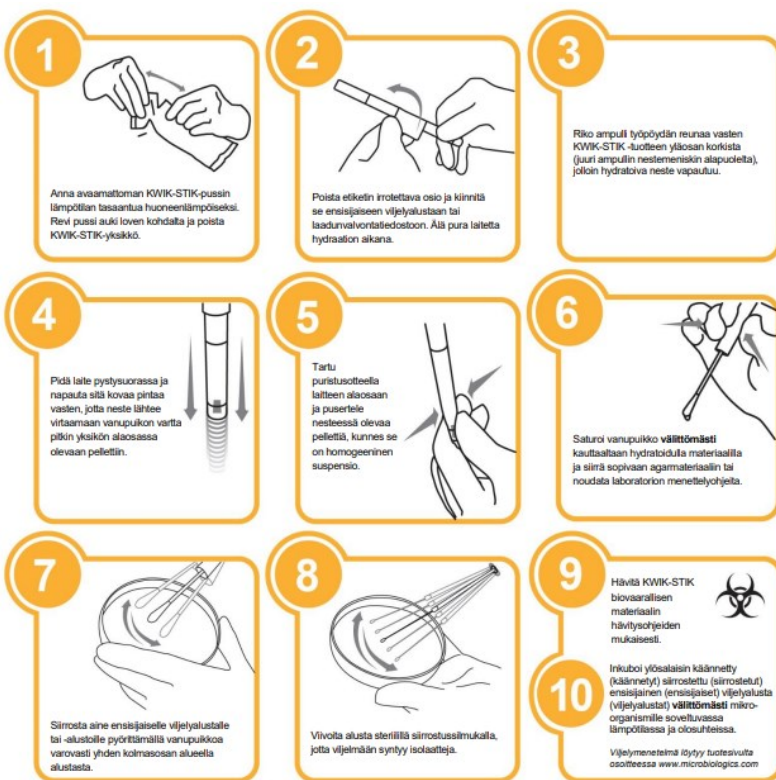
Kuva 1. Seinäjoen ammattikorkeakoulun laminaarivirtauskaappi (Tiina Laitila, i.a.).

Turvallisuuden vuoksi työssä käytetään *L. monocytogenes* -bakteerin sijasta *Listeria* tautia aiheuttamatonta kantaa, *L. innocua*. Ne ovat ominaisuuksiltaan samankaltaisia, joten saatuja tuloksia voidaan kuitenkin soveltaa myös *L. monocytogenes* kohdalla.

Työtä varten on valmistettava tarvittava määrä agarmaljoja bakteerien kasvatusta varten. Agarina käytetään selektiivistä kasvualustaa Harlequin® *Listeria* Chromogenic Agar. Laimennosaineena työssä käytetään MRD:tä eli Maximum Recovery Diluent -liuosta, jota tarvitaan laimennossarjojen tekemiseen. Myös nämä on steriloitava autoklaavissa ennen käyttöä.

Ennen kuin *L. innocua* voidaan siirrostaa tutkittaviin näytteisiin, täytyy kylmäkuivatut mikro-organismit käsitellä. KWIK-STIK-yksikkö sisältää mikro-organismien lisäksi hydratoivan

nesteen sekä vanupuikon siirrostusta varten. Microbiologicsin (i.a.) laatimista ohjeista selviää, että yksikön käsittely aloitetaan pitämällä sitä hetki huoneenlämmössä ennen aloitusta. Tämän jälkeen siinä oleva ampulli rikotaan hydratoivan nesteen vapauttamiseksi. Kun neste on valunut yksikön alaosaan olevaan pellettiin, saadaan sitä puristelemalla aikaiseksi homogeeninen suspensio. Vanupuikon avulla ainetta siirrostetaan viljelyalustalle sivelemällä sitä noin kolmasosalle viljelyalustan pinta-alasta. Tässä työssä viljelyalustana käytetään Tryptone Soy Agar (TSA). Lopuksi alusta viivoitetaan steriiliä siirrostussilmukkaa käyttäen. Nyt siirrostettu malja on valmis inkuboitavaksi + 30 °C:ssa. Kuviossa 2 on kuvattuna KWIK-STIK'n käsittely yksityiskohtaisesti.



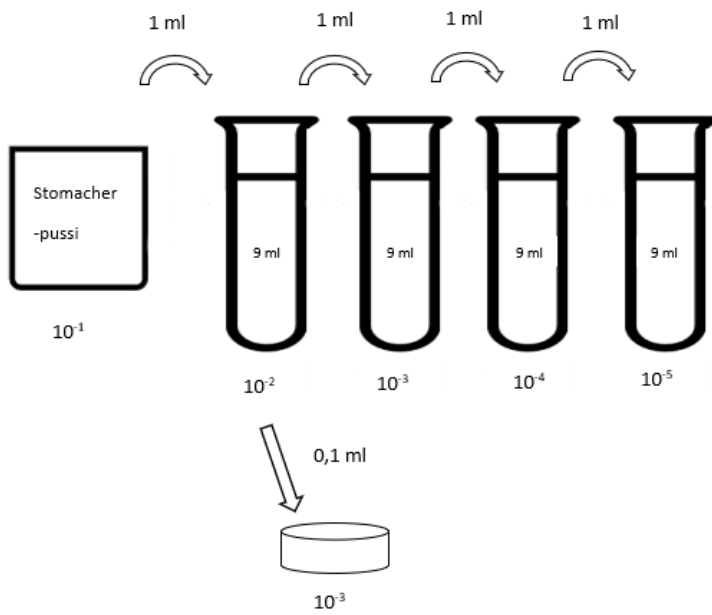
Kuvio 2. KWIK-STIK-yksikön käsittelyohje (Microbiologics, i.a.).

Kahden vuorokauden inkuboinnin jälkeen mikrobit siirrostetaan uudelleen TSA:han, minkä jälkeen niitä inkuboidaan +37 °C:ssa. 24 tunnin kuluttua mikrobit siirrostetaan Tryptone Soy Broth -liuokseen (TSB), jossa mikrobeja kasvatetaan viisi vuorokautta noin +5–6 °C lämpötilassa. Tämän vaiheen tarkoituksena on kannan mukauttaminen tuleviin säilytyslämpötiloihin, ja siksi se tehdään huomattavasti alhaisemmassa lämpötilassa aikaisempiin vaiheisiin verrattuna. Viiden vuorokauden jälkeen TSB-liuoksen mikrobipitoisuus lasketaan Bürkerin laskukammioilla. Kun pitoisuus on selvillä, voidaan tehdä tarvittavat laimennokset haluttujen pitoisuuksien

saamiseksi näytteiden siirrostusta varten. Tavoitteena on, että siirrostetta lisätään näytteisiin kahtena eri pitoisuutena: 10^1 pmy/pakkaus ja 10^4 pmy/pakkaus.

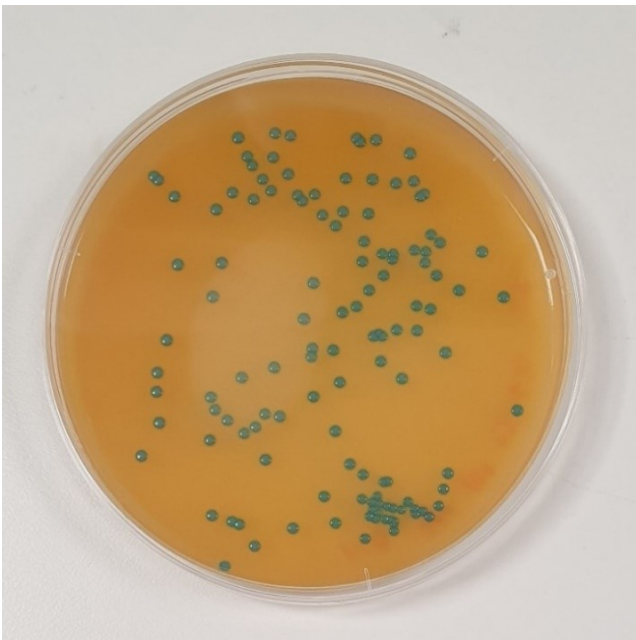
Näytteiden siirrostus tehdään ruiskulla ja neulalla, jotta siirrostetta saadaan näytteen sisälle. Siirrostettava määrä määräytyy näytteen painon mukaan, ja sen tulee olla maksimissaan 1 % painosta. Jokainen näyte tulee siis punnita yksitellen. Näytteiden painoa tarvitaan myöhemmin myös laimennossarjojen tekovaiheessa. Siirrostuksen jälkeen näytteitä säilytetään 1, 3 ja 6 vuorokautta jääkaapeissa kahdessa eri lämpötilassa. Tavoitellut lämpötilat ovat $+2-3$ °C sekä $+5-6$ °C. Jokaisesta näytteestä tehdään kolme rinnakkaisnäytettä sekä nollanäyte, jolloin analysoitavia näytteitä saadaan yhteensä 42. Nollanäytteet toimivat työssä referenssinä, eikä niihin ympätä *L. innocua*. Näissä näytteissä ei siis kuuluisi kasvaa bakteeria. Puhdas malja on osoitus hygieenisistä toimintatavoista sekä puhtaiden työvälineiden käytöstä. Nollanäytteet käsitellään työssä samoilla menetelmillä kuin siirrostetut, *L. innocua* sisältävät näytteet.

Pesäkkeiden laskemista varten näytteistä tulee tehdä laimennossarjat kuvion 3 periaatteen mukaisesti. Näytteitä ei tarvitse aina laimentaa samaan pitoisuuteen asti, vaan tässä voidaan menetellä näytteen vaatimalla tavalla tehden joko vähemmän tai enemmän laimennoksia. Ensimmäinen laimennos 10^{-1} tehdään Stomacher-pussiin, jossa näyte myös homogenoidaan homogenisaattorilla. Seuraavat laimennokset tehdään steriloituihin koeputkiin. Kaikissa laimennoksissa käytetään MRD:tä laimennosaineena. Kun laimennokset on tehty haluttuun pitoisuuteen asti, jokaista laimennosta siirrostetaan selektiiviselle elatusalustalle 0,1 ml automaattipipetillä. Jokainen laimennos viljellään maljalle kahtena kappaleena pintalevitysmenetelmällä. Menetelmässä maljalle pipetoitu näyte levitetään kulmasauvan avulla tasaisesti koko elatusalustalle, jolloin bakteerit saadaan kasvamaan maljan pinnalla (Sojakka & Välimäki, 2020, s. 68).



Kuvio 3. Laimennossarjan valmistusperiaate (Niina Kauppila, 2023.).

Kun siirrostettuja maljoja on inkuboitu 48 tuntia +37 °C lämpötilassa, voidaan kasvaneet pesäkkeet laskea pesäkelaskurilla. *L. innocuan* muodostamat pesäkkeet näkyvät maljalla sinivihreinä (kuva 2).



Kuva 2. *L. innocuan* muodostamia pesäkkeitä agarmaljalla (Niina Kauppila, 2023).

Kun kaikilta saman näytteen maljoilta on laskettu pesäkkeet, saadaan selville pesäkkeiden määrä grammaa kohden. Tulosten ilmoituksessa käytetään yksikköä pmy/g. Näytteen mikrobipitoisuus y voidaan laskea kaavalla (Sojakk & Välimäki, 2020, s. 143.)

$$y = \frac{c}{V} \quad (1)$$

missä

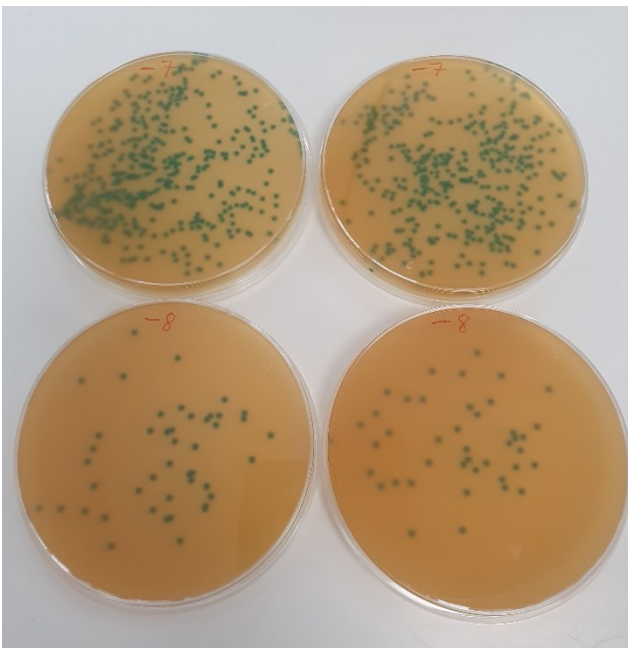
c on pesäkkeiden kappalemäärä (count)

V on tilavuus (volume).

6 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Tutkittavana näytteenä tässä työssä käytettiin herneproteiinista valmistettuja kasvismakkaroituja, joista on kerrottu enemmän luvussa 2. Makkaroita oli säilytetty syväjäätssä noin -40°C :ssa, minkä vuoksi näytteet oli sulatettava ennen työn aloitusta.

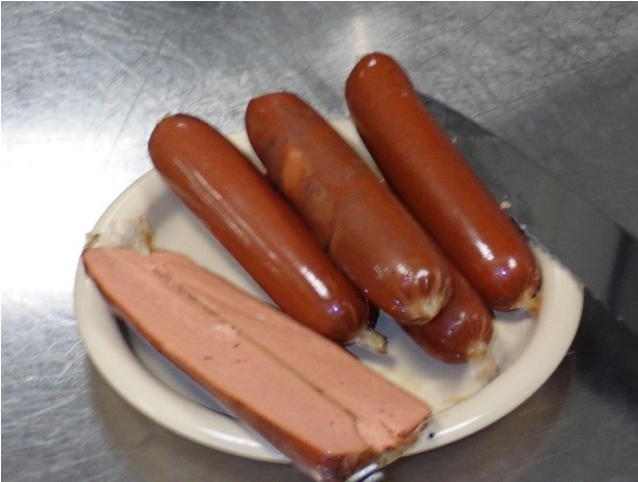
Ennalta suunnitellut siirrosteden pitoisuudet muuttuivat työn edetessä, sillä laskukammion avulla laskettaessa pesäkkeiden määräksi saatiin todellisuutta alhaisempi tulos. *L. innocualla* siirrostettua TSB:tä siirrostettiin näytteiden lisäksi myös elatusalustalla valetuille petrimaljoille. Maljoilta pystyttiin myöhemmin varmistamaan siirrosteen pitoisuus kahden vuorokauden (noin 48 tuntia) inkuboinnin jälkeen. Tämä tehtiin laskemalla maljoilla olevat pesäkkeet (kuva 3), minkä jälkeen niiden yhteissumma jaettiin käytettyjen laimennosten summalla kaavan (1) periaatteen mukaisesti. Tämä osoitti lopullisiksi siirrosteiden pitoisuuksiksi 10^4 pmy ja 10^7 pmy.



Kuva 3. *L. innocualla* siirrostettua TSB:tä siirrostettuna agarmaljalle bakteeripitoisuuden laskemista varten. Maljoja on inkuboitu kaksi vuorokautta (Niina Kauppila, 2023).

Makkaranäytteen tiiviin rakenteen vuoksi siirrostetta ei saatu kokonaisuudessaan pysymään näytteen sisällä. Koska rakenne oli tiivis, osa siirrosteesta tuli näytteestä ulos ruiskua poistettaessa makkaran sisältä. Makkaran leikkauspinnasta (kuva 4) nähdään rakenteen tiivisyys. Jotta siirrosteen sai pakkauksen sisälle näytteen kanssa, siirrostus tehtiin makkaranäytteen ollessa jo pakkauspussin sisällä. Tässä vaiheessa oli tärkeää varoa osumasta neulalla pussiin rikkoutumisen välttämiseksi. Kaikkiin näytteisiin ympättiin 1 % siirrostetta makkaroitten

painosta. Näytteiden tarkat painot ovat nähtävissä liitteessä 1. Siirrostuksen jälkeen näytepakkaukset vakumoititiin.



Kuva 4. Herneproteiinista valmistettuja makkaroita (Gun Wirtanen, i.a.).

Vakuumpussiin pakattuja näytteitä säilytettiin kahdessa jääkaapissa eri lämpötiloissa 1, 3 ja 6 vuorokautta. Lämpötilojen mahdollisia muutoksia seurattiin dataloggereilla eli tiedonkeruulaitteilla, jotka laitettiin jääkaappeihin näytteiden välittömään läheisyyteen, kuitenkin vakuumpakkausten ulkopuolelle. Molemmat näytteet (alemman sekä korkeamman lämpötilan näytteet) sijoitettiin jääkaappien alatasoille. Lämpötilat tarkastettiin kun kuusi päivää oli kulunut, ja viimeisiäkin näytteitä oli säilytetty vaaditun ajan. Lämpötilat mitattiin toisesta säilytyspäivästä lähtien, sillä dataloggereita ei ollut käytettävissä heti ensimmäisenä päivänä. Alempi säilytyslämpötila oli vaihdellut välillä $+3,0-4,5$ °C ja korkeampi välillä $+5,5-7,5$ °C.

Näytteiden homogointi oli tarkoitettu tehtävän Stomacher -pussissa, mutta testausvaiheessa yhden pussin rikkoutuessa päädyttiin homogointi tekemään vakuumpussissa, johon näyte oli pakattuna. Varotoimenpiteenä vakuumpussi laitettiin lisäksi Stomacher-pussiin, mikäli se sattuisi rikkoutumaan. Näin ei varsinaisen työn aikana kuitenkaan onneksi tapahtunut.

Laimennokset näytteistä tehtiin siten, että nollanäytteistä tehtiin vain laimennos 10^{-1} , sillä maljalla ei kuuluisi kasvaa pesäkkeitä, ja siten suurempien laimennosten katsottiin olevan turhia. Näytteistä, joihin oli ympätty *L. innocua* pitoisuutena 10^4 pmy/pakkaus, laimennokset tehtiin 10^{-2} asti. Koska näytteissä, joihin oli ympätty 10^7 pmy/pakkaus, oli odotettavissa pesäkkeiden suurempaa kasvua, laimennokset tehtiin 10^{-5} asti. Tämän avulla pyrittiin siihen, että maljoille saataisiin laskettavia pesäkemääriä. Suunnitelman mukaan oli myös tarkoitus

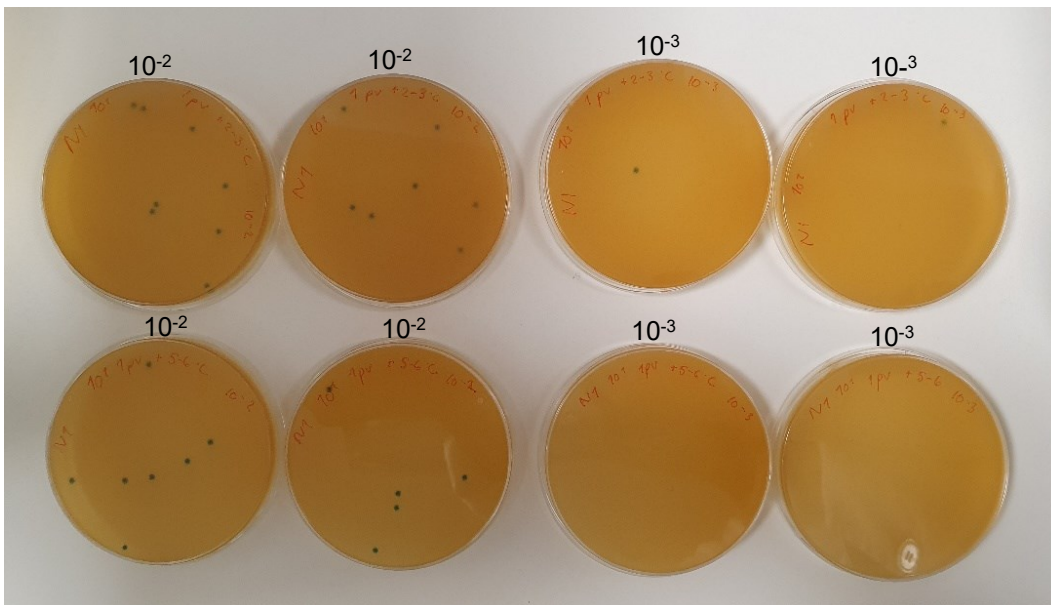
tehdä jokaisesta laimennoksesta kaksi maljaa, mutta tästä poikettiin työn edetessä. Mikäli oli odotettavissa, että maljoilla olevia pesäkkeitä ei pystyisi laskemaan suuren pesäkemäärän vuoksi, niistä laimennoksista tehtiin vain yksi malja. Pääosin maljoja kuitenkin viljeltiin jokaisesta laimennoksesta kaksi kappaletta.

Siirrostettuja agarmaljoja oli haastavaa inkuboida aina tasan 48 tuntia, joten tässä oli näytteiden kesken pientä eroavaisuutta. Ensimmäisen päivän näytteitä inkuboitiin noin 45 tuntia, kolmannen päivän näytteitä noin 44 tuntia ja kuusi päivää säilytettyjä näytteitä noin 46 tuntia. Eri päivien näytteiden keskinäiset erot inkubointiajoissa jäivät kuitenkin siis hyvin pieniksi, vaikka olivatkin alle tavoitellun 48 tunnin.

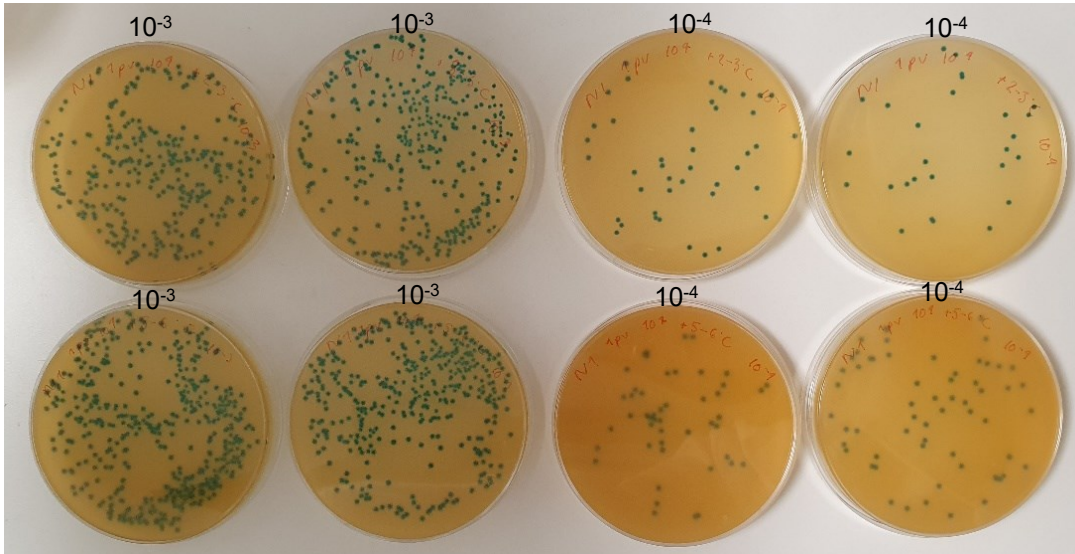
7 TULOKSET

Molempien säilytyslämpötilojen näytteissä oli kasvua jo yhden päivän säilytyksen jälkeen. Lämpötilan ollessa korkeampi kasvu oli kuitenkin pääosin suurempaa verrattuna alhaisemman lämpötilan näytteisiin. Kaikki nollanäytteet olivat negatiivisia.

Eri säilytyslämpötilojen välillä ensimmäisen päivän jälkeen näytteissä ei ollut havaittavissa merkittävää eroa kummassakaan siirrostessa. Kuvassa 5 on siirrosteen 10^4 näytteitä ja kuvassa 6 siirrosteen 10^7 näytteitä. Kuvat on otettu sen jälkeen, kun maljoja oltiin inkuboitu kaksi vuorokautta $+37\text{ °C}$:ssa.

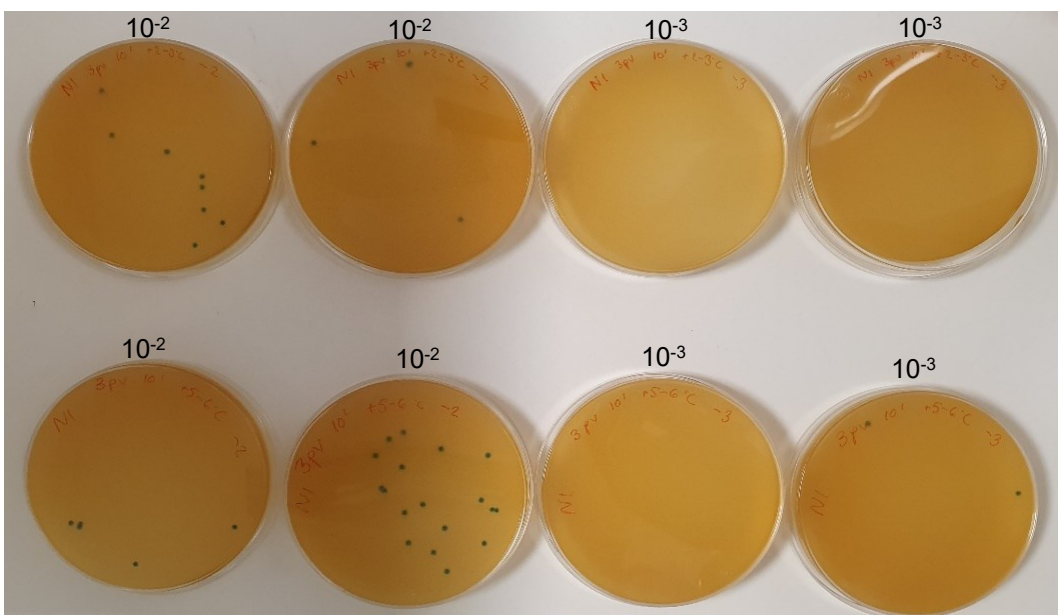


Kuva 5. "Päivä 1" -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille. Maljoja on inkuboitu $+37\text{ °C}$:ssa kaksi vuorokautta siirrostuksen jälkeen. Siirrosteen bakteeripitoisuus näytteessä on 10^4 . Ylärivillä on lämpötilan $+3,0\text{--}4,5\text{ °C}$ näytteet. Alarivillä on lämpötilan $+5,5\text{--}7,5\text{ °C}$ näytteet. Vasemmalta oikealle katsottuna maljoilla on laimennokset 10^{-2} , 10^{-2} , 10^{-3} ja 10^{-3} (Niina Kauppila, 2023).



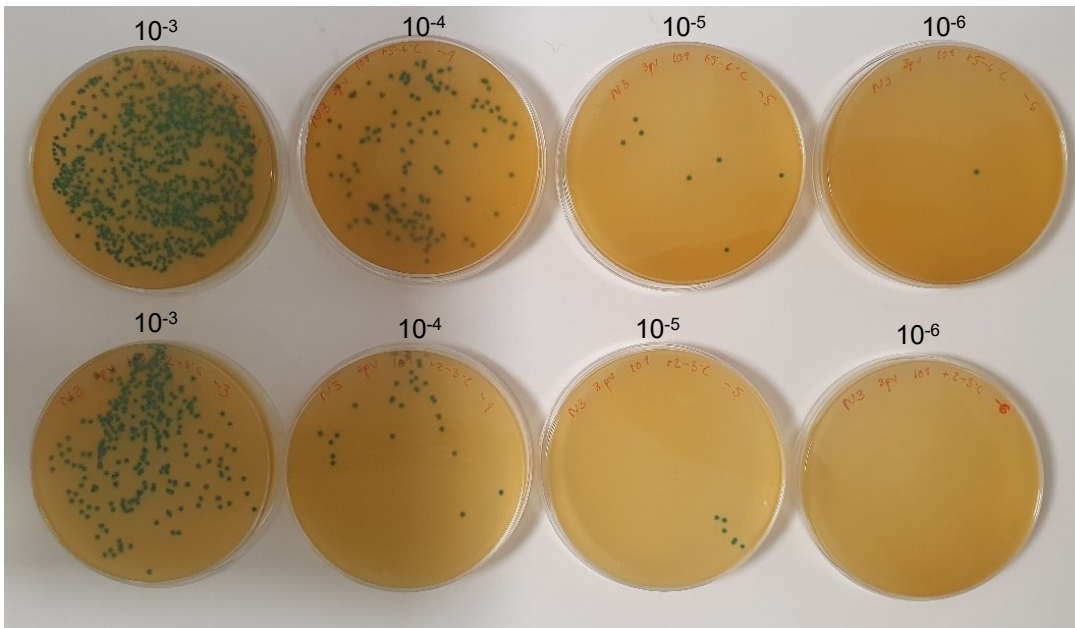
Kuva 6. "Päivä 1" -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille. Maljoja on inkuboitu +37 °C:ssa kaksi vuorokautta siirrostuksen jälkeen. Siirrosten bakteeripitoisuus näytteessä on 10^7 . Ylärivillä on lämpötilan +3,0–4,5 °C näytteet. Alarivillä on lämpötilan +5,5–7,5 °C näytteet. Vasemmalta oikealle katsottuna maljoilla on laimennokset 10^{-3} , 10^{-3} , 10^{-4} ja 10^{-4} (Niina Kauppila, 2023).

Kolmannen päivän näytteissä erot olivat osittain jo selkeämmät. 10^4 siirrosteessa kasvu on edelleen melko samaa molemmissa lämpötiloissa (kuva 7), kun taas siirrosteessa 10^7 ero bakteerikasvussa lämpötilojen välillä on jo nähtävissä (kuva 8). Korkeampi bakteeripitoisuus, korkeampi lämpötila sekä kolmen päivän säilytysaika on selkeästi lisännyt bakteerikasvua. Kuvat on otettu sen jälkeen, kun maljoja oltiin inkuboitu kaksi vuorokautta +37 °C:ssa.



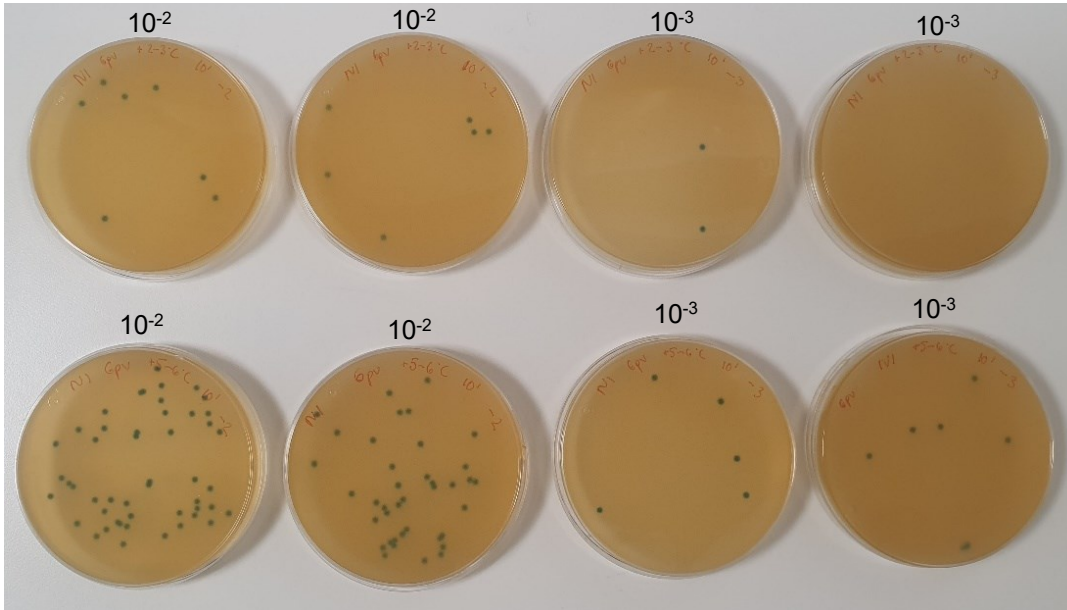
Kuva 7. "Päivä 3" -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille. Maljoja on inkuboitu +37 °C:ssa kaksi vuorokautta siirrostuksen jälkeen. Siirrosten bakteeripitoisuus näytteessä on 10^4 . Ylärivillä on lämpötilan +3,0–4,5 °C näytteet. Alarivillä on lämpötilan +5,5–7,5 °C

näytteet. Vasemmalta oikealle katsottuna maljoilla on laimennokset 10^{-2} , 10^{-2} , 10^{-3} ja 10^{-3} (Niina Kauppila, 2023).

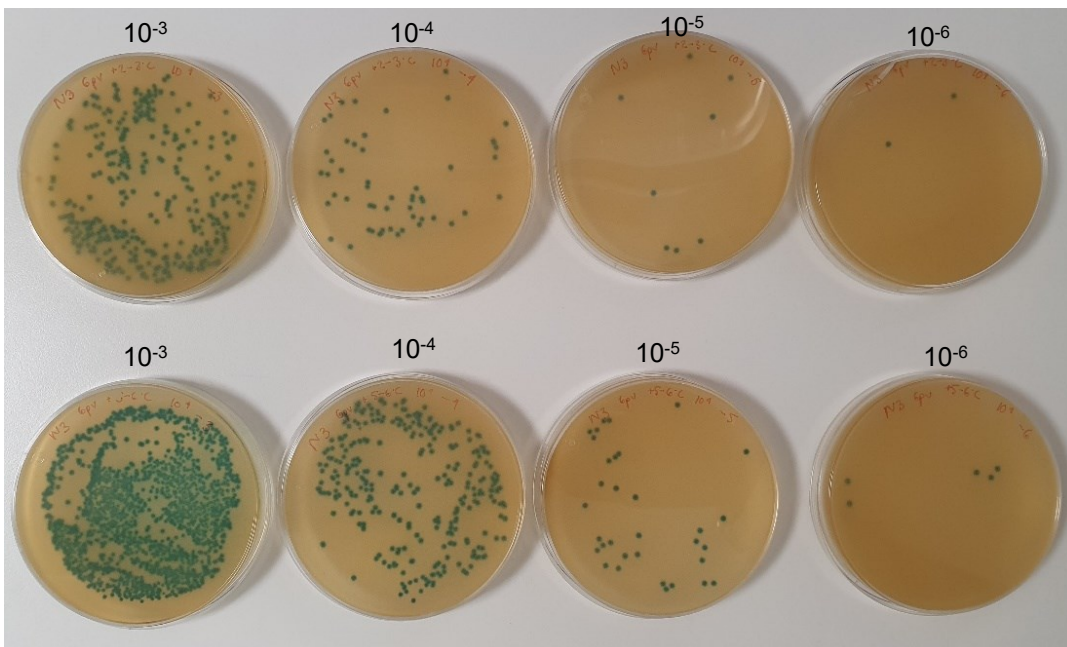


Kuva 8. "Päivä 3" -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille. Maljoja on inkuboitu $+37$ °C:ssa kaksi vuorokautta siirrostuksen jälkeen. Siirrosten bakteeripitoisuus näytteessä on 10^7 . Ylärivillä on lämpötilan $+5,5-7,5$ °C näytteet. Alarivillä on lämpötilan $+3,0-4,5$ °C näytteet. Vasemmalta oikealle katsottuna maljoilla on laimennokset 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ja 10^{-6} (Niina Kauppila, 2023).

Kuusi päivää säilytetyissä näytteissä ero oli kaikkein selkein lämpötilojen välillä. 10^4 siirrosteessa ero on jo hyvin havaittavissa (kuva 9), mutta siirrosteessa 10^7 ero bakteerikasvussa on vieläkin selkeämpi (kuva 10). Kuvat on otettu sen jälkeen, kun maljoja oltiin inkuboitu kaksi vuorokautta $+37$ °C:ssa.



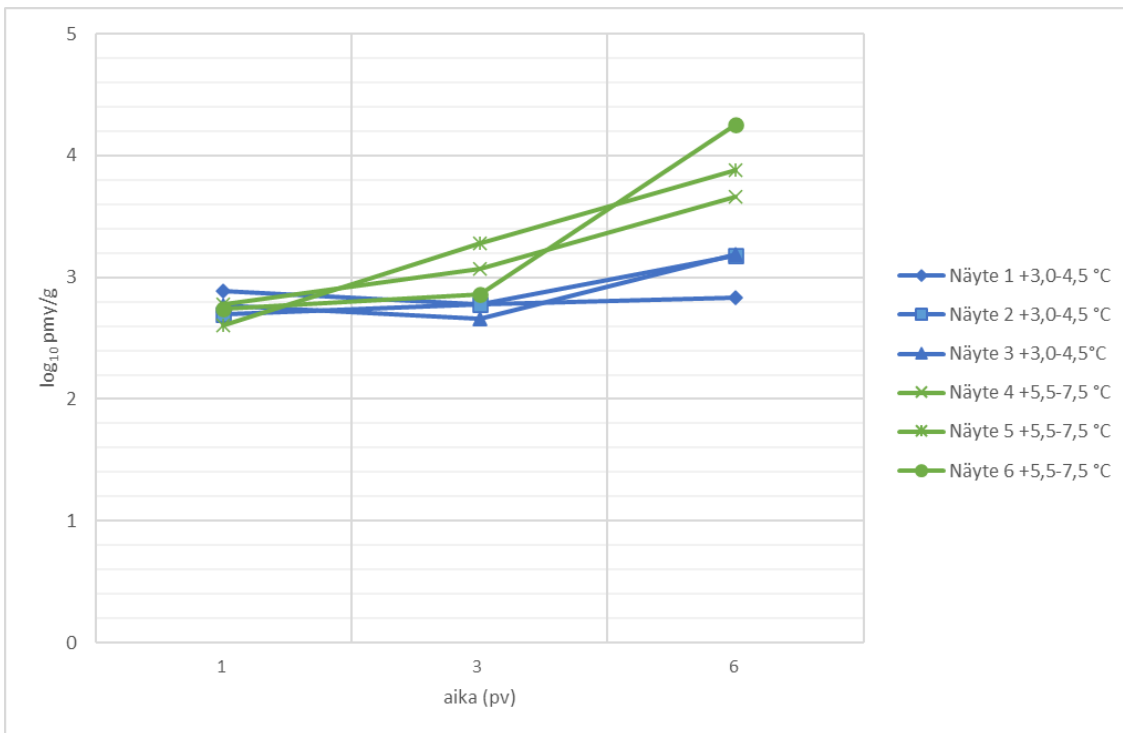
Kuva 9. "Päivä 6" -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille. Maljoja on inkuboitu +37 °C:ssa kaksi vuorokautta siirrostuksen jälkeen. Siirrosten bakteeripitoisuus näytteessä on 10^4 . Ylärivillä on lämpötilan +3,0–4,5 °C näytteet. Alarivillä on lämpötilan +5,5–7,5 °C näytteet. Vasemmalta oikealle katsottuna maljoilla on laimennokset 10^{-2} , 10^{-2} , 10^{-3} ja 10^{-3} (Niina Kauppila, 2023).



Kuva 10. "Päivä 6" -näytteen laimennoksia siirrostettuna maljoille. Maljoja on inkuboitu +37 °C:ssa kaksi vuorokautta siirrostuksen jälkeen. Siirrosten bakteeripitoisuus näytteessä on 10^7 . Ylärivillä on lämpötilan +3,0–4,5 °C näytteet. Alarivillä on lämpötilan +5,5–7,5 °C näytteet. Vasemmalta oikealle katsottuna maljoilla on laimennokset 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ja 10^{-6} (Niina Kauppila, 2023).

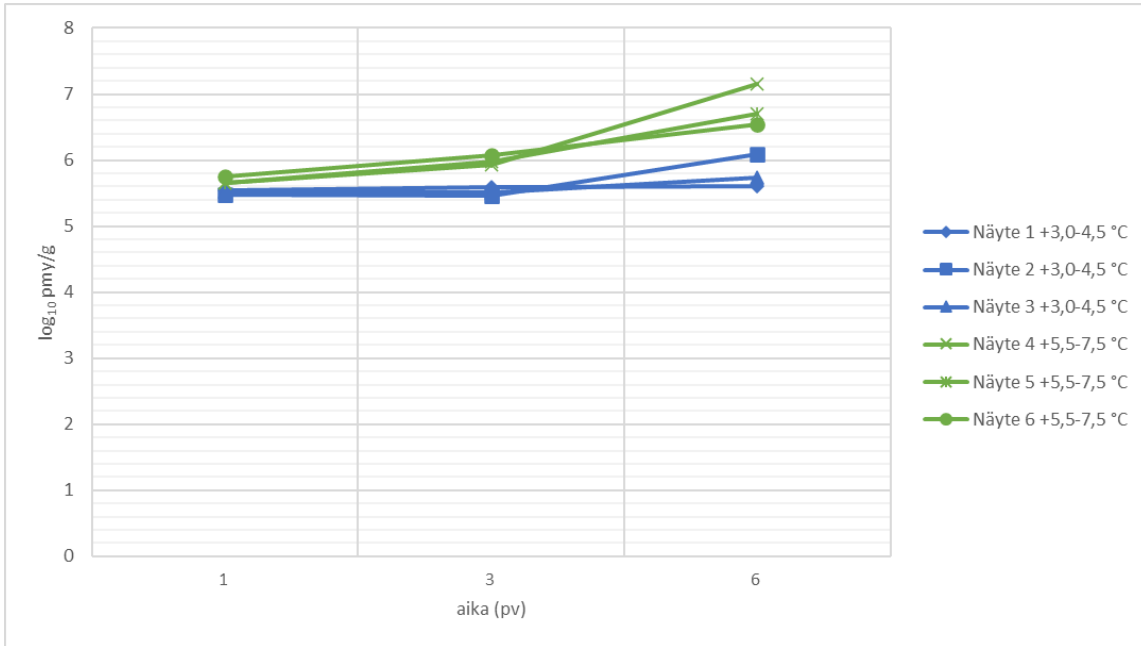
Kuten kuvista 12 ja 13 nähdään, korkeammassa lämpötilassa säilytetyissä näytteissä suurempi pesäkemäärä on helposti havaittavissa jo silmämääräisesti ilman pesäkkeiden laskua pesäkelaskurilla, kun aikaa on kulunut useampi päivä.

Saadut tulokset ovat lisäksi kuvattuna kuvioissa 4 ja 5. Kuvioista nähdään pesäkkeiden kasvun kehitys 1 ja 6 päivien välillä, kun tulokset ovat ilmoitettuna \log_{10} pmy/g ajan funktiona. Kuvioissa saman lämpötilan rinnakkaisnäytteet on merkitty samalla värillä: sinisellä värillä on merkitty lämpötilan +3,0–4,5 °C näytteet ja vihreällä värillä lämpötilan +5,5–7,5 °C näytteet. Tarkat pesäkeluvut jokaisesta näytteestä on nähtävissä liitteessä 2. Kuviossa 4 on kuvattuna siirrosteen 10^4 näytteiden tulokset molemmissa säilytyslämpötiloissa.



Kuvio 4. Bakteerikasvun kehitys päivien 1 ja 6 välillä, kun näytteisiin on siirrostettu *L. innocua* pitoisuutena 10^4 pmy/pakkaus.

Kuviossa 5 on kuvattuna siirrosteen 10^7 näytteiden tulokset, bakteerikasvun kehitys sekä erot vertailulämpötilojen välillä tutkintajakson aikana.



Kuvio 5. Bakteerikasvun kehitys päivien 1 ja 6 välillä, kun näytteisiin on siirrostettu *L. innocua* pitoisuutena 10^7 pmy/pakkaus.

8 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tuloksia tarkastelemalla voidaan todeta *Listeria monocytogenes* kasvavan tutkitussa kasviproteiinivalmisteessa. Korkeammassa lämpötilassa (+5,5–7,5 °C) olleissa näytteissä bakteerikasvu oli suurempaa kuin alhaisemmassa lämpötilassa (+3,0–4,5 °C) säilytetyissä näytteissä, vaikka säilytyslämpötilojen välinen ero ei ollutkaan kovin suuri. Ensimmäisen ja kolmannen päivän näytteissä bakteerikasvu oli pienempää kuusi päivää säilytettyihin näytteisiin verrattuna. Pienikin muutos lämpötilassa ja säilytysajan pituudessa voi siis lisätä tai vähentää bakteerikasvua elintarvikkeessa. Lisäksi tuloksista nähdään, että *L. monocytogenes* kasvaa myös matalissa lämpötiloissa, vaikka lämpötilan alentaminen hidastaakin kasvua. Negatiiviset nollanäytteet kertovat hygieenisten toimintatapojen sekä välineiden käytöstä.

Korkeampaa säilytyslämpötilaa ja sen vaihtelua tutkintajakson aikana (+5,5-7,5 °C) voisi verrata esimerkiksi tilanteeseen, jossa elintarviketta on säilytetty suositellun maksimisäilytyslämpötilan (+6 °C) tuntumassa, mutta kuitenkin sen alapuolella. Tämän vuoksi lyhyen huoneenlämmössä säilytyksen jälkeen tuotteen lämpötila voi päästä kohoamaan hieman maksimisäilytyslämpötilaa korkeammaksi ennen takaisin jääkaappiin laittoa. Elintarvike voidaan ottaa pöydälle esimerkiksi ennen ruoanlaittoa tai se voidaan vastaavasti ruoanvalmistuksen jälkeen unohtaa huoneenlämpöön ennen laittoa takaisin kylmäsäilytykseen. Tällöin on mahdollista, että elintarvikkeen lämpötila pääsee kohoamaan hetkeksi yli +6 °C:een. Mikäli lämpötila pääsee nousemaan liian korkeaksi ja kylmäketju katkeaa, on se elintarvike turvallisuu den kannalta aina riski. Tällöin myös tuotteesta saatava ruokamyrkytysriski kasvaa. Lisäksi on mahdollista, että kylmälaitteen lämpötila on säädetty liian korkeaksi, jolloin ohjeen mukainen säilytyslämpötila ei toteudu. Saatuja tuloksia voidaan siis hyödyntää lisäämään kuluttajien tietämystä oikeanlaisista säilytysolosuhteista.

Vaikka nämä tulokset antavatkin hyvää tietoa *L. monocytogenes* kasvusta tutkitussa näytteessä, tuloksissa tulee kuitenkin huomioida mahdollinen virhe pesäkkeiden laskussa. Joissakin maljoissa näytteen levitys kulmasauvalla ei ollut onnistunut hyvin, joten pesäkkeet saattoivat olla lähellä toisiaan tai maljan reunaa. Tämä vaikeutti pesäkkeiden erottamista toisistaan, mikä voi vääristää lopputulosta. Mahdollisista virhelaskuista huolimatta voidaan kuitenkin todeta, että bakteeri kasvaa kasviproteiinivalmisteessa, erityisesti herneproteiinivalmisteessa, jo matalissakin lämpötiloissa. Ei voida siis varmasti sanoa millaisia muutoksia tuloksissa tapahtuisi kasviproteiinin lähdeettä vaihtamalla toiseen. Tuloksissa saattaisi olla eroavaisuuksia vaihtamalla näyte esimerkiksi soijasta valmistettuun vastaavaan tuotteeseen. Saadut

tulokset kuitenkin osoittavat, että kasviproteiinituotteiden kohdallakaan ei *L. monocytogenes*-sen aiheuttamaa ruokamyrkytysriskiä saa unohtaa.

Sen lisäksi, että elintarvikealan toimijoilla on suuri vastuu huolehtia tuottamiensa ja tarjoilemiensa elintarvikkeiden laadusta ja turvallisuudesta, myös kotitaloudet voivat riittäviä ja oikeanlaisia hygieenisiä käytäntöjä noudattamalla vähentää elintarvikkeista saatavia tartuntata-pauksia. Erityisesti riskiryhmiin kuuluvien henkilöiden tulee olla tarkkoja ja mahdollisuuksien mukaan välttää niiden tuotteiden nauttimista, joissa listeriariski on korkeampi.

Vaikka kasviproteiineista valmistetut makkarat suositellaankin kypsennettävän ennen syömistä nautittavien ominaisuuksien parantamiseksi, voidaan ne myös nauttia suoraan pak-kauksesta. Tämä lisää tuotteesta saatavaa tartuntariskiä, kun elintarviketta ei tarvitse kyp-sentää ennen syömistä. Tulosten perusteella *L. monocytogenes* kasvaa kasviproteiiniivalmis-teessa, joten myös kasvipohjaisten elintarvikkeiden oikeanlaisesta säilytyksestä tulisi huoleh-tia lämpötilan sekä säilytysajan suhteen. Tärkeä huomio tuoteturvallisuuden kannalta on myös se, että pienikin muutos lämpötilassa tai säilytysajan pidentämisessä voi huonontaa elintarvikkeen mikrobiologista laatua jo lyhyessä ajassa lisäten ruokamyrkytystapauksia. Tä-män vuoksi elintarvikkeelle määritettyä viimeistä käyttöpäivää ei tulisi ylittää. Puutteellisilla säilytysolosuhteilla on lisäksi vaikutuksia syntyvään ruokahävikkiin ja sitä myötä sillä on myös taloudellisia vaikutuksia.

Erilaisten kasviproteiinien lisäksi olisi mielenkiintoista myös tutkia, miten avattu pakkaus vai-kuttaisi bakteerikasvuun. Koska *L. monocytogenes* on kykenevä kasvamaan sekä hapelli-sissa että hapettomissa olosuhteissa, tällä voisi selvittää, millaisia vaikutuksia vakuumpak-kauksen avaamisella olisi tuotteen mikrobiologiseen laatuun. Ruokamyrkytysbakteereihin liit-tyvät tutkimukset ovat tärkeä osa tuotekehitystä määritettäessä uudelle elintarvikkeelle oi-keita säilytysolosuhteita ja säilymisaikaa.

Haastavuutta työhön toi laboratorio-osuuden laajuus sekä työn tekijän verrattain vähäinen ko-kemus vastaavasta työskentelystä. Työn pääasiallisen tavoitteen lisäksi opinnäytetyön teki-jällä oli työssä oma henkilökohtainen tavoite kehittyä laboratoriotyöskentelyssä. Vaikka käy-tännönsuuden kesto olikin melko lyhyt, jotta voisi sanoa oppineensa riittävästi, työn laajuus mahdollisti hyvän oppimisen työvaiheiden toistojen kautta. Tämän myötä tämänkin tavoitteen voi todeta onnistuneen hyvin.

LÄHTEET

- Allergia-, iho- ja astmaliitto ry. (i.a.). *Palkokasvit*. <https://www.allergia.fi/allergia/ruoka-ja-juoma/allergiaa-aiheuttavia-ruoka-aineita/palkokasvit/>
- Ashenafi, M. (1991). *Growth of Listeria monocytogenes in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by Lactobacillus plantarum*. Science Direct. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(05\)80004-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(05)80004-8)
- Duodecim Terveyskirjasto. (30.12.2021). *Listerioosi*. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00581>
- EQVEGAN. (i.a.). *About EQVEGAN*. <https://eqvegan.eu/about/>
- Komission asetus (EY) N:o 2073/2005 elintarvikkeiden mikrobiologisista vaatimuksista. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=fi>
- Korkeala, H. (toim.). (2007). *Elintarvikehygienia: Ympäristöhygienia, elintarvike- ja ympäristötoksikologia*. WSOY Oppimateriaalit.
- Lehto, J. (2018). *Lihasta luovutaan pikkuhiljaa – myös muualla kuin pääkaupunkiseudulla?* Tilastokeskus. <https://www.stat.fi/tietotrendit/artikkelit/2018/lihasta-luovutaan-pikkuhiljaa-myos-muualla-kuin-paakaupunkiseudulla/>
- Liu, J.–G., Lin, T.–S., & Lin, W.–Y. (2010). *Evaluating the growth of Listeria monocytogenes that has been inoculated into tofu containing background microflora*. Science Direct. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.001>
- Microbiologics. (i.a.). *Käyttöohje*. <https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=1085058&c=915960&h=4cda70b4d9eae863fc1f&xt=.pdf>
- Paulig. (2020). *Nyhtökaura® Pyöryköissä listeriahavainto, varotoimena laajennettu Gold&Green-tuotteiden takaisin veto*. <https://news.cision.com/fi/paulig/r/nyhtokaura--pyorykoissa-listeriahavainto--varotoimena-laajennettu-gold-green-tuotteiden-takaisin-veto,c3161909>
- Ruokavirasto. (10.12.2018). *Elintarviketurvallisuus: Valvonta*. Haettu 27.3.2023. <https://www.ruokavirasto.fi/tietoa-meista/mika-on-ruokavirasto/elintarviketurvallisuuden-varmistaminen/valvontajarjestelyt/elintarvikkeet-valvonta/>
- Ruokavirasto. (2021). *Elintarvike- ja vesivälitteiset epidemiat Suomessa vuosina 2017-2019*. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/julkaisut/julkaisusarjat/julkaisuja/ruokaviraston_julkaisuja_7_2021_301221.pdf
- Ruokavirasto. (6.2022a). *Elintarviketurvallisuus Suomessa 2021*. https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/julkaisut/julkaisusarjat/julkaisuja/julkaisuja_3_2022_elintarviketurvallisuus_suomessa_2021.pdf

- Ruokavirasto. (28.6.2022b). *Listeria: Elintarvikevälitteiset epidemiat*. Haettu 16.2.2023. <https://www.ruokavirasto.fi/zoonosikeskus/ruokamyrytykset/ruokamyrytysten-aiheuttajat/listeria/>
- Ruokavirasto. (6.7.2022c). *Listeria monocytogenes*. Haettu 16.2.2023. <https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/ruokamyrytykset/ruokamyrytyksia-aiheuttavia-bakteereja/listeria/>
- Ruokavirasto. (25.7.2022d). *Ruokamyrytyksiä aiheuttavia bakteereja*. Haettu 28.4.2022. <https://www.ruokavirasto.fi/elintarvikkeet/ohjeita-kuluttajille/ruokamyrytykset/ruokamyrytyksia-aiheuttavia-bakteereja/>
- Ruokavirasto. (22.11.2022e). *Listerioosi*. Haettu 16.2.2023. <https://www.ruokavirasto.fi/zoonosikeskus/zoonosolit/bakteerien-aiheuttamat-taudit/listerioosi/>
- Ruokaviraston ohje 4095/04.02.00.01/2020/4. (2020). https://www.ruokavirasto.fi/globalassets/tietoa-meista/asiointi/oppaat-ja-lomakkeet/yritykset/elintarvikeala/elintarvikealan-oppaat/elintarvikkeiden-mikrobiologiset-vaatimukset_4095_04_02_00_01_2020_4_liitteet-yhdistetty.pdf
- Sojakka, K., & Välimäki, M.–L. (2020). *Ammatillinen mikrobiologia*. (2. painos). Opetushallitus.
- S-ryhmä. (2022). *Vuosi- ja vastuullisuuskatsaus 2022*. https://downloads.ctfasets.net/8122zj5k3sy9/2DPwP469NRA5xJGy0LqQWj/3e18633fe9167e43ba63892c3281d35a/S-ryhman_Vuosi-ja-vastuullisuuskatsaus_2022_fi.pdf
- Sudo Foods. (24.4.2023). *The Evolution of plant-based meat: a brief history*. <https://sudofoods.com/blogs/articles/history-of-plant-based-meat>
- Suomen Standardisoimisliitto (SFS). (i.a.). *ISO 22000 Elintarviketurvallisuus*. <https://sfs.fi/standardeista/tutustu-standardeihin/suositut-standardit/iso-22000-elintarviketurvallisuus/>
- Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos (THL). (14.2.2023). *Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta: Listeria*. Haettu 16.2.2023, https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/shp/fact_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12172
- Terveyskirjasto. (2020). *Kasvisruokavaliot*. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01198>
- Välimaa, A.–L., Tilsala-Timisjärvi, A., & Virtanen, E. (2014). *Listeria monocytogenes -patogeenin tunnistusmenetelmiä elintarviketuotannossa*. MTT. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-487-576-9>
- Wild, F., Czerny, M., Janssen, A., Kole, A., Zunabovic, M., & Domig, K. (2014). *The evolution of a plant-based alternative to meat: From nice markets to widely accepted meat*

alternatives. Agro Food industry Hi Tech. file:///C:/Users/kaupp/Downloads/The_evolution_of_a_plant-based_alternative_to_meat.pdf

LIITTEET

Liite 1. Makkaranäytteiden painot

Liite 2. Näytteiden pesäkemäärät

Liite 1. Makkaranäytteiden painot

NÄYTE	PAINO (g)
1	33,2
2	38,6
3	39,0
4	34,5
5	28,3
6	35,5
7	30,5
8	33,7
9	29,7
10	31,6
11	31,2
12	39,8
13	22,6
14	23,7
15	25,3
16	22,7
17	35,8
18	33,7
19	31,3
20	37,9
21	35,4
22	19,9
23	35,8
24	22,6
25	26,4
26	22,4
27	39,6
28	39,7
29	36,4
30	38,7
31	23,5
32	24,7
33	38,0
34	26,3
35	26,4
36	23,2
37	21,6
38	20,9
39	23,4
40	36,6
41	27,8
42	31,4

Liite 2. Näytteiden pesäkemäärät

PÄIVÄ 1											
Lämpötila +3,0-4,5 °C						Lämpötila +5,5-7,5 °C					
10 ⁴ cfu/pakkaus						10 ⁴ cfu/pakkaus					
NÄYTE 1	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 2	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 3	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 4	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 5	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 6	Pesäkkeet (kpl)
10 ⁻¹	8	10 ⁻¹	3	10 ⁻¹	5	10 ⁻¹	7	10 ⁻¹	6	10 ⁻¹	5
10 ⁻¹	7	10 ⁻¹	7	10 ⁻¹	6	10 ⁻¹	5	10 ⁻¹	2	10 ⁻¹	6
10 ⁻²	1	10 ⁻²	0	10 ⁻²	0	10 ⁻²	0	10 ⁻²	0	10 ⁻²	0
10 ⁻²	1	10 ⁻²	0	10 ⁻²	2	10 ⁻²	0	10 ⁻²	0	10 ⁻²	0
pmy/g	7,73E+02		5,00E+02		5,91E+02	pmy/g	6,00E+02		4,00E+02		5,50E+02
10 ⁷ cfu/pakkaus						10 ⁷ cfu/pakkaus					
NÄYTE 1	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 2	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 3	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 4	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 5	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 6	Pesäkkeet (kpl)
10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC
10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC
10 ⁻²	318	10 ⁻²	314	10 ⁻²	321	10 ⁻²	465	10 ⁻²	471	10 ⁻²	497
10 ⁻²	381	10 ⁻²	273	10 ⁻²	326	10 ⁻²	415	10 ⁻²	424	10 ⁻²	572
10 ⁻³	27	10 ⁻³	44	10 ⁻³	37	10 ⁻³	46	10 ⁻³	65	10 ⁻³	95
10 ⁻³	43	10 ⁻³	26	10 ⁻³	58	10 ⁻³	57	10 ⁻³	51	10 ⁻³	79
10 ⁻⁴	3	10 ⁻⁴	4	10 ⁻⁴	5	10 ⁻⁴	5	10 ⁻⁴	5	10 ⁻⁴	13
10 ⁻⁴	4	10 ⁻⁴	8	10 ⁻⁴	4	10 ⁻⁴	0	10 ⁻⁴	4	10 ⁻⁴	10
10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	1	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	1
10 ⁻⁵	2	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	3	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0
pmy/g	3,50E+05		3,01E+05		3,38E+05	pmy/g	4,46E+05		4,59E+05		5,70E+05
NOLLANÄYTE	Pesäkkeet (kpl)					NOLLANÄYTE	Pesäkkeet (kpl)				
10 ⁻¹	0					10 ⁻¹	0				
10 ⁻¹	0					10 ⁻¹	0				
pmy/g	0					pmy/g	0				

TMTC= Too Much To Count

PÄIVÄ 3											
Lämpötila +3,0-4,5 °C						Lämpötila +5,5-7,5 °C					
10⁴ cfu/pakkaus						10⁴ cfu/pakkaus					
NÄYTE 1	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 2	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 3	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 4	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 5	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 6	Pesäkkeet (kpl)
10 ⁻¹	8	10 ⁻¹	3	10 ⁻¹	4	10 ⁻¹	19	10 ⁻¹	21	10 ⁻¹	8
10 ⁻¹	4	10 ⁻¹	9	10 ⁻¹	4	10 ⁻¹	5	10 ⁻¹	16	10 ⁻¹	7
10 ⁻²	0	10 ⁻²	0	10 ⁻²	0	10 ⁻²	2	10 ⁻²	3	10 ⁻²	0
10 ⁻²	0	10 ⁻²	0	10 ⁻²	2	10 ⁻²	0	10 ⁻²	2	10 ⁻²	1
pmy/g	6,00E+02		6,00E+02		4,55E+02	pmy/g	1,18E+03		1,91E+03		7,27E+02
10⁷ cfu/pakkaus						10⁷ cfu/pakkaus					
NÄYTE 1	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 2	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 3	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 4	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 5	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 6	Pesäkkeet (kpl)
10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC
10 ⁻²	356	10 ⁻²	272	10 ⁻²	324	10 ⁻²	807	10 ⁻²	903	10 ⁻²	TMTC
10 ⁻³	58	10 ⁻³	35	10 ⁻³	TMTC	10 ⁻³	80	10 ⁻³	107	10 ⁻³	123
10 ⁻³	45	10 ⁻³	45	10 ⁻³	34	10 ⁻³	127	10 ⁻³	113	10 ⁻³	125
10 ⁻⁴	10	10 ⁻⁴	2	10 ⁻⁴	2	10 ⁻⁴	17	10 ⁻⁴	10	10 ⁻⁴	6
10 ⁻⁴	6	10 ⁻⁴	0	10 ⁻⁴	6	10 ⁻⁴	9	10 ⁻⁴	11	10 ⁻⁴	7
10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	1	10 ⁻⁵	2	10 ⁻⁵	3
10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	1	10 ⁻⁵	2	10 ⁻⁵	1
pmy/g	3,89E+05		2,90E+05		3,27E+05	pmy/g	8,53E+05		9,39E+05		1,19E+06
NOLLANÄYTE Pesäkkeet (kpl)						NOLLANÄYTE Pesäkkeet (kpl)					
10 ⁻¹	0					10 ⁻¹	0				
10 ⁻¹	0					10 ⁻¹	0				
pmy/g	0					pmy/g	0				
TMTC= Too Much To Count											

PÄIVÄ 6											
Lämpötila +3,0-4,5 °C						Lämpötila +5,5-7,5 °C					
10⁴ cfu/pakkaus						10⁴ cfu/pakkaus					
NÄYTE 1	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 2	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 3	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 4	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 5	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 6	Pesäkkeet (kpl)
10 ⁻¹	6	10 ⁻¹	15	10 ⁻¹	17	10 ⁻¹	50	10 ⁻¹	88	10 ⁻¹	179
10 ⁻¹	7	10 ⁻¹	13	10 ⁻¹	14	10 ⁻¹	39	10 ⁻¹	59	10 ⁻¹	168
10 ⁻²	2	10 ⁻²	3	10 ⁻²	0	10 ⁻²	7	10 ⁻²	10	10 ⁻²	23
10 ⁻²	0	10 ⁻²	2	10 ⁻²	3	10 ⁻²	5	10 ⁻²	11	10 ⁻²	22
pmy/g	6,82E+02		1,50E+03		1,55E+03	pmy/g	4,59E+03		7,64E+03		1,78E+04
10⁷ cfu/pakkaus						10⁷ cfu/pakkaus					
NÄYTE 1	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 2	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 3	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 4	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 5	Pesäkkeet (kpl)	NÄYTE 6	Pesäkkeet (kpl)
10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC	10 ⁻¹	TMTC
10 ⁻²	359	10 ⁻²	TMTC	10 ⁻²	501	10 ⁻²	TMTC	10 ⁻²	TMTC	10 ⁻²	TMTC
10 ⁻³	64	10 ⁻³	124	10 ⁻³	86	10 ⁻³	TMTC	10 ⁻³	479	10 ⁻³	377
10 ⁻³	53	10 ⁻³	118	10 ⁻³	61	10 ⁻³	TMTC	10 ⁻³	TMTC	10 ⁻³	315
10 ⁻⁴	7	10 ⁻⁴	19	10 ⁻⁴	10	10 ⁻⁴	144	10 ⁻⁴	58	10 ⁻⁴	48
10 ⁻⁴	8	10 ⁻⁴	14	10 ⁻⁴	8	10 ⁻⁴	136	10 ⁻⁴	61	10 ⁻⁴	33
10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	2	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	16	10 ⁻⁵	9	10 ⁻⁵	3
10 ⁻⁵	2	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	1	10 ⁻⁵	19	10 ⁻⁵	9	10 ⁻⁵	5
pmy/g	4,03E+05		1,25E+06		5,46E+05	pmy/g	1,43E+07		5,05E+06		3,52E+06
NOLLANÄYTE		NOLLANÄYTE		NOLLANÄYTE		NOLLANÄYTE		NOLLANÄYTE		NOLLANÄYTE	
10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0
10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0	10 ⁻¹	0
pmy/g	0	pmy/g	0	pmy/g	0	pmy/g	0	pmy/g	0	pmy/g	0
TMTC= Too Much To Count											