

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Keyla TRDAN

**MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST IN VARNOST
ZELENE SOLATE (*Lactuca sativa* L.)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Keyla TRDAN

MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST IN VARNOST ZELENE SOLATE
(*Lactuca sativa* L.)

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana

MICROBIOLOGICAL QUALITY AND SAFETY OF GREEN
LETTUCE
(*Lactuca sativa* L.)

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Prehrana. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Barbko Jeršek in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: izr. prof. dr. Barbka Jeršek

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Keyla Trdan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.67:635.52:614.31(043)=163.6
KG	živilska mikrobiologija/varnost živil/zelena solata/ <i>Lactuca sativa</i> L./mikrobiota solate/adhezija/ <i>Listeria monocytogenes</i> / <i>Escherichia coli</i> /aerobne mezofilne bakterije/kvasovke/plesni/način pridelave/skladiščenje/kakovost živil
AV	TRDAN, Keyla, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
SA	JERŠEK, Barbka (mentorica)/VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST IN VARNOST ZELENE SOLATE (<i>Lactuca sativa</i> L.)
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Prehrana)
OP	XI, 55 str., 6 pregl., 18 sl., 68 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preveriti, ali način pridelave, kot so integriran, ekološki, konvencionalni, biodinamičen in hidroponski, ter 10 dnevno skladiščenje zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) pri 3 ± 1 °C, vplivajo na število aerobnih mezofilnih bakterij in število kvasovk ter plesni. Na vzorcih solat, smo preverili tudi naravno prisotnost bakterij vrst <i>Listeria monocytogenes</i> in <i>Escherichia coli</i>. Poleg mikrobiološke kakovosti ter varnosti solate, smo določili stopnjo adhezije bakterij vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i> po umetni kontaminaciji solate z omenjenimi bakterijami in sicer po 1 urni inkubaciji pri 25 °C, ter po 24 in 48 urni inkubaciji pri 10 °C. Eksperimentalno delo je bilo izvedeno v treh bioloških ponovitvah in dveh tehničnih paralelkah. Število aerobnih mezofilnih bakterij in število kvasovk ter plesni je bilo po 10 dnevih skladiščenja pri 3 ± 1 °C večje. Na solati, pridelani na biodinamičen način, smo določili največje število aerobnih mezofilnih bakterij in število kvasovk ter plesni. Najmanjše število aerobnih mezofilnih bakterij in število kvasovk ter plesni smo določili na solati, pridelani na integriran način. Na 2 vzorcih sveže in 2 vzorcih 10 dni stare solate smo določili naravno prisotnost bakterij vrste <i>E. coli</i>. Na določitev stopnje adhezije bakterij vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i> ni vplivala starost solatnega lista (skladiščenega 10 dni pri 5 ± 1 °C). Boljšo stopnjo adhezije na solatni list smo določili pri bakterijah vrste <i>E. coli</i> v primerjavi z bakterijami vrste <i>L. monocytogenes</i>. Adhezijo bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> smo potrdili tudi z opazovanjem solatnega lista z adheriranimi listerijami z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM). Nadaljnje raziskave naravne mikrobiote in adhezije bakterij na solati bodo doprinesle k boljši kakovosti in večji varnosti živil.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 579.67:635.52:614.31(043)=163.6

CX food microbiology/food safety/green lettuce/*Lactuca sativa* L./lettuce microbiota/adhesion/*Listeria monocytogenes*/*Escherichia coli*/aerobic mesophilic bacteria/yeasts/moulds/agricultural practices/storage/food quality

AU TRDAN, Keyla

AA JERŠEK, Barbka (supervisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2015

TI MICROBIOLOGICAL QUALITY AND SAFETY OF GREEN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)

NO XI, 55 p., 6 tab., 18 fig., 69 ref.

LA SI

AL sl/en

AB The purpose of this thesis was to determine whether integrated, organic, conventional, biodynamic and hydroponic agricultural practice as well as 10 days storage of green lettuce (*Lactuca sativa* L.) at 3 ± 1 °C, have any impact on the population of aerobic mesophilic bacteria, yeasts and moulds. Samples of lettuce were analysed for the natural presence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. In addition to the microbiological quality and safety of lettuce, the adhesion level of *E. coli* and *L. monocytogenes* on artificially contaminated lettuce after 1 h incubation at 25 °C, and also after 24 h and 48 h incubation at 10 °C have been determined. Experimental work was carried out in three biological repetitions and two technical parallels. Population of aerobic mesophilic bacteria, yeasts and moulds, increased after 10 days of storage at 3 ± 1 °C. The maximum number of aerobic mesophilic bacteria, yeast and moulds was determined on biodynamic lettuce, and the minimum number of aerobic mesophilic bacteria, yeast and moulds was set on integrated lettuce. Natural presence of *E. coli* was determined on 2 samples of fresh salads and 2 samples of 10 days old salad. The strength of adhesion did not depend on the age of the salad leaf (10 days of storage at 3 ± 1 °C). Greater ability of adhesion was determined by *E. coli* in comparison with *L. monocytogenes*. The adhesion of *L. monocytogenes* was confirmed by observing green salad leaf with adhered listeria with a scanning electron microscope (SEM). Further studies of natural microbiota and adhesion of bacteria on lettuce will contribute to improvements in quality and food safety.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZELENA SOLATA (<i>Lactuca sativa</i> l.)	3
2.2 NARAVNA MIKROBIOTA ZELENE SOLATE	3
2.3 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST IN VARNOST ZELENE SOLATE	4
2.3.1 Bakterije rodov <i>Listeria</i> in <i>Escherichia</i>	4
2.3.2 Mikrobiološke smernice za varnost živil	5
2.3.3 Biofilm na površini solate	7
2.3.4 Vpliv načina pridelave na mikrobioto solate	7
2.3.5 Skladiščenje solate	9
2.4 ADHEZIJA BAKTERIJSKIH CELIC NA ZELENO SOLATO	10
2.4.1 Dejavniki, ki vplivajo na adhezijo bakterij	11
2.4.2 Obstoj bakterijskih celic na solatnem listu	11
2.4.3 Adhezija bakterij vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i> na solatni list	12
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 MATERIAL	14
3.1.1 Bakterijski sevi	14
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	14
3.1.3 Vrstična elektronska mikroskopija	15
3.1.4 Kemikalije za IMViC-test	15
3.1.5 Vzorci solate	16
3.1.6 Laboratorijska oprema	17

3.2	METODE DELA	18
3.2.1	Shema dela	18
3.2.2	Vzorčenje solate	19
3.2.3	Priprava bakterijskih kultur	19
3.2.4	Priprava solate za umetno kontaminacijo	19
3.2.5	Izbor parametrov za adhezijo bakterijskih celic	19
3.2.6	Umetna kontaminacija solate z bakterijami vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i>	20
3.2.7	Določanje adhezije bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	20
3.2.8	Določanje adhezije bakterij vrste <i>E. coli</i>	21
3.2.9	Različni načini pridelave solat	23
3.2.10	Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	24
3.2.11	Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrst <i>E. coli</i>	25
3.2.12	Vpliv skladiščenja solate	26
3.2.13	Kvantifikacija mikroorganizmov	26
3.2.14	Vrstični elektronski mikroskop - SEM	26
3.2.15	Statistična primerjava rezultatov	27
3.2.15.1	Večvzorčna analiza ene spremenljivke	27
3.2.15.2	Analiza variance	27
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	28
4.1	MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST IN VARNOST ZELENE SOLATE	28
4.1.1	Število aerobnih mezofilnih bakterij	28
4.1.1.1	Vpliv skladiščenja	28
4.1.1.2	Vpliv načina pridelave	29
4.1.2	Število kvasovk ter plesni	32
4.1.2.1	Vpliv skladiščenja	32
4.1.2.2	Vpliv načina pridelave	33
4.1.3	Naravna prisotnost bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	35
4.1.4	Naravna prisotnost bakterij vrste <i>E. coli</i>	36
4.2	STOPNJA ADHEZIJE BAKTERIJSKIH CELIC	37
4.2.1	Vpliv tretiranja solate z UV-svetlobo na število aerobnih mezofilnih bakterij na solati	37
4.2.2	Optimizacija parametrov, ki vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij na solatni list	38

4.2.3	Izbor parametrov za določitev stopnje adhezije bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> na solatni list	41
4.2.4	Adhezija bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> na svežo solato	41
4.2.5	Opazovanje bakterij adheriranih na solatne liste z vrstičnim elektronskim mikroskopom	45
5	SKLEPI	48
6	POVZETEK	49
7	VIRI	50
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mikrobiološki kriteriji za svežo narezano zelenjavo, sadje, gobe in kalčke (Smernice..., 2008; Uredba komisije ES 2073/2005, 2005)	6
Preglednica 2: Stopnja adhezije bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> Scott A na površini listov zelja pri različnih temperaturah (Ells in Hansen, 2006)	12
Preglednica 3: Vzorci solat, ki smo jih uporabili za izvedbo eksperimentalnega dela	16
Preglednica 4: Laboratorijska oprema	17
Preglednica 5: Optimizacija parametrov, ki vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na sveži in 10 dni stari solati IP1, skladiščeni pri 5 ± 1 °C	38
Preglednica 6: Optimizacija parametrov, ki vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>E. coli</i> na listu sveže solate IP2 in na listu 10 dni stare solate IP3, skladiščene pri 5 ± 1 °C	40

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Lactuca sativa</i> L. (FAO, 2015)	3
Slika 2: Shema eksperimentalnega dela	18
Slika 3: Kvantifikacija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> pri določanju izbranih parametrov adhezije na sveži in 10 dni stari solati	21
Slika 4: Kvantifikacija bakterij vrste <i>E. coli</i> pri določanju izbranih parametrov adhezije na sveži in 10 dni stari solati	22
Slika 5: Kvantifikacija bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> na sveži solati po optimizaciji izbranih parametrov adhezije bakterij na solato	23
Slika 6: Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na vzorcih solate pridelanih na različne načine	24
Slika 7: Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrste <i>E. coli</i> na vzorcih solate pridelanih na različne načine	25
Slika 8: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij na sveži in 10 dni stari solati NP1 in NP2	28
Slika 9: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih sveže solate pridelanih na različne načine	30
Slika 10: Povprečno število plesni ter kvasovk na sveži in 10 dni stari solati NP2 in NP1	32
Slika 11: Povprečno število kvasovk ter plesni na vzorcih sveže solate pridelanih na različne načine	34
Slika 12: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih sveže solate in na 10 dni starih vzorcih solate pred in po tretiranju z UV-svetlobo	37
Slika 13: Povprečno število bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po 1 h inkubaciji v gojišču PV ter število adheriranih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na sveži solati GP1 po 1 h pri 25 °C ter po 24 h in 48 h pri 10 °C	42
Slika 14: Povprečno število bakterij vrste <i>E. coli</i> po 1 h inkubaciji v gojišču PV ter število adheriranih bakterij vrste <i>E. coli</i> na sveži solati GP1 po 1 h pri 25 °C ter po 24 h in 48 h pri 10 °C	43
Slika 15: Povprečno število adheriranih bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> na sveži solati GP1 po 1 h pri 25 °C ter po 24 h in 48 h pri 10 °C	44
Slika 16: SEM-slika adhezije bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na svežem solatnem listu	45
Slika 17: SEM-slika EPS bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> adheriranih na svežem solatnem listu	46
Slika 18: SEM-slika adheriranih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v bližini listne reže na svežem solatnem listu	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava, simbol	Pomen
ALOA	Gojišče ALOA agar (angl. Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti)
a_w	Vodna aktivnost
BF	Biotehniška fakulteta
BHI	Gojišče BHI (ang. Brain Heart Infusion)
BZLŽB	Gojišče briljantno zeleni žolčni bujon (ang. Brilliant green bile broth 2 %)
CDC	Ameriška zdravstveno-epidemiološka institucija - Center za nadzor bolezni (ang. Centers for Disease Control and Prevention)
CFU	Kolonijska enota (ang. Colony forming unit)
DRBC	Gojišče dikloran-rozbengal kloramfenikol agar (ang. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar)
EPS	Ekstracelične polimerne snovi
FAO	Organizacija združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (ang. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FR	Fiziološka raztopina
H_0	Ničelna domneva
H_1	Alternativna domneva
HF	Gojišče Half Fraser (ang. Half Fraser)
IHM	Inštitut za higieno in mikrobiologijo
KZ	Kmetijska zadruga
<i>lcp</i>	Gen <i>lcp</i> (LMOf2365_0859), ki kodira listerijski protein vezavo na celulozo
MR	Matična raztopina
MRVP	Gojišče M.R.V.P (ang. M.R.V.P. Medium)
N	Število mikroorganizmov
OmpA	Zunanji membranski protein
P	Verjetnost
PCA	Gojišče PCA (ang. Plate count agar)
PV	Peptonska voda
SD	Standardna deviacija

SEM	Vrstični elektronski mikroskop (ang. Scanning electron microscope)
SŠKP	Skupno število kvasovk ter plesni
SŠMO	Skupno število aerobnih mezofilnih bakterij
TBX	Gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X (ang. Tryptone Bile X – Glucuronide Agar)
TSA	Gojišče triptični soja bujon (ang. Tryptone Soya Agar)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organisation)
ŽM	Oznaka seva zbirke bakterijskih kultur Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete

1 UVOD

Različne vrste bakterij najdemo v različnih živilih. Žal se na in v sadju ter zelenjavi pojavijo tudi patogeni mikroorganizmi, ki povzročijo okužbe in zastrupitve z živili. Sveži solatni listi vsebujejo gramnegativne in grampozitivne bakterije, kvasovke, ter plesni. Naravna mikrobiota solate običajno ne vsebuje patogenih mikroorganizmov. V katerem koli koraku (npr. pridelava, transport, pakiranje, predelava, trgovina na drobno) »od kmeta do vilic«, se lahko naravna mikrobiota kontaminira s patogenimi mikroorganizmi iz različnih virov.

Ene izmed zaskrbljujočih bakterij za človeka so bakterije vrste *Listeria monocytogenes*. Gre za patogene bakterije, najpogostejši vir okužbe pa je kontaminirana hrana. Bakterije vrste *Escherichia coli* najdemo v črevesju človeka in živali. Prisotnost bakterij vrste *E. coli* v živilu je pogosto indikator fekalne kontaminacije. Adhezija patogenih mikroorganizmov na solatni list je kljub številnim raziskavam še vedno slabo pojasnjena. Znano je, da bakterijske celice, ki se adherirajo na površino rastlinskega lista tvorijo biofilm, na katerega vplivajo številni dejavniki. Mesta bakterijske adhezije na površini solatnega lista so različna. Nekateri raziskovalci so z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) določili mesto bakterijske adhezije na solatnih listih okoli stomate, trihome ter na poškodovanih mestih solatnega lista. Kakšna bo stopnja adhezije bakterijskih celic je odvisno od številnih dejavnikov. Zaradi hidrofobne kutikule, naj bi se na solatni list lažje adherirale bolj hidrofobne bakterijske celice, kot so npr. bakterije vrste *E. coli*.

Poleg patogenih mikroorganizmov lahko na mikrobiološko kakovost ter varnost solate vpliva še način pridelave ter skladiščenje solate. Pri ekološkem in biodinamičnem načinu pridelave se topnih mineralnih gnojil, pesticidov ter drugih fitofarmacevtskih sredstev ne uporablja. Posledično je število aerobnih mezofilnih bakterij, kvasovk, ter plesni večje v primerjavi s solato, ki je pridelana na hidroponski, integriran in konvencionalen način. Z večdnevskim skladiščenjem solate lahko pride do tkivne izgube vode, zniža se pH, poveča se število aerobnih mezofilnih bakterij, kvasovk ter plesni, ki lahko povzročijo kvar živila.

1.1 NAMEN DELA

Glavni namen magistrske naloge je bil preveriti, ali način pridelave, kot je integriran, ekološki, konvencionalni, biodinamični in hidroponski, ter 10 dnevno skladiščenje solat pri 3 ± 1 °C vpliva na mikrobiološko kakovost (število aerobnih mezofilnih bakterij, kvasovk ter plesni) ter varnost (naravna prisotnost bakterij vrst *L. monocytogenes* ter *E. coli*) solate kristalka (*Lactuca sativa* L.). Poleg mikrobiološke kakovosti ter varnosti solate, smo želeli določiti stopnjo adhezije bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* po umetni kontaminaciji solate z omenjenimi bakterijami po 1 urni inkubaciji pri 25 °C, ter po 24 in 48 urni inkubaciji pri 10 °C. Eksperimentalno delo je bilo izvedeno v treh bioloških ponovitvah in dveh tehničnih paralelkah.

1.2 HIPOTEZE

Predpostavili smo naslednje hipoteze:

- Deset dnevno skladiščenje zelene solate (*Lactuca sativa* L.) pri 3 ± 1 °C bo vplivalo na število aerobnih mezofilnih bakterij ter na število kvasovk in plesni.
- Različni načini pridelave solate (ekološki, biodinamičen, konvencionalni, integriran ter hidroponski) bodo vplivali na število aerobnih mezofilnih bakterij, ter na število kvasovk in plesni. Število aerobnih mezofilnih bakterij ter število kvasovk in plesni, bo največje pri solati pridelani na ekološki način, najmanjše pa pri solati pridelana na konvencionalen način.
- Predpostavljamo, da na nobenem vzorcu solate ne bodo naravno prisotne bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.
- Tretiranje solatnih listov z UV-svetlobo bo zmanjšalo število aerobnih mezofilnih bakterij.
- Uporaba različnih vrst gojišč za umetno kontaminacijo solatnih listov z bakterijami vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* bo vplivala na adhezijo teh bakterij
- Na sveži in 10 dni stari solati skladiščeni pri 5 ± 1 °C, bo adhezija bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* različna.
- Spiranje solatnih listov bo vplivalo na določitev števila adheriranih bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.
- Stopnja adhezije bakterij vrste *E. coli* na solatni list bo večja kot stopnja adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZELENA SOLATA (*Lactuca sativa* L.)

Solata *Lactuca sativa* L. je ena izmed najbolj pomembnih zelenjadnic. Pridelava solate je razširjena po vsem svetu. Kitajska, Združene države Amerike, Španija, Italija, Indija ter Japonska so ene izmed največjih pridelovalk solate na svetu. *Lactuca sativa* L. je agronomsko uvrščena v družino Asteraceae. Večina korenin te enoletne rastline sega v globino 30 cm od tal. Premer korenin je enak premeru rozete. Listi so spiralno razporejeni in tvorijo gosto rozeto. Tekom razvoja, je struktura ter oblika lista solate *Lactuca sativa* L. pridobila več varietet. List je zguban ali gladek, majhen, srednje velik ali velik, ovalne, okrogle ali lopatičaste oblike. Barve lista so svetlo zelena, rumeno zelena, rdečkasta ter rjava. Steblo je v vegetativni fazi kratko. Solatna glava je lahko jajčaste, okrogle ali ploščate oblike ter majhne, srednje ali velike velikosti (Kristkova in sod., 2008; Lešić in sod., 2004).



Slika 1: *Lactuca sativa* L. (FAO, 2015)

2.2 NARAVNA MIKROBIOTA ZELENE SOLATE

Rastogi in sod. (2012) so v svojem raziskovalnem delu mikrobiološko analizirali filosfero (listi ter steblo) solate, ki je bila pridelana v zimskem in poletnem času v različnih krajih v Ameriki. Analizirali so 106 vzorcev iz Kalifornije in Arizone. Ugotovili so, da so kljub letnim časom in mestu pridelave, na filosferi vedno prisotne bakterije rodov *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Alkanindiges*, *Acinetobacter*, *Naxibacter*, *Massilia*, *Duganella*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Exigubacterium* ter *Arthrobacter*. V največji meri se nahajajo gramnegativne bakterije kot so bakterije vrste *Pseudomonas syringae* ter rodu *Erwinia* (*Pantoea*). Poleg grampozitivnih in gramnegativnih bakterij se v veliki meri nahajajo tudi plesni in kvasovke, npr. rodovi *Cladosporium*, *Alternaria*, *Botrytis*,

Helminthosporium, *Auerobasidium*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*, *Cryprococcus*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Sporobolomyces* in *Bullera*.

V veliki meri se nahajajo plesni rodu *Fusarium*, ki med drugim lahko sintetizirajo nevarne toksine (Adamič in sod., 2003). Povečano število kvasovk in plesni pomeni kvar živil, saj le te niso naravna mikrobiota filosfere in so običajno posledica nepravilnega rokovanja z živilom oz. kontaminacije med samo pridelavo in/ali predelavo živila. Mlečno kislinske bakterije se v manjši meri nahajajo na filosferi solate in so ravno tako v povezavi s kvarom živila, saj tvorijo etanol, organske kisline, estre in CO₂. Visoka koncentracija bakterij rodu *Pseudomonas* je na filosferi nezaželjena. Le-te tvorijo pektinolitične encime, ki povzročijo razpad pektina v rastlinskih celicah. Posledično pride do kvara živila (Oliviera in sod., 2010).

2.3 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST IN VARNOST ZELENE SOLATE

Sveža zelenjava ima naravno mikrobioto, ki v večini ne vsebuje patogenih mikroorganizmov. V katerem koli koraku (npr. pridelava, transport, pakiranje, predelava, trgovina na drobno) »od kmeta do vilic«, se lahko živilo kontaminira s patogenimi mikroorganizmi iz različnih virov (iztrebki živali, voda, insekti, zemlja, kmetijska oprema). Dejavniki, ki vplivajo na rast in preživetje patogenih mikroorganizmov so vrsta in sev mikroorganizmov, fiziološko stanje rastline in njena odpornost na mikrobne metabolične procese, kot tudi intrinzični dejavniki rastline (pH, aktivnost vode – *a_w* in sestava atmosfere) (WHO, 2008). Pridelava sveže zelenjave se je v zadnjem desetletju močno povečala in s tem posledično prihaja do večjega števila izbruhov bolezni povezanih z uživanjem sveže zelenjave. Patogeni mikroorganizmi, kot so bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*, običajno v naravni mikrobioti listnate zelenjave niso vključeni, vendar se le te lahko v času pridelave ter predelave adherirajo na zelenjavo. Uživanje zelenjave kontaminirane s patogenimi mikroorganizmi privede do izbruhov različnih obolenj (Oliviera in sod., 2012).

2.3.1 Bakterije rodov *Listeria* in *Escherichia*

Ene izmed patogenih bakterij, ki povzročijo zastrupitve s hrano, so bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*. Bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* so lahko prisotne na/v zeleni solati. Bakterije rodu *Listeria* so ubikvitarne, aerobne do mikroaerofilne, grampozitivne in nesporogene, gibljive, paličaste bakterije. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so malo drugačne od ostalih bakterij, saj rastejo tudi pri nižjih temperaturah, npr. pri temperaturi hladilnika, kot tudi v pakiranih živilih, ki so pripravljena za takojšnje uživanje, zaradi njihove zmožnosti rasti pri nizkih koncentracijah kisika. Razmnožujejo se pri temperaturah od 1 do 45 °C, pri vrednosti pH od 4,4 do 9,6 in pri vrednosti *a_w* do 0,92. Gre za zelo odporne bakterije proti neugodnim dejavnikom okolja. Uniči jih pasterizacija in kuhanje pri 60 °C. Med rizična živila uvrščamo predvsem termično neustrezno obdelana živila, kot npr. mlečni izdelki, meso, suhi mesni izdelki, slabo oprana zelenjava, predpakirana zelenjava, mehki siri, surove dimljene ribe, sladoled in razni delikatesni izdelki. Povzročijo okužbo, ki ji rečemo

listerioza. Lahko se pojavi v različnih oblikah. Gre za oportunistično infekcijo, ki ogroža predvsem rizične skupine. Najbolj nevarna je za otroke, starejše ljudi, nosečnice, novorojenčke in za osebe, ki imajo oslabilen imunski sistem. Pri zdravih ljudeh se listerioza kaže kot slabost, bruhanje in driska. Pri naštetih rizičnih skupinah se bolezen lahko izkaže kot gripa, spontani splav, meningitis in encefalitis (Smole Možina in Bem, 2003; CDC, 2015). Prvi potrjeni izbruh listerioze je bil leta 1983 v porodnišnici v Halifaxu, Nova Scotia, Kanada. Pacientom so servirali kontaminirano zeljno solato (Schlech in sod., 1983; Poročilo o zoonozah..., 2013)

Bakterije vrste *E. coli* najdemo v črevesju človeka in živali. Gre za gramnegativne paličaste bakterije, ki se razmnožujejo v širokem območju od 10 do 46 °C. Nekateri sevi rastejo tudi pri 4 °C. Za rast je pomembno območje a_w med 0,93 in 0,96. Najnižja vrednost pH pri kateri še rastejo je 4,3. Posamezne tipe se loči na podlagi O-K-H antigenov. O-antigen je liposaharid na zunanji celični ovojnici, K-antigeni so kapsularni polisaharidi in H-antigeni so flagelarni proteini. Enteropatogeni (EPEC), enterotoksigeni (ETEC), enteroinvazivni (EIEC) in enterohemoragični serotip (EHEC) (npr. H7:O157) lahko povzročijo alimentarne toksikoinfekcije. Enteropatogene bakterije vrste *E. coli* tvorijo enterotoksin in s tem povzročijo driske pri dojenčkih. Enterotoksigene bakterije vrste *E. coli* tvorijo toksine, ki so termo-labilni in stabilni, tvorijo se v organizmu. Termo-labilni enterotoksin (eksotoksin) povzroči drisko. Enterotoksigene bakterije vrste *E. coli* so lahko prisotne v vodi, ki je kontaminirana s človeškimi iztrebki. Če se to vodo uporablja pri pripravi živila, lahko pride do navzkrižne kontaminacije. Enterohemoragične bakterije vrste *E. coli* izločajo eksotoksin (verotoksin oz. šiga toksin) in povzročijo zastrupitev s hrano. Okužbe z enterohemoragičnimi bakterijami vrste *E. coli* so posledica uživanja rizičnih živil, kot so nezadostno toplotno obdelano surovo mleto meso, surova zelenjava, surovo mleko, sadni sokovi in kontaminirana voda. Pot okužbe je fekalno-oralna, preko vode ali hrane. Pri okužbi se pojavijo trebušni krči in driska (Milohnoja, 2003; Poročilo o zoonozah..., 2013).

2.3.2 Mikrobiološke smernice za varnost živil

Živila ne smejo vsebovati mikroorganizmov, njihovih toksinov ali metabolitov v količini, ki bi lahko predstavljala tveganje za zdravje potrošnikov, zato je bila sprejeta Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. Poleg Uredbe komisije (ES) št. 2073/2005, je inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije leta 2009 v sodelovanju z Zvezo potrošnikov Slovenije pripravil Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku (Smernice..., 2008). Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 določa splošne zahteve v zvezi z varnostjo živil, v skladu s katerimi se hrana, ki ni varna, ne sme dajati v promet. Oblikovana so usklajena varnostna merila za dopustnost hrane v zvezi s prisotnostjo nekaterih patogenih mikroorganizmov. V členu 2 opredeljuje pojem »mikrobiološko merilo« kot merilo, ki določa sprejemljivost živila, serije živil ali proizvodnega postopka na podlagi odsotnosti, prisotnosti ali števila mikroorganizmov in/ali njihove toksine/metabolite na enoto mase, površine, prostornine ali serije. V prilogi 2.5 prikazuje mikrobiološke kriterije za svežo narezano zelenjavo (Uredba komisije ES

2073/2005, 2005). V preglednici 1 so prikazani mikrobiološki kriteriji za svežo narezano zelenjavo, gobe ter kalčke.

Preglednica 1: Mikrobiološki kriteriji za svežo narezano zelenjavo, sadje, gobe in kalčke (Smernice..., 2008; Uredba komisije ES 2073/2005, 2005)

Živilo	Nabor priporočenih parametrov	Plan vzorčenja		Kriteriji
		n	c	
Sveža narezana zelenjava, sadje, gobe in kalčki	* <i>L. monocytogenes</i>	5	0	n. n. v 25 g ⁽¹⁾
		5	0	M in m = 100 cfu/g ⁽²⁾
	<i>E. coli</i>	5	2	m = 100 cfu/g M = 10 ³ cfu/g
	Plesni in kvasovke	5	2	m = 10 ³ cfu/g M = 5x10 ³ cfu/g

Legenda:

* pri izdelkih brez nadaljnje toplotne obdelave

n.n. = ni najdeno.

n = število vzorčnih enot, ki sestavljajo vzorec.

c = število vzorčnih enot, v katerih je število bakterij lahko med »m« in »M«, pri čemer vzorec velja za sprejemljivega, če je število bakterij v drugih vzorčnih enotah »m« ali manj.

m = mejna vrednost, pod katero se vse rezultate šteje za zadovoljive.

M = mejna dopustna vrednost, nad katero se rezultati ne štejejo več za zadovoljive. Če en sam rezultat preseže to vrednost, je vzorec nezadovoljiv.

⁽¹⁾ = To merilo se uporablja, če proizvajalec pristojnemu organu dokaže, da mejna vrednost 100 cfu/g v živilu med rokom uporabnosti ne bo presežena. Nosilec lahko med proizvodnim postopkom določi mejne vrednosti, ki morajo biti dovolj nizke, da se zagotovi, da mejna vrednost 100 cfu/g ob koncu roka uporabnosti ne bo presežena.

⁽²⁾ = To merilo se uporablja za živila, ki jih nosilec živilske dejavnosti še ni dal v promet in pristojnemu organu zanje ne more dokazati, da mejna vrednost 100 cfu/g v živilu med rokom uporabnosti ne bo presežena.

Razlaga rezultatov mikrobioloških preiskav za bakterije vrste *E. coli* v vnaprej narezani zelenjavi:

- Rezultat je zadovoljiv, če so vse ugotovljene vrednosti $\leq m$;
- Rezultat je sprejemljiv, če je največ c/n vrednosti med m in M ter ostale ugotovljene vrednosti $\leq m$;
- Rezultat je nezadovoljiv, če je ena ali več ugotovljenih vrednosti $> M$ ali je več kot c/n vrednosti med m in M.

Razlaga rezultatov mikrobioloških preiskav za bakterije vrste *L. monocytogenes* v sveži narezani zelenjavi:

- Rezultat je zadovoljiv, če so vse ugotovljene vrednosti $\leq m$;
- Rezultat je zadovoljiv, če bakterije vrste *L. monocytogenes* niso prisotne v 25 g vzorca živila;
- Rezultat je nesprejemljiv, če so vrednosti $> M$.

Razlaga rezultatov mikrobioloških preiskav za plesni in kvasovke na sveži narezani zelenjavi:

- Rezultat je zadovoljiv, če so vse ugotovljene vrednosti $\leq m$;
- Rezultat je sprejemljiv, če je največ c/n vrednosti med m in M ter ostale ugotovljene vrednosti $\leq m$;
- Rezultat je nezadovoljiv, če je ena ali več ugotovljenih vrednosti $> M$ ali je več kot c/n vrednosti med m in M (Uredba komisije ES 2073/2005, 2005).

2.3.3 Biofilm na površini solate

Biofilmi so sluzaste združbe na površini predmeta ali živila, v katerih najdemo veliko število različnih ali enakih mikroorganizmov. Tvorba biofilma je mehanizem, ki ga je osvojilo veliko mikroorganizmov, kot način preživetja v stresnih razmerah. Približno 99 % vseh mikroorganizmov živi v biofilmih. Biofilmi so na površini lahko predstavljena kot dvo ali tridimenzionalna večcelična struktura, katerih integriteta je odvisna od ekstraceličnih polimernih snovi (EPS) bakterijskih celic. Osemdeset odstotkov mikroorganizmov na solati je združenih v obliki biofilma (Stopar, 2007; Matthews., 2014; Yaron, 2014).

2.3.4 Vpliv načina pridelave na mikrobioto solate

Poznanih je že 5 načinov pridelave sadja in zelenjave. Lahko pridelujemo na ekološki, hidroponski, konvencionalen, integriran in biodinamičen način.

Ekološki način pridelave sadja in zelenjave ima v slovenskem kmetijstvu vse večji pomen. Pridelava rastlin in reja živali se pri takšnem načinu pridelave eno z drugim dopolnjujeta. Hrana, ki je pridelana na ta način, ima visoko vsebnost vitaminov, mineralov, ter antioksidantov. Uporaba topnih mineralnih gnojil, fitofarmaceutskih pripravkov, gensko spremenjenih mikroorganizmov oz. proizvodov iz gensko spremenjenih mikroorganizmov ter rastni regulatorji, so pri tem načinu uporabe prepovedani. Pridelovalci, ki želijo svoje pridelke prodajati z ekološkim certifikatom, so pod nadzorom nadzornih organov, ki zagotavljajo, da se ekološki pridelovalec drži predpisov evropske zakonodaje. Pridelovalci nato prejmejo ekološki certifikat (MKGP, 2015a).

Biodinamično kmetovanje poleg načel ekološkega kmetovanja upošteva še vplive Lune in kozmičnih energij. Sattler in Wistinghausen (1995) opisujeta, da sile Zemlje in Vesolja v območju kmetijstva delujejo na elemente, kot so ogljik, vodik, žveplo, dušik, kisik in fosfor. Vsi ti elementi tvorijo DNA, ki velja za nosilko dednih snovi. Poleg teh snovi, na kmetovanje vplivajo še luna, planeti in zvezde stalnice. Pri tem načinu pridelave se uporablja tri preparate za škropljenje in sicer, gnoj ter kremen iz kravjega roga in kravjek po Mariji Thun. Z gnojem iz roga škropimo po zemlji pred setvijo, s kremenom iz roga škropimo rastline, s kravjekom po Mariji Thun pa škropimo po zemlji, pod rastlinami. Za pripravo komposta uporabljajo koprivo, kamilico, rman, hrastovo lubje, regrat ter baldrijan. Zelenjava, pridelana na biodinamičen način, se prodaja pod oznako Demeter (Demeter, 2015).

Konvencionalen način pridelave živil je ravno v nasprotju z ekološkim načinom pridelave živil. Pri tem načinu pridelave je uporaba snovi, kot so hormonski regulatorji rasti, sredstva za predčasno prekinitev rasti, sintetičnih gnojil ter topnih fosfatov dovoljena, medtem ko je uporaba teh snovi pri ekološkem načinu pridelave prepovedana (MKGP, 2015b).

Oliviera in sod. (2010) so raziskovali mikrobioto solate, ki je bila pridelana na ekološki in konvencionalni način. Znano je, da se živalski gnoj uporablja tako pri ekološki kot tudi pri konvencionalni pridelavi rastlin. Ekološko pridelana zelenjava je v primerjavi s konvencionalno pridelano zelenjavo veliko bolj tvegana za potrošnika, saj je pri ekološki pridelavi uporaba kemičnih snovi za zmanjševanje mikrobne populacije na solati prepovedana (McMahon in Wilson, 2001). Ekološki pridelovalci so v tej raziskavi uporabljali različne vrste živalskih odpadkov, kot so ovčji in kravji gnoj, ter rastlinski kompost, konvencionalni pridelovalci živalskega gnoja niso uporabljali. Izkazalo se je, da uporaba različnih vrst gnoja ni vplivala na mikrobiološko kontaminacijo solate. Kontaminacija z aerobnimi mezofilnimi bakterijami, kvasovkami, ter plesnimi, je bila večja na solati, ki je bila pridelana na ekološki način, kot na solati pridelani na konvencionalni način. Bakterije vrste *E. coli* so bile prisotne v 16 vzorcih solate (22,2 %) pridelanih na ekološki način in v 9 vzorcih solate (12,5 %) pridelanih na konvencionalen način. Do kontaminacije z bakterijami vrste *E. coli* je lahko prišlo zaradi ne upoštevanja dobre higienske prakse ali s sporadično kontaminacijo z vodo, ki se uporablja za namakanje. Izkazalo se je, da so bile prisotne bakterije vrste *E. coli*, ki niso patogene za človeka. Bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* na vzorcih solate niso dokazali. V nasprotju s številnimi raziskavami so v tej raziskavi prikazali, da je solata, ki je pridelana na ekološki način, varna za potrošnika. Do kontaminacije z bakterijami vrste *L. monocytogenes* lahko pride preko zemlje in vode. Carlin in sod. (1996), Babic in sod. (1997) ter Liao in Fett (2001) so potrdili, da ima mikrobiota (*Enterobacteriaceae* in *Pseudomonas* spp.) na solati lahko inhibitorni učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes*.

Osvald in Kogoj Osvald (2003) sta integriran način pridelave zelenjave poimenovala Zdrav način pridelovanja zelenjave. Gre za kombinacijo agrotehničnih ukrepov, kjer se upošteva biološke, biotehnološke, genetske, tehnične in varstvene ukrepe. Pri tem načinu pridelovanja je pomembno kolobarjenje, semena, sorte, gnojenje, tla, zemljišča, setve, posevki, namakanje, varovanje pred pleveli, boleznimi ter škodljivci. Uporaba gensko spremenjenih organizmov je prepovedana, potreben je nadzor nad uporabo gnojil ter fitofarmacevtskih sredstev, gnojenje z organskimi gnojili ima prednost pred mineralnimi gnojili, izvajajo se redne analize pred gnojenjem in s tem preprečevanje prehoda nitratov v podtalnico in posledično kopičenje le-teh v rastlinah (MKGP, 2015c).

Hidroponika je znanost o gojenju rastlin brez zemlje. Gre za način gojenja rastlin v vodi, ki ji dodajamo hranila. Pri tem načinu pridelave je potrebna primerna posoda, hidroponsko polnilo (mivka, pesek, opeka, vermikulit, perlit,), gnojilo z dušikom, fosforjem, kalijem, kalcijem, magnezijem, železom, cinkom in manganom. Pri zalivanju je pomembno, da je polnilo vedno vlažno, a ne mokro (Krese, 1989; Benton Jones, 2014). Pri tem načinu pridelave je hranilna vrednost in kontaminacija solate bolje nadzorovana. Vir kontaminacije pri hidroponski pridelavi solate je voda. Selma in sod. (2012) so želeli ugotoviti razliko v mikrobiološki kontaminaciji solate sorte maslenka, hrastolistna z rdečimi listi in lollo rosa, pridelane na hidroponski način oz. brez zemlje in na ekološki način. Solate so nato embalirali v polipropilensko vrečko z modificirano atmosfero ter skladiščili najprej 3 dni pri 4 °C in nato še 9 dni pri 7 °C. Število aerobnih mezofilnih bakterij je bilo večje (0,9 log enot) pri vseh treh sortah solate, ki so bile pridelane na ekološki način. Tekom skladiščenja se je tako

pri hidroponski solati, kot pri solati pridelana na ekološki način, število aerobnih mezofilnih bakterij povečalo. Število plesni in kvasovk je bilo pri obeh načinih pridelave enako (4 – 4,6 log enot). V času skladiščenja se je število plesni in kvasovk povečalo, izjema je bila sorta maslenka, saj je število plesni in kvasovk ostalo nespremenjeno.

2.3.5 Skladiščenje solate

Sveža listnata zelenjava ima po pridelavi, če je izpostavljena neugodnim razmeram, kratek rok trajanja. Rok trajanja sveže listnate zelenjave je dinamičen proces, ki je odvisen od interakcij med naravno mikrobioto, temperaturo in relativno vlago (Moreira in sod., 2003). Izguba vlage med skladiščenjem vodi do zmanjšanja teže in krčenja solate (Roura in sod., 2000). Drugi pojav, ki vpliva na rok trajanja sveže zelenjave je rast in razvoj mikroorganizmov. Poznavanje naravne mikrobiote sveže zelenjave je v različnih razmerah shranjevanja temeljnega pomena, če se ta izdelek trži kot svež izdelek, saj imajo mikroorganizmi pomembno vlogo pri ohranjanju kakovosti (Ponce in sod., 2002). Življenjska doba solate (*Lactuca sativa* L.) je omejena z dehidracijo. Če je zelenjava skladiščena v optimalnih razmerah, kot je npr. 95-98 % relativna vlaga, ne pride do izgube vlage. Nizka relativna zračna vlaga med skladiščenjem lahko privede do tkivne izgube vode v solati (Herppich in sod., 1999).

Namen raziskovalne naloge, ki so jo izvedli Agüero in sod. (2011) je bilo ovrednotiti spremembe različnih indeksov kakovosti solate med shranjevanjem pri optimalni temperaturi (0–2 °C), ter pri relativni vlagi, 70-72 % in 95-98 %. Kakovostni parametri so bili: izguba teže solate in vsebnosti vode, vsebnost klorofila, naravna mikrobiota, ohranitev askorbinske kisline in splošna senzorična sprejemljivost izdelka. Naravno mikrobioto solate so analizirali v notranjosti, sredini in na zunanji strani solatne glave pri optimalni (95-98 %) ter pri nizki relativni vlagi (70-72 %). Začetne mikrobiološke analize niso pokazale bistvenih razlik v številu aerobnih mezofilnih bakterij v različnih predelih solate. Začetno število aerobnih mezofilnih bakterij je bilo 7-7,4 log cfu/g. Po 6 dnevnem skladiščenju pri optimalni relativni vlagi (95-98 %) je bilo število aerobnih mezofilnih bakterij 8,0-9,0 log cfu/g, pri nižji relativni vlagi (70-72 %) pa je bilo število aerobnih mezofilnih bakterij 8,7-9,0 log cfu/g. Na solati, ki je bila 6 dni skladiščena pri optimalni relativni vlagi (95-98 %), so določili večje število aerobnih mezofilnih bakterij na zunanjem delu solatne glave. Število kvasovk in plesni je bilo v začetnem stanju večje na zunanjem delu (6,3-6,5 log cfu/g), kot pa v srednjem in notranjem delu solatne glave (5,3-5,5 log cfu/g). Po 6 dnevnem skladiščenju pri optimalni relativni vlagi (95-98 %) je rast plesni in kvasovk sledila značilni rastni krivulji, število je bilo še vedno večje na zunanjem delu solatne glave. Število kvasovk in plesni pri nižji relativni vlagi (70-72 %) je bilo večje v primerjavi s skladiščenjem pri optimalni relativni vlagi (95-98 %), vendar razlik v različnih predelih solatne glave ni bilo moč opaziti. Na začetku analiz je bila vsebnost vode drugačna v zunanjem delu solatne glave, kot v srednjem in notranjem delu solatne glave. Razlike v srednjem in notranjem delu solatne glave niso opazili. Med skladiščenjem pri nizki relativni vlagi (70-72 %), so zabeležili visok upad vsebnosti vode v zunanjem delu solatne glave, do čim v srednjem in notranjem delu je

bil zabeležen konstanten upad. Skladiščenje solate pri optimalni relativni vlagi (95-98 %) ni pokazalo nobenih razlik v vsebnosti vode pri različnih delih solatne glave.

2.4 ADHEZIJA BAKTERIJSKIH CELIC NA ZELENO SOLATO

Patogeni mikroorganizmi prehajajo na površino rastlin preko vode, gnoja ali z neprimernim rokovanjem. Na listni površini solate se nato adherirajo ter razmnožujejo. Večina listnih površin je prekritih s kutikulo. Gre za hidrofobno komponento zgrajeno pretežno iz maščobnih kislin, voskov in polisaharidov. Kutikula ima zaščitno funkcijo lista pred dehidracijo kot tudi pred infiltracijo mikroorganizmov. Kutikula podpira pritrditev hidrofobnih molekul. Na adhezijo mikroorganizmov vpliva tudi topografija lista. Zaradi razpokane kutikule oz. kakršnih drugih poškodb, so posledično celice zgornje povrhnjice izpostavljene mikroorganizmom. Najpogostejša mesta za adhezijo na solatni list so listne reže, razpokana kutikula, listne vene ter poškodovani deli solate. Solatni listi so na polju negostoljubno mesto za enteropatogene mikroorganizme, saj so izpostavljeni velikim temperaturnim nihanjem, UV-svetlobi, omejena pa je tudi dostopnost hranil ter vode (Yaron, 2014).

Filosfera solatnega lista zajema celotno površino lista ter stebela. Na filosferi solatnega lista je naravno prisotna pestra mikrobiološka združba. Temperatura, padavine, veter in sončna svetloba so dejavniki, ki vplivajo na bakterijsko kolonizacijo filosofere (Kinkel, 1997). Manj znan je vpliv diverzitete in dinamike mikrobne združbe, ki se nahaja na filosferi, na bakterijsko adhezijo. Vrsta ter morfologija rastlin, mesto, višina ter starost lista, so v povezavi z bakterijsko populacijo na filosferi. Celice epidermisa, utori vzdolž ven ter listne reže, so najpogostejša mesta bakterijske adhezije (Davis in Brlansky, 1991; Mariano in McCarter, 1993; Mew in sod., 1984). Razlika v bakterijski populaciji na filosferi različnih sort solate, je lahko odvisna od vode, kutina, topnih ogljikovih hidratov, vsebnosti mineralov (magnezij, kalcij, natrij, kalij), vsebnosti fenolnih komponent, le te imajo lahko inhibitorni učinek na številne bakterije, ter od debeline lista in listne sredice oz. mezofila (Yadav in sod., 2005; Hunter in sod., 2010). Razumevanje vpliva filosofere na bakterijsko adhezijo, bo imelo pomembno vlogo pri nadzorovanju rastlinskih patogenov, kvarljivcev ter zoonoz v prihodnosti (Whipps in sod., 2008). Dostopnost ogljika raziskovalci predstavljajo kot glavno omejitev bakterijske rasti na filosferi (Lindow in Brandl, 2003). Enostavni sladkorji, kot je glukoza, fruktoza in saharoza so glavni vir ogljika. Vsebnost kalcija vpliva na mnoge rastlinske odzive. Odpiranje ter zapiranje listnih rež regulirajo dve celici zapiralki, med katerima se nahaja odprtina (Hladnik in Vodnik, 2007). Odpiranje celic zapiralk je v povezavi s kalcijevim ciklusom. S tem lahko koncentracije kalcija indirektno vplivajo na bakterijsko populacijo filosofere (Dobney in sod., 2009). Nasprotno pa so prikazali, da gostota listnih rež ter raven transpiracije, vplivajo na vsebnost kalcija v rastlinskih listih (Hunter in sod., 2010; Barta in Tibbitts, 2000; Quintana in sod., 2001).

2.4.1 Dejavniki, ki vplivajo na adhezijo bakterij

Ko bakterijske celice pridejo v stik s površino solatnega lista, pride do razvoja biofilma, ki poteka v dveh fazah. Primarna faza adhezije se pojavi po nekaj sekundah po stiku bakterije s površino lista. Gre za šibko, reverzibilno in nespecifično vezavo, ki običajno temelji na fizikalnih dejavnikih, kot so hidrofobnost in naboj. V sekundarni fazi adhezije lahko pride do močne, ireverzibilne vezave. Za nastanek biofilma za večino celic velja, da potrebujejo flagele, pile in fimbrije (Stopar, 2007). Boyer in sod. (2011), Matthews (2014) ter Yaron (2014) navajajo, da so poškodovani deli rastlin bolj ugodni za adhezijo bakterijskih celic, predvsem zaradi večje dostopnosti hranil, ki so potrebna za rast in razvoj bakterijskih celic. Zunanji dejavniki, kot je temperatura, ravno tako vpliva na adhezijo bakterijskih celic. Adhezija bakterijskih celic naj bi bila pri nizkih temperaturah manj obsežna. Do adhezije bakterij vrste *E. coli* na solatnih listih, naj bi prišlo na mestih kot so listne reže, vendar imajo na adhezijo bakterijskih celic vpliv še naboj celične površine, prisotnost divalentnih kationov, hidrofobnost, proizvodnja polisaharidnih kapsul, ter produkcija tankih, navitih fibril (ang. curli) (Yaron, 2014). Zaradi vsebnosti kislinskih ostankov imajo kapsule negativni naboj. Kapsule, ki obdajajo bakterijsko celico, lahko spodbudijo ali preprečijo bakterijsko adhezijo. Hidrofilna kapsula, lahko prekrije hidrofobne lastnosti celičnega ovoja in s tem prepreči adhezijo bakterijske celice na hidrofobno površino. Naboj celične površine je za enkrat slabo pojasnjen. Enako velja za hidrofobnost. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so pozitivno nabite in močno hidrofilne, vendar se še vedno v veliki meri adherirajo na hidrofobne površine (Frank, 2001).

2.4.2 Obstoje bakterijskih celic na solatnem listu

Obstoje bakterijskih celic na solatnem listu je odvisen od vrste in seva bakterijskih celic, kot tudi od sorte in starosti solate. Van der Linden in sod. (2013) so prikazali, da je adhezija bakterij vrste *E. coli* večja na starejših solatnih listih, kot pa na mlajših. K obstoju bakterijskih celic na površini lista lahko pripomore naravna mikrobiota. Do negativnih interakcij pride pri tekmovanju za hranila in vezavna mesta. Do pozitivnih interakcij pa pride pri degradaciji polimerov v rastlinski celični steni, s tem je dostopnost hranil večja in lažja je tvorba biofilma. Raziskave kažejo, da do vdora patogenih mikroorganizmov v solatni list pride v primeru, ko gre za visoko populacijo patogenih mikroorganizmov (Yaron, 2014). Oliviera in sod. (2012) so v svoji raziskavi želeli prikazati interakcijo med naravno mikrobioto solate, pridelane na ekološki in konvencionalni način, ter bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*. Solate so skladiščili 8 dni pri 10 °C. Ugotovili so, da naravna mikrobiota solate – število aerobnih mezofilnih bakterij, pridelana na konvencionalen način, ni vplivala na rast in razvoj bakterij vrste *L. monocytogenes* po 8 dnevih skladiščenja pri 10 °C. Je pa imela naravna mikrobiota solate – število aerobnih mezofilnih bakterij, pridelana na ekološki način, pozitiven vpliv na rast ter razvoj bakterij vrste *L. monocytogenes* po 8 dnevih skladiščenja pri 10 °C. Na rast in razvoj bakterij vrste *E. coli* pozitivno vpliva naravna mikrobiota solate – število aerobnih mezofilnih bakterij, pridelana na konvencionalen način, ter 8 dni skladiščena pri 10 °C. Naravna mikrobiota solate – število aerobnih mezofilnih

bakterij, pridelana na ekološki način, ter skladiščena 8 dni pri 10 °C ni vplivala na rast in razvoj bakterij vrste *E. coli*.

2.4.3 Adhezija bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* na solatni list

Solata je v času gojenja v stiku z zemljo. Pri pridelavi in predelavi so solatni listi podvrženi mehanskim poškodbam in s tem se možnosti za adhezijo patogenih mikroorganizmov na solatnih listih povečajo. Raziskovalci poročajo o pritrditvi bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* O157:H7 na težje dostopnih mestih listnate zelenjave, kot so listne reže (Ells in Hansen, 2006; Ölmez in Temur, 2010). Kljub vsem raziskavam, pa je mehanizem pritrdjevanja bakterijskih celic še vedno slabo pojasnjen. Specifične celične komponente (fimbriji, lipopolisaharidi) in nespecifični dejavniki (naboj na celični površini, hidrofobnost) naj bi vplivali na mehanizem celične adhezije (Boyer in sod., 2011).

Vatanyoopaisarn in sod. (2000), kot tudi Gorski in sod. (2003) so prikazali pomembnost flagel za pritrditev celic bakterij vrste *L. monocytogenes*. Peel in sod. (1988) navajajo, da je rast flagel pri različnih temperaturah zelo različna. Bakterije vrste *L. monocytogenes*, ki bodo zrasle pri različnih temperaturah in se bodo razlikovale v hidrofobnosti, v površinskem naboju, sprejemanju ter oddajanju elektronov, bodo imele različno stopnjo adhezije (Briand et al. in sod., 1999a,b; Ells in Hansen, 2006). V raziskavi, ki sta jo opravila Ells in Hansen. (2006) se je izkazalo, da se bakterije vrste *L. monocytogenes* Scott A različno adherirajo pri različnih temperaturah. V preglednici 2 je prikazana stopnja adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* Scott A na površini listov zelja pri različnih temperaturah.

Preglednica 2: Stopnja adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* Scott A na površini listov zelja pri različnih temperaturah (Ells in Hansen, 2006)

Temperatura (°C)	Stopnja adhezije (vrednost S_R)			
	0 h	1 h	4 h	24 h
10	0,693±0,049	0,770±0,064	0,834±0,080	0,842±0,053
22	0,718±0,028	0,739±0,070	0,807±0,047	0,863±0,037
37	0,665±0,053	0,680±0,061	0,734±0,028	0,827±0,066

Legenda: S_R : pomeni kvocient števila bakterijskih celic, ki ostanejo na listih zelja in števila vseh bakterijskih celic

Iz preglednice 2 je razvidno, da je bila največja adhezija bakterij vrste *L. monocytogenes* Scott A po 24 urni inkubaciji pri temperaturi 22 °C. Izkazalo se je, da je površina bakterij vrste *L. monocytogenes* hidrofilna z velikim negativnim nabojem. Nekateri raziskovalci poročajo, da naj bi vsi sevi bakterij vrste *L. monocytogenes* vsebovali gen *lcp* (LMOF2365_0859), ki kodira listerijski protein za vezavo na celulozo. Znano je, da je rastlinska celična stena v večji meri zgrajena iz celuloze, hemiceluloze, pektina in lignina. Gen *lcp* naj bi imel vezavno vlogo pri adheziji bakterij vrste *L. monocytogenes* na rastlinsko celično steno (Dongryeoul in sod., 2015).

Pri gramnegativnih bakterijah, kot so bakterije vrste *E. coli*, ima na adhezijo teh bakterijskih celic vpliv zunanji membranski protein A (OmpA). Izguba O-antigena ima lahko pomembno vlogo pri adheziji bakterijskih celic. O-antigen je po večini hidrofilen in lahko zakrije hidrofobne lastnosti lipida A, zato so celice v odsotnosti O-antigena, bolj hidrofobne. Nekateri raziskave niso prikazale nobene povezave med adhezijo bakterijskih celic na površini solate in hidrofobnosti (Dickson in Koohmaraie, 1989; Hassan in Frank, 2004; Li in McLandsborough, 1999; Boyer in sod., 2011). V raziskavi, ki jo je izvedel Boyer in sod. (2011) je prikazano, da so bakterije vrste *E. coli* O157:H7 imele manjšo stopnjo adhezije ob prisotnosti O-antigena, kar pomeni, večja ko je hidrofilnost celice, manjša je adhezija bakterijskih celic na solato. Gramnegativne bakterije imajo negativen naboj. Lipid A ima negativen naboj in je hidrofoben. Poleg tega, da je O-antigen hidrofilen, je ob enem tudi brez naboja. Bakterijske celice, s pomanjkanjem O-antigena, so bolj negativno nabite in posledično se lažje povežejo s fosfatnimi skupinami. Žal v tej raziskavi niso mogli prikazati ali naboj celice vpliva na stopnjo adhezije.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili bakterije vrst *Listeria monocytogenes* ŽM58a (serotip 4b, IHM, Inštitut za higieno in mikrobiologijo, Wuerzburg, Nemčija) in *Escherichia coli* ŽM516 (ATCC 25922).

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Za izvedbo poskusa smo potrebovali sledeča gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca:

Gojišče triptični soja bujon (TSA, angl. Tryptone Soya Agar, Biolife, 4021502, Milano, Italija)

Gojišče ALOA (angl. Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti, Biolife, 4016052, Milano, Italija):

- Selektivni dodatek (ALOA enrichment selective supplement Biolife, 423501, Milano, Italija)
- Sterilna destilirana voda
- Etanol (Merck, 1.00983.1000, Darmstadt, Nemčija)

Gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X (TBX, ang. Tryptone Bile X – Glucuronide Agar, Merck, 1.16122.0500, Darmstadt, Nemčija)

Gojišče triptični soja bujon (TSB, ang. Tryptone Soya Broth, Biolife, 4021552, Milano, Italija)

Gojišče BHI (ang. Brain Heart Infusion, Merck, 1.10493.0500, Darmstadt, Nemčija)

Gojišče PCA (ang. Plate count agar, Merck, 1.05463.0500, Darmstadt, Nemčija)

Gojišče DRBC (ang. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar, Oxoid, CM0727, Anglija)

- 96 % etanol (Itrij, Slovenija)
- Kloramfenikol (ang. Chloramphenicol supplement, Oxoid, SR0078E, Anglija)

Gojišče briljantno zeleni žolčni bujon (BZLŽB, ang. Brilliant green bile broth 2 %, Biolife, 4012652, Milano, Italija)

Gojišče Fraser (ang. Fraser Listeria selective enrichment broth (base), Merck, 1.10398.0500, Darmstadt, Nemčija)

- Amonijev železov (III) citrat (ang. Ammonium iron (III) citrate, 100093)

- Selektivni dodatek (ang. Fraser supplement, Merck, 1.000.930.010, Darmstadt, Nemčija)

Pepton (angl. Peptone bacteriological, Biolife, 4122592, Milano, Italija)

0,1 % Puferirana peptonska voda (PV, ang. Peptone water (buffered), Merck, 1.07228.0500, Darmstadt, Nemčija). 0,1 % PV smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,0255 g puferirane peptonske vode v 1 l destilirane vode ter avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Fiziološka raztopina FR

- Kalijev dihidrogen fosfat-KH₂PO₄ (Merck, 1.04873.0250, Darmstadt, Nemčija)

3.1.3 Vrstična elektronska mikroskopija

Vzorce smo pripravili na Biotehniški fakulteti, Oddelek za živilstvo. Priprava fiksativa in elektronska mikroskopija sta bila izvedena na Nacionalnem inštitutu za biologijo, Ljubljana (dr. Magda Tušek Žnidarič).

3.1.4 Kemikalije za IMViC-test

- Gojišče triptonska voda (ang. Tryptone wasser, Merck, 1.10859.0500, Darmstadt, Nemčija)
- Gojišče MR-VP (ang. M.R.V.P. Medium, CM0043, Oxoid, Anglija)
- Simonsonov citratni agar (ang. Simomons citrate agar, Oxoid, CM155, Anglija)

3.1.5 Vzorci solate

V preglednici 3 so predstavljeni vzorci solat, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

Preglednica 3: Vzorci solat, ki smo jih uporabili za izvedbo eksperimentalnega dela

Oznaka solate	Sorta solate	Proizvajalec oz. trgovina	Št. vzorcev	Način pridelave	Starost solate	Razmere skladiščenja	Preiskave
IP1	Kristalka	A	1	Integriran	Sveža in 10 dni stara	25 °C, 5 °C	Izbor parametrov za adhezijo bakterij <i>L.m.</i> , SŠMO, SEM
IP2	Kristalka	B	1	Integriran	Sveža	25 °C	Izbor parametrov za adhezijo bakterij <i>E. c.</i> , SŠMO, SEM
IP3	Kristalka	B	1	Integriran	10 dni stara	5 °C	Izbor parametrov za adhezijo bakterij <i>E. c.</i> , SŠMO
GP1	Kristalka	C	3	Integriran	Sveža	25 °C	Umetna kontaminacija z <i>L.m</i> , <i>E.c</i> , in določitev adhezije, SŠMO
NP1	Kristalka	D	5	Integriran	Sveža in 10 dni stara	25 °C, 3 °C	Vpliv skladiščenja, naravna prisotnost bakterij <i>L.m</i> , <i>E.</i> , SŠMO in SŠKP
NP2	Fancy	E	5	Integriran	Sveža in 10 dni stara	25 °C, 3 °C	Vpliv skladiščenja, naravna prisotnost bakterij <i>L.m,E.c</i> , SŠMO in SŠKP
HID1	Kristalka	E	3	Hidroponski	Sveža	25 °C	Naravna prisotnost bakterij <i>L.m,E.c</i> , SŠMO in SŠKP
INT1	Kristalka	E	3	Integriran	Sveža	25 °C	Naravna prisotnost bakterij <i>L.m.,E.c</i> , SŠMO in SŠKP
EKO1	Kristalka	F	3	Ekološki	Sveža	25 °C	Naravna prisotnost bakterij <i>L.m,E.c</i> , SŠMO in SŠKP
INT2	Kristalka	G	3	Integriran	Sveža	25 °C	Naravna prisotnost bakterij <i>L.m,E.c</i> , SŠMO in SŠKP
EKO2	Kristalka	G	3	Ekološki	Sveža	25 °C	Naravna prisotnost bakterij <i>L.m,E.c</i> , SŠMO in SŠKP
BIOD1	Kristalka	G	3	Biodinamični	Sveža	25 °C	Naravna prisotnost bakterij <i>L.m,E.c</i> , SŠMO in SŠKP
KONV1	Kristalka	G	3	Konvencionalni	Sveža	25 °C	Naravna prisotnost bakterij <i>L.m,E.c</i> , SŠMO in SŠKP

Legenda: SŠMO: skupno število aerobnih mezofilnih bakterij; SŠKP: skupno število plesni ter kvasovk.; *L.m*: bakterije vrste *L. monocytogenes*; *E.c*: bakterije vrste *E. coli*; SEM: pregled adheriranih bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na solatnih listih z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

3.1.6 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo potrebovali pri izvajanju eksperimentalnega dela je predstavljena v preglednici 4.

Preglednica 4: Laboratorijska oprema

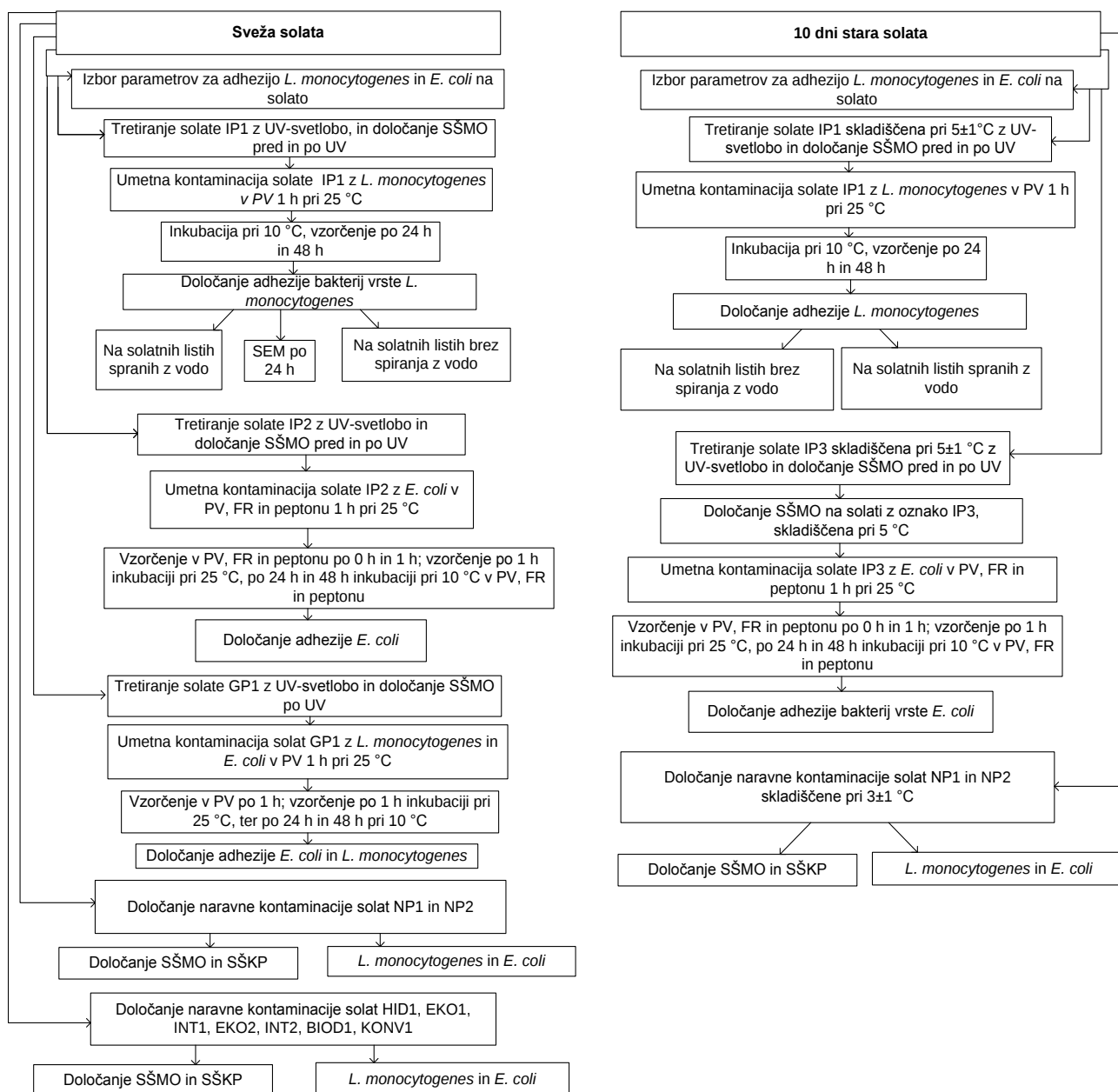
Laboratorijska oprema	Oznaka in proizvajalec
UV-luč	valovna dolžina 366 nm, MANWOOD/36
Digestorij	tip 382
Avtoklav	Sutjeska, serija 1-61-137, Srbija
Avtoklav	Sutjeska, tip 500 x 700 , Srbija
Hladilna omara	LTH
Inkubator	Kambič, tip I-105 CK, Slovenija
Inkubator z mešali	Kambič, tip I-45-4M, Slovenija
Tehnica	Mettler toledo, tip PB 1502-S/A, Švica
Namizno mešalo	Yelowline, TTS 2, tip T, Nemčija
Plastične petrijevke	Golias Labortechnika, Slovenija
Pipete in nastavki za pipete	Eppendorf, Francija
Gnetilnik	Seward, Stomacher 400, tip BA 7021, Anglija
Vrečke za gnetilnik	Golias Labortechnika, Slovenija

Ostala laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri izvedbi eksperimentalnega dela je bila: gorilnik, cepilna zanka in igla, Durhamove cevke, trikotna palčka za razmaz, sterilne epruvete, pinceta, skalpel, stojalo za epruvete, steklenice za pripravo gojišč, čaše, merilni valji, papirnate brisače, lateks rokavice, prozorne vrečke za zmrzovanje živil, parafilm, trak za avtoklaviranje, škarje, etanol (70 %, 96 %) za razkuževanje nekatere laboratorijske opreme in delovne površine, ter destilirana voda.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Shema dela

Na sliki 2 je predstavljena shema, ki prikazuje celoten potek eksperimentalnega dela.



Slika 2: Shema eksperimentalnega dela

Legenda: SŠMO: skupno število aerobnih mezofilnih bakterij; IP1, IP2, IP3, GP1, NP1, NP2, INT1, INT2: solate pridelane na integriran način (n=21); HID1: solata pridelana na hidroponski način (n=3); EKO1, EKO2: solati pridelani na ekološki način (n=6); BIOD1: solata pridelana na biodinamičen način (n=3); KONV1: solata pridelana na konvencionalen način (n=3); SEM: vrstični elektronski mikroskop; FR: fiziološka raztopina; PV: peptonska voda; SŠKP: število kvasovk ter plesni; n: število vzorcev.

3.2.2 Vzorčenje solate

Vsak vzorec solate smo vzorčili v dveh ponovitvah in v treh paralelkah. Na začetku eksperimentalnega dela, smo želeli določiti, kateri parametri so pomembni za določitev adhezije bakterijskih celic na solatni list, zato smo vzorčili svežo in 10 dni staro solato, ki je bila skladiščena v hladilniku pri 5 ± 1 °C. Vzorčenje smo izvedli 1 h, 24 h in 48 h po umetni kontaminaciji solatnih listov. V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo nato vzorčili samo svežo solato, saj nas iz vidika varnosti potrošnika najbolj zanima sveža solata.

3.2.3 Priprava bakterijskih kultur

Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo s cepilno zanko precepili v 10 ml gojišča TSB. Bakterije vrste *E. coli* pa smo s cepilno zanko precepili v 10 ml gojišča BHI. Vse suspenzije smo preko noči inkubirali pri 37 °C na stresalniku (75 obr.^{-1}).

3.2.4 Priprava solate za umetno kontaminacijo

Solato smo predhodno stehali in 16-18 listov 30 minut (15 minut na vsaki strani) tretirali z UV-svetlobo v brezprašni komori. Namen tega tretiranja je bil zmanjšati populacijo naravno prisotnih mikroorganizmov na solati.

3.2.5 Izbor parametrov za adhezijo bakterijskih celic

Zanimalo nas je, ali sledeči parametri vplivajo na določitev adhezije bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na solatne liste:

- Starost solate: preverili smo adhezijo na sveži in 10 dni stari solati.
- Spiranje solatnih listov pred določitvijo adhezije: preverili smo adhezijo bakterij brez spiranja z vodo in adhezijo po spiranju.
- Vrsta gojišča: za umetno kontaminacijo solate smo preizkusili s puferirano peptonsko vodo, 0,1 % puferirano peptonsko vodo in fiziološko raztopino.
- Čas skladiščenja solatnih listov: 10 dni pri 5 ± 1 °C; 24 h, 48 h pri 10 °C.
- Tretiranje solate z UV svetlobo: 30 minut (15 minut na vsaki strani solatnega lista).
- Kvantifikacija bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču po 1 h inkubaciji pri 25 °C, na sveži in 10 dni stari solati po 1 h inkubaciji pri 25 °C, po 24 h in 48 h inkubaciji pri 10 °C.
- Kvantifikacija bakterij vrste *E. coli* v gojišču PV, FR in peptonu po 0 h in 1 h inkubaciji pri 25 °C, na sveži in 10 dni stari solati po 1 h inkubaciji pri 25 °C, po 24 h in 48 h pri 10 °C.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo optimizirali izbrane parametre, ki so pomembni pri določitvi adhezije bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na solatne liste.

3.2.6 Umetna kontaminacija solate z bakterijami vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*

Za optimizacijo parametrov, ki vplivajo na adhezijo bakterij na solatne liste smo izvedli umetno kontaminacijo sveže in 10 dni stare solate skladiščene pri 5 ± 1 °C, z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Pripravili smo tri sterilne čaše s po 1 l PV in jih 20 minut avtoklavirali pri 121 °C. Vsaki čaši smo aseptično dodali pripravljeno suspenzijo z bakterijami vrste *L. monocytogenes* ter suspenzijo 1 minuto mešali. Gojišču PV smo nato dodali solatne liste, ter jih 1 uro inkubirali pri 25 °C.

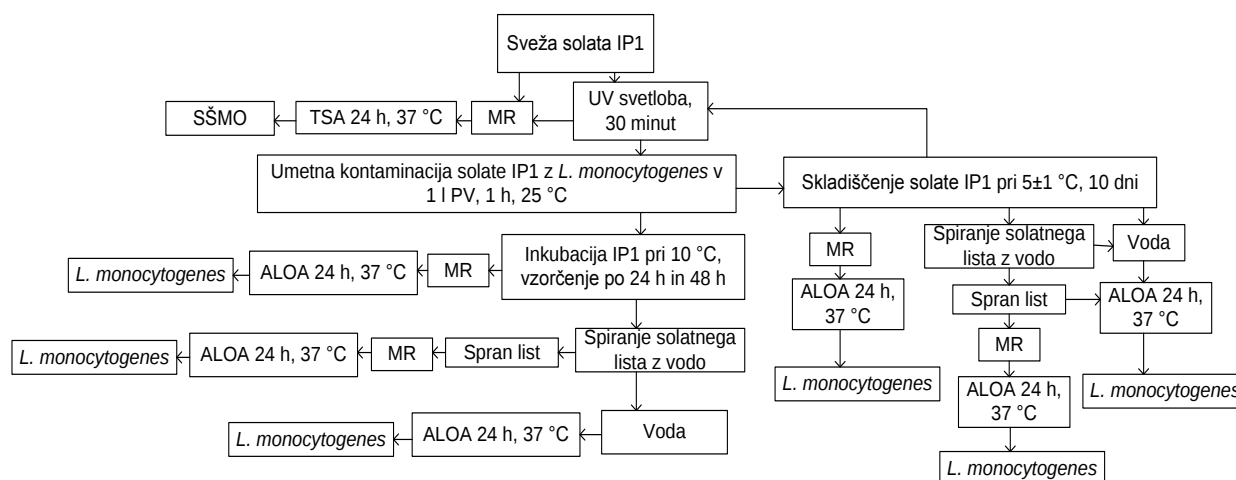
Poleg umetne kontaminacije z bakterijami vrste *L. monocytogenes* smo sveže in 10 dni stare solatne liste, skladiščene pri 5 ± 1 °C, umetno kontaminirali z bakterijami vrste *E. coli*. Pripravili smo 3 sterilne čaše z 1 l peptona, z 1 l PV in z 1 l FR. Vsakemu gojišču smo aseptično dodali pripravljeno bakterijsko suspenzijo, mešali 1 minuto, dodali solatne liste in 1 uro inkubirali pri 25 °C.

3.2.7 Določanje adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes*

Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo kvantificirali v peptonski vodi, v vodi, s katero smo spirali list solate, na solatnem listu po spiranju ter na solatnem listu, ki ni bil spran z destilirano vodo. Po umetni kontaminaciji smo solatne liste vzeli iz gojišča, jih shranili v vrečo, ter jih hranili v hladilniku pri 10 °C za nadaljnje analize. Bakterije vrste *L. monocytogenes* v PV smo kvantificirali z metodo štetja kolonij na trdem gojišču po 1 uri s selektivnim gojiščem ALOA. Gojišča ALOA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po 24 in 48 urah smo kvantificirali bakterije vrste *L. monocytogenes* na listu sveže solate in 10 dni stare solate, ki ni bil spran z destilirano vodo, na listu sveže in 10 dni stare solate, ki je bil spran z vodo, ter v vzorcih vode, s katero smo posamezne liste solate spirali. Vsak list solate smo spirali s 100 ml destilirane vode. Za kvantifikacijo bakterij smo pripravili matično raztopino tako, da smo 10 g vzorca lista solate prenesli v vrečko za homogenizacijo, dodali 90 ml sterilne FR in vsebino 2 minuti homogenizirali v gnetilniku pri srednji hitrosti (ISO 6887-1, 1999). Bakterije smo kvantificirali z metodo štetja kolonij na trdem gojišču ALOA. Gojišča smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Poleg adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* smo kvantificirali še število aerobnih mezofilnih bakterij na sveži in 10 dni stari solati skladiščeni pri 5 ± 1 °C z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TSA. Gojišče TSA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Kvantifikacijo števila aerobnih mezofilnih bakterij na sveži in 10 dni stari solati smo izvedli pred in po tretiranju z UV-svetlobo. Za kvantifikacijo števila aerobnih mezofilnih bakterij smo ravno tako pripravili matično raztopino (slika 3).

Po izboru parametrov za določanje bakterijske adhezije, smo izvedli umetno kontaminacijo solatnih listov sveže solate z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Kvantificirali smo

bakterije vrste *L. monocytogenes* na solatnih listih ter v samem gojišču PV po 1 urni inkubaciji pri 25 °C z metodo štetja kolonij na trdem gojišču ALOA. Gojišča ALOA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. V tem poskusu solatnih listov nismo spirali z vodo. 10 g solate smo dali v vrečko za homogenizacijo, dodali 90 ml FR, ter z gnetilnikom pripravili matično raztopino (ISO 6887-1, 1999). Po 1 urni inkubaciji pri 25 °C, 24 in 48 urnem skladiščenju pri 10 °C smo kvantificirali bakterije z metodo štetja kolonij na selektivnem trdem gojišču ALOA. Gojišča ALOA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Kvantifikacijo števila aerobnih mezofilnih bakterij smo z metodo štetja na trdem gojišču TSA določili na sveži solati po tretiranju z UV svetlobo. Gojišče TSA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C (Slika 5).



Slika 3: Kvantifikacija bakterij vrste *L. monocytogenes* pri določanju izbranih parametrov adhezije na sveži in 10 dni stari solati

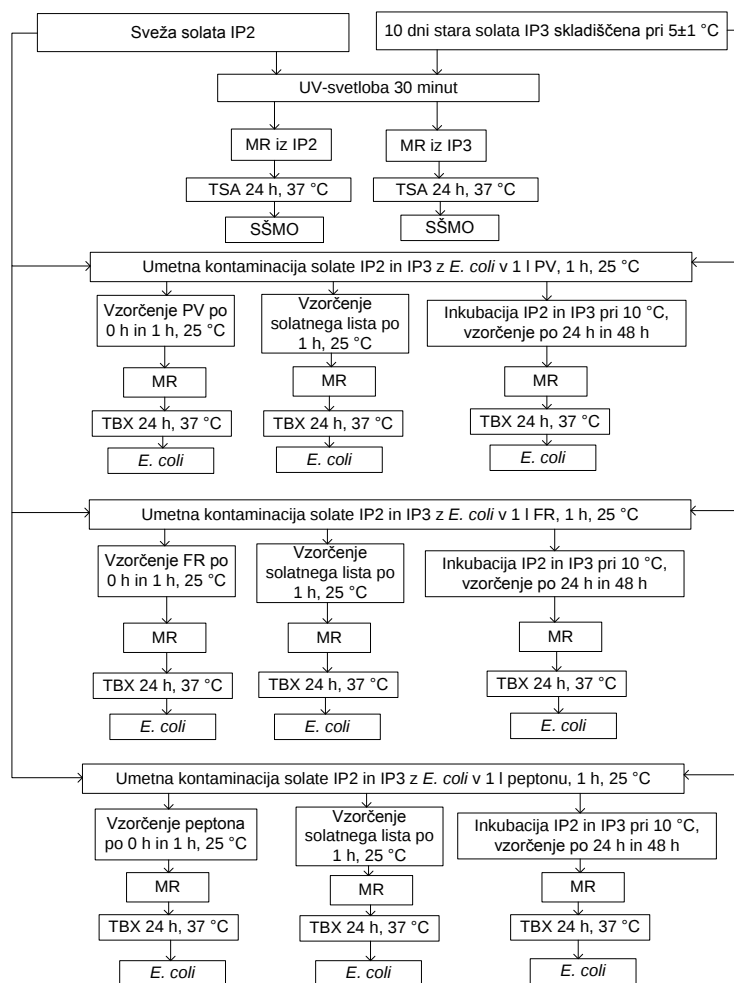
Legenda: IP1: sveža in 10 dni stara solata skladiščena pri 5±1 °C, pridelana na integriran način (n=1); PV: peptonska voda; MR: matična raztopina; SŠMO: skupno število aerobnih mezofilnih bakterij; TSA: gojišče triptični soja bujon; ALOA: selektivno gojišče ALOA agar; n: število vzorcev.

3.2.8 Določanje adhezije bakterij vrste *E. coli*

Bakterije vrste *E. coli* smo kvantificirali na listih sveže in 10 dni stare solate skladiščene pri 5±1 °C. Še preden smo dodali solatne liste v različna gojišča (PV, FR, pepton) smo kvantificirali bakterije vrste *E. coli* v gojiščih takoj po dodatku suspenzije bakterij vrste *E. coli*, z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TBX. Selektivno gojišče TBX smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po 1 urni inkubaciji bakterijskih listov v različnih gojiščih, smo solatne liste vzeli iz gojišča, ter z metodo štetja kolonij na trdem selektivnem gojišču TBX kvantificirali bakterije vrste *E. coli* na solatnih listih in nato še enkrat v posameznem gojišču. Ostale solatne liste smo kvantificirali po 24 in 48 urnem shranjevanju pri 10 °C.

Gojišča TBX smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Ta isti postopek smo ponovili še pri kvantifikaciji bakterij vrste *E. coli* na listih 10 dni stare solate, skladiščenih pri 5±1 °C. Poleg

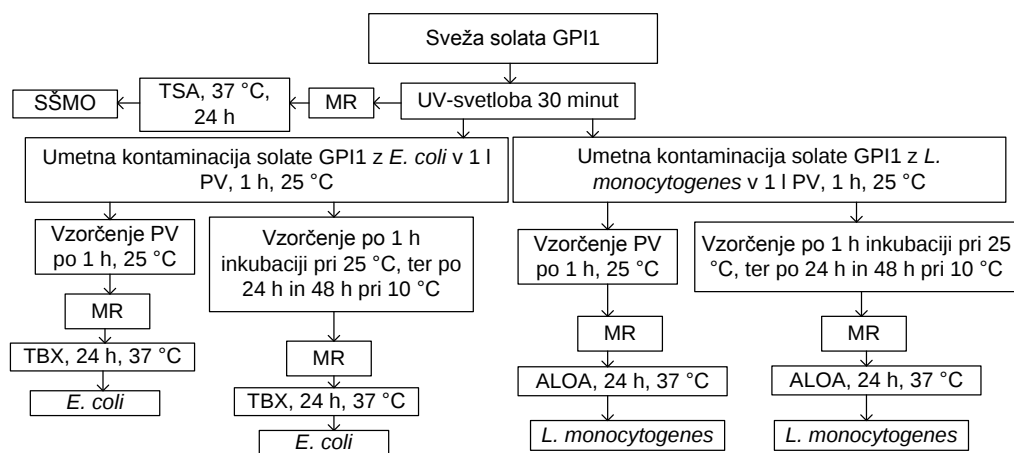
adhezije bakterij vrste *E. coli* smo kvantificirali še število aerobnih mezofilnih bakterij na sveži in 10 dni stari solati skladiščeni pri 5 ± 1 °C z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TSA. Gojišče TSA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Kvantifikacijo števila aerobnih bakterij na sveži in 10 dni stari solati smo izvedli pred in po tretiranju z UV-svetlobo. Za kvantifikacijo števila aerobnih mezofilnih bakterij smo ravno tako pripravili matično raztopino. Deset gramov vzorca lista solate smo prenesli v vrečko za homogeniziranje, dodali 90 ml sterilne FR in vsebino 2 minuti homogenizirali v gnetilniku pri srednji hitrosti (ISO 6887-1, 1999). Bakterije smo kvantificirali z metodo štetja kolonij na trdem gojišču TBX. Gojišča smo 24 ur inkubirali pri 37 °C (slika 4).



Slika 4: Kvantifikacija bakterij vrste *E. coli* pri določanju izbranih parametrov adhezije na sveži in 10 dni stari solati

Legenda: IP2: sveža solata, pridelana na integriran način (n=1); IP3: 10 dni stara solata skladiščena pri 5 ± 1 °C, pridelana na integriran način (n=1); FR: fiziološka raztopina; PV: peptonska voda; MR: matična raztopina; SŠMO: skupno število aerobnih mezofilnih bakterij; TSA: gojišče triptični soja bujon; TBX: selektivno gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X; n: število vzorcev.

Po izboru parametrov za določanje bakterijske adhezije, smo izvedli umetno kontaminacijo solatnih listov samo sveže solate z bakterijami vrste *E. coli*. Kvantificirali smo bakterije vrste *E. coli* v samem gojišču PV ter na solatnih listih po 1 urni inkubaciji v gojišču PV, z metodo štetja kolonij na trdem selektivnem gojišču TBX. Gojišča TBX smo inkubirali 24 ur pri 37 °C. V tem poskusu solatnih listov nismo spirali z vodo. Deset gramov solate smo dali v vrečko za gnetenje, dodali 90 ml FR, ter z gnetilnikom pripravili matično raztopino (ISO 6887-1, 1999). Po 24 in 48 urah skladiščenja pri 10 °C smo kvantificirali bakterije z metodo štetja kolonij na selektivnem trdem gojišču TBX. Gojišča TBX smo inkubirali 24 ur pri 37 °C. Kvantifikacijo števila aerobnih mezofilnih bakterij smo z metodo štetja na trdem gojišču TSA določili na sveži solati po tretiranju z UV-svetlobo. Gojišče TSA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C (slika 5).



Slika 5: Kvantifikacija bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na sveži solati po optimizaciji izbranih parametrov adhezije bakterij na solato

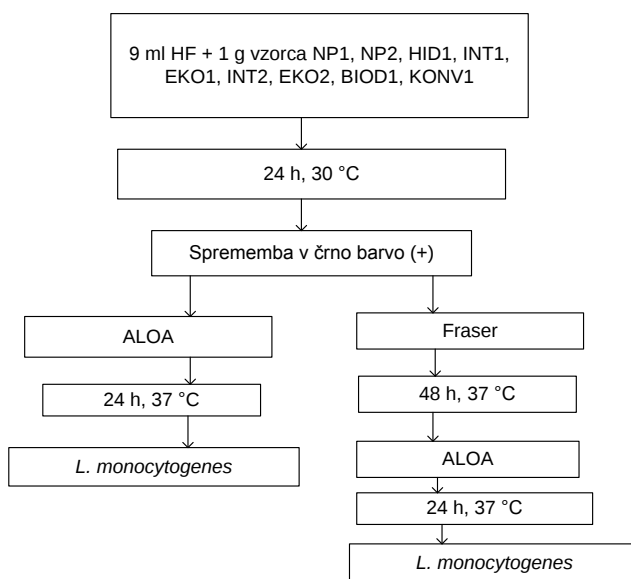
Legenda: GP1: sveža solata, pridelana na integriran način (n=3); PV: peptonska voda; MR: matična raztopina; SŠMO: skupno število aerobnih mezofilnih bakterij; TBX: selektivno gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X; ALOA: selektivno gojišče ALOA agar; n: število vzorcev.

3.2.9 Različni načini pridelave solat

Namen našega eksperimentalnega dela je bil tudi določiti število kvasovk in plesni ter število aerobnih mezofilnih bakterij ter naravno prisotnost bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na solatah pridelanih na različne načine. Število vzorcev ter način pridelave so predstavljeni v preglednici 3. Število aerobnih mezofilnih bakterij smo kvantificirali na solatah z oznakami HID1, EKO1, INT1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3) z metodo štetja na trdem gojišču PCA. Gojišče PCA smo 3 dni inkubirali pri 30 °C (ISO 4833, 1991). Število kvasovk ter plesni smo kvantificirali na solatah z oznako HID1, EKO1, INT1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3) z metodo štetja na trdem gojišču DRBC. Gojišče DRBC smo 3 dni inkubirali pri 25 °C (ISO 7954, 1987). Za kvantifikacijo števila aerobnih mezofilnih bakterij, kvasovk ter plesni smo pripravili matično raztopino (ISO 6887-1, 1999).

3.2.10 Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrste *L. monocytogenes*

Želeli smo ugotoviti, ali imajo vzorci solate NP1, NP2, HID1, INT1, EKO1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3) naravno prisotne bakterije vrste *L. monocytogenes*. Solate z oznako NP1 in NP2 smo kvantificirali sveže in 10 dni stare skladiščene pri 3 ± 1 °C. Za ugotavljanje bakterij vrste *L. monocytogenes* smo pripravili gojišče Half Fraser. V 9 ml HF smo dodali po 1 g solate. Vseh 11 epruvet smo 24 ur inkubirali pri 30 °C. Naslednji dan smo pregledali epruvete in opazovali, če je prišlo do spremembe v črno barvo (ISO 11290-1, 1996). Ker sama določitev spremembe barve ni bila izrazita, smo iz vseh gojišč HF izolirali bakterije na selektivno gojišče ALOA, ter jih 24 ur inkubirali pri 30 °C. Poleg izolacije na gojišču ALOA, smo iz vsake epruvete z HF in 1 g solate vzeli 100 µl suspenzije prenesli v 10 ml gojišča F ter vsebino 2 dni inkubirali pri 37 °C. Po 2 dnevni inkubaciji smo nato iz gojišč F izolirali bakterije na selektivno gojišče ALOA, ter jih 24 ur inkubirali pri 37 °C (slika 6).

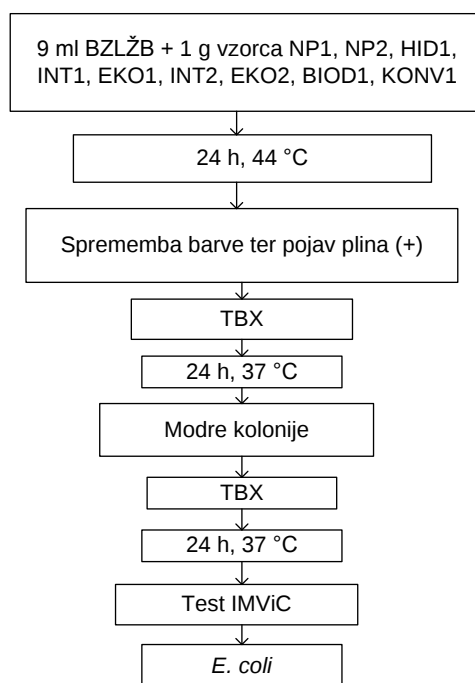


Slika 6: Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* na vzorcih solate pridelanih na različne načine

Legenda: NP1 in NP2: sveža solata pridelana na integriran način (n=10); HID1: sveža solata, pridelana na hidroponski način (n=3); INT1 in INT2: sveža solata, pridelana na integriran način (n=6); EKO1 in EKO2: sveža solata, pridelana na ekološki način (n=6); BIOD1: sveža solata, pridelana na biodinamičen način (n=3); KONV1: sveža solata, pridelana na konvencionalen način (n=3); ALOA: selektivno gojišče ALOA agar; HF: gojišče Half Fraser; Fraser: gojišče Fraser; (+): pozitivna reakcija; n: število vzorcev.

3.2.11 Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrste *E. coli*

Zanimala nas je naravna prisotnost bakterij vrste *E. coli* na solatah NP1, NP2, HID1, INT1, EKO1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3). Solate z oznako NP1 in NP2 smo kvantificirali sveže in 10 dni stare skladiščene pri 10 °C. Po 9 ml gojišča BZLŽB smo odpipetirali v epruvete, ter nato v vsako epruveto dodali 1 g solate in Durhamove cevke. Vseh 11 epruvet smo 24 ur inkubirali pri 44 °C (ISO 4831, 1991). Po enodnevni inkubaciji smo pregledali epruvete. Nekatere epruvete so spremenile barvo, pri nekaterih epruvetah pa se je v Durhamovi cevki pojavil plinski mehurček. Sledila je izolacija s cepilno zanko na gojišče TBX in 24 urna inkubacija pri 37 °C. Domnevno za bakterije vrste *E. coli* značilne kolonije smo še naprej precepili na gojišče TBX in 24 ur inkubirali pri 37 °C. Če so bile plošče preraščene z modrimi kolonijami, smo izvedli test IMViC (Slika 7).



Slika 7: Ugotavljanje naravne prisotnosti bakterij vrste *E. coli* na vzorcih solate pridelanih na različne načine

Legenda: NP1 in NP2: sveža solata, pridelana na integriran način (n=10); HID1: sveža solata, pridelana na hidroponski način (n=3); INT1 in INT2: sveža solata, pridelana na integriran način (n=6); EKO1 in EKO2: sveža solata, pridelana na ekološki način (n=6); BIOD1: sveža solata, pridelana na biodinamičen način (n=3); KONV1: sveža solata, pridelana na konvencionalen način (n=3); BZLŽB: gojišče briljantno zeleni žolčni bujon; TBX: selektivno gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X. (+): pozitivna reakcija; n: število vzorcev.

3.2.12 Vpliv skladiščenja solate

Solatne glave NP1 in NP2 smo 10 dni skladiščili pri 10 °C. Zanimalo nas je, ali skladiščenje solate v teh razmerah vpliva na število aerobnih mezofilnih bakterij, kvasovk ter plesni. Število aerobnih mezofilnih bakterij smo kvantificirali na sveži in 10 dni stari solati NP1 in NP2, skladiščeni pri 3±1 °C (preglednica 3) z metodo štetja na trdem gojišču PCA. Gojišča PCA smo 3 dni inkubirali pri 30 °C (ISO 4833, 1991). Število kvasovk ter plesni smo kvantificirali na sveži in 10 dni stari solati NP1 in NP2 (preglednica 3) z metodo štetja na trdem gojišču DRBC. Gojišča DRBC smo 3 dni inkubirali pri 25 °C (ISO 7954, 1987). Za kvantifikacijo števila aerobnih mezofilnih bakterij in števila kvasovk ter plesni smo pripravili matično raztopino (ISO 6887-1, 1999).

3.2.13 Kvantifikacija mikroorganizmov

Za kvantifikacijo mikroorganizmov (ISO 4833, 1991) z metodo štetja kolonij na trdem gojišču smo uporabili enačbi (1) ali (2).

Če smo imeli plošče, ki so bile števne pri dveh razredčitvah, smo računali po enačbi 1.

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times R} \quad \dots(1)$$

N ... število mikroorganizmov v vzorcu (cfu/g ali cfu/ml)

$\sum C$... je vsota vseh kolonij na števni plošči

n1 ... je število gojišč pri prvi upoštevani razredčitvi

n2... je število gojišč pri drugi upoštevani razredčitvi

R ... je prva razredčitev vzorca, pri kateri smo prešteli kolonije.

Če smo imeli gojišče, ki je bilo števno samo pri eni razredčitvi, smo uporabili enačbo 2.

$$N = \frac{np}{R} \quad \dots (2)$$

N... je število mikroorganizmov v vzorcu (cfu/g ali cfu/ml)

np... je povprečno število kolonij

R ... je razredčitev vzorca, pri kateri smo prešteli kolonije

3.2.14 Vrstični elektronski mikroskop - SEM

Iz solatnih listov GP1 (kristalka, pridelana na integriran način, preglednica 3), ki so bili umetno kontaminirani z bakterijami vrste *L. monocytogenes* ter 24 ur skladiščeni pri 10 °C, smo z luknjačem odvzeli vzorec in ga s pinceto potopili v fiksativ. Vrstična elektronska mikroskopija (mikroskop JEOL JSM-7500 F, JEOL, Japonska) je potekala na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Izvedla jo je dr. Magda Tušek Žnidarič.

3.2.15 Statistična primerjava rezultatov

3.2.15.1 Večvzorčna analiza ene spremenljivke

Značilnost statističnih metod je, da v začetni fazi postavijo domneve, nato jih preverijo in na podlagi rezultatov na koncu domnevo sprejmejo ali zavržejo. Zato moramo v začetni fazi postaviti osnovno domnevo oz. H_1 . Ta domneva trdi, da se vrednosti med seboj statistično razlikujejo. Poleg te domneve je potrebno postaviti nasprotujočo domnevo H_0 , ki trdi, da razlike med vrednostmi ni. Preden preverimo domneve je potrebno postaviti zgornjo mejo tveganja (α), pri kateri zavrnemo H_0 , saj želimo potrditi H_1 . Najpogosteje se uporablja 5 % (0,05), 1% (0,01) in 0,1 % (0,001) stopnjo tveganja. Če je izračunana vrednost tveganja manjša od predpostavljene stopnje tveganja, zavrnemo H_0 in sprejmemo H_1 (Adamič, 1989).

3.2.15.2 Analiza variance

Adamič (1989) navaja, da je ANOVA parametrična metoda, ki trdi, da so porazdelitve vzorcev ene statistične spremenljivke normalne in da se variance statističnih vzorcev med seboj ne razlikujejo. Ničelna domneva trdi, da vsi vzorci izhajajo iz populacije z enakimi povprečji in da varianca med skupinami ni večja od variance znotraj teh skupin. Osnovna domneva pa trdi, da obstajata dva vzorca, katerih povprečji se statistično razlikujeta. Kadar je p vrednost manjša od 0,05, sklepamo, da vzorci pripadajo različnim populacijam, oz. obstaja en par, ki ima različni povprečji. Tako zavrzemo ničelno hipotezo, ki trdi, da razlike ne obstajajo (Adamič, 1989).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

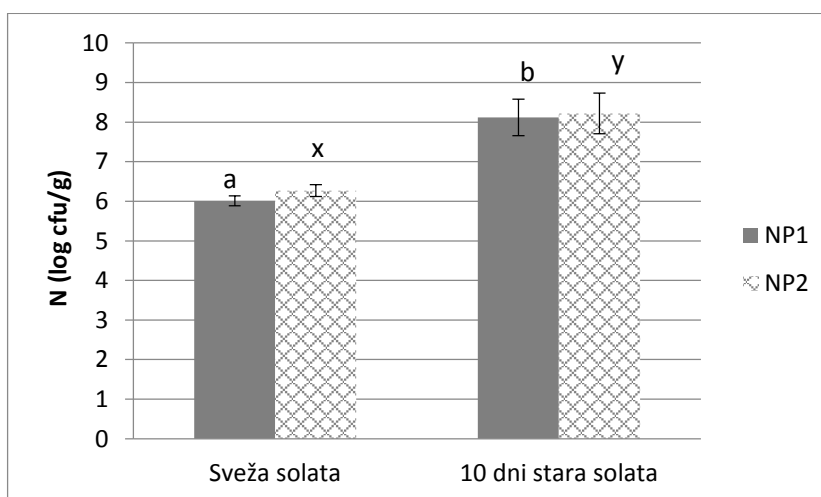
V prvem delu smo preverili, ali različni načini pridelave (integriran, ekološki, hidroponski, konvencionalni in biodinamični način) ter skladiščenje solat (10 dni, 3 ± 1 °C) vplivajo na mikrobiološko kakovost in varnost zelene solate - kristalka (*Lactuca sativa* L.). Zato smo določili število aerobnih mezofilnih bakterij, število kvasovk in plesni ter prisotnost bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* na vseh vzorcih solate (preglednica 3). V drugem delu smo optimizirali izbrane parametre, ki vplivajo na določitev adhezije bakterij na solato ter določili stopnjo adhezije bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* na sveži solati, kot tudi na 10 dni stari solati skladiščeni pri 5 ± 1 °C. Te vzorce solat smo umetno kontaminirali z bakterijami vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* in stopnjo adhezije določili po 1 uri, 24 in 48 urah.

4.1 MIKROBIOLOŠKA KAKOVOST IN VARNOST ZELENE SOLATE

4.1.1 Število aerobnih mezofilnih bakterij

4.1.1.1 Vpliv skladiščenja

Število aerobnih mezofilnih bakterij smo določali na 10 vzorcih zelenih solat NP1 ter NP2 (preglednica 3). Pet vzorcev iz trgovine D (NP1), ter pet vzorcev od proizvajalca E (NP2). Analizirali smo po pet svežih vzorcev ter po pet vzorcev, ki so bili 10 dni skladiščeni pri 3 ± 1 °C (slika 8).



Slika 8: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij na sveži in 10 dni stari solati NP1 in NP2

Legenda: N: povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij; NP1: solata kristalka, integriran način pridelave, trgovina D (n=5); NP2: solata Fancy, integriran način pridelave, proizvajalec E (n=5); a in b ter x in y: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$); a, b: pri solati NP2; x, y: pri solati NP1; n: število vzorcev.

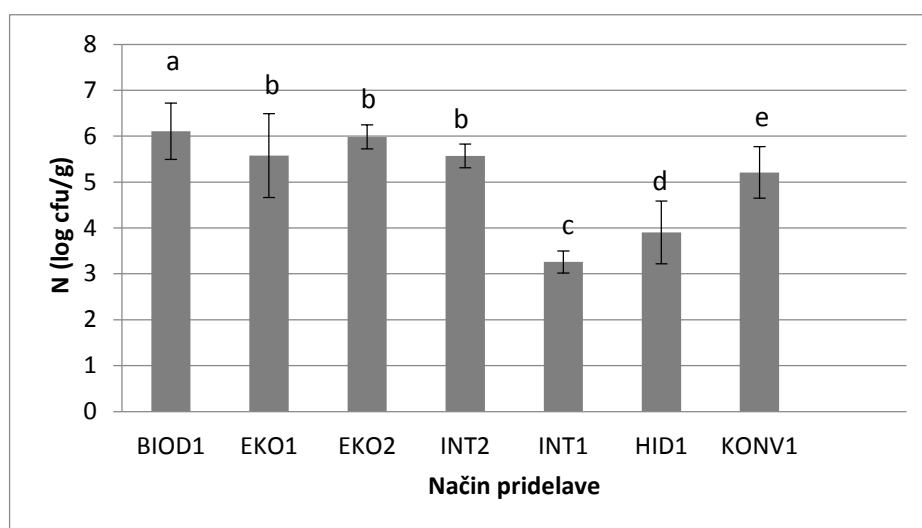
Število aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO) je večje pri 10 dni stari solati, kot pri sveži solati. Razlik med SŠMO na vzorcih svežih solat iz trgovine D (NP1, n=5) in od proizvajalca E (NP2, n=5), ni, ne glede na to, da so bili vzorci tudi različnih sort (kristalka oz. Fancy). Začetno število aerobnih mezofilnih bakterij je bilo pri solatah iz trgovine D (NP1) $6,01 \pm 0,39$ log cfu/g in od proizvajalca E (NP2) $6,27 \pm 0,15$ log cfu/g. Med 10 dnevnim skladiščenjem je število aerobnih mezofilnih bakterij na solatah iz trgovine D (NP1) naraslo na $8,12 \pm 0,39$ log cfu/g na solatah od proizvajalca E (NP2) pa na $8,22 \pm 0,52$ log cfu/g. Deset dnevno skladiščenje zelene solate je vplivalo na povečano število SŠMO pri vzorcih solate iz trgovine D (NP1) in pri vzorcih solate od proizvajalca E (NP2) ($p < 0,05$). Solato smo v času skladiščenja shranjevali pri relativni optimalni vlagi ($> 85\%$), zato po 10 dnevih skladiščenja pri 3 ± 1 °C najverjetneje ni prišlo do izgube vsebnosti vode v solati. To pomeni, da se vrednost a_w solate ni bistveno spremenila in so bile še vedno ugodne razmere za rast grampozitivnih in gramnegativnih bakterij, ki je 1,00 – 0,90. pH zelenjave je med 3,4 in 7,1. Optimalna rast bakterij je pri pH 7, za kvasovke 4,5, ter plesni 3,5. Očitno se pH solate med 10 dnevnim skladiščenjem ni bistveno spremenil, saj je število bakterij v času skladiščenja naraščalo. Optimalna temperatura za skladiščenje solate je 0-2 °C (Agüero in sod., 2011). V našem eksperimentalnem delu smo solato skladiščili pri temperaturi 3 ± 1 °C. Aerobne mezofilne bakterije optimalno rastejo v temperaturnem območju od 37 – 40 °C. Na sliki 8 vidimo, da je v 10 dnevih skladiščenja vseeno prišlo do porasta števila aerobnih mezofilnih bakterij, kar pomeni, da so bile le te bakterije pri 3 ± 1 °C še vedno sposobne rasti in razmnoževanja.

Agüero in sod. (2011) so solato skladiščili 20 dni pri 0-2 °C pri optimalni relativni vlagi (95–98 %). Največjo rast aerobnih mezofilnih bakterij so določili po 10 dnevih skladiščenja (9 log cfu/g). Razlike v številu aerobnih mezofilnih bakterij so opazili tudi v različnih predelih solate. Največje število aerobnih mezofilnih bakterij je bilo na sredini solatne glave. Mi smo naše solate vzorčili na zunanjem, notranjem in srednjem delu solatne glave. V našem eksperimentalnem delu smo ravno tako določili povečano število aerobnih mezofilnih bakterij po 10 dnevih skladiščenja pri 3 ± 1 °C.

Določanje števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov je lahko uporabno kot indikator splošne mikrobiološke kakovosti solate, saj povečano število mikroorganizmov lahko vpliva na rok trajanja solate (Oliviera in sod., 2010).

4.1.1.2 Vpliv načina pridelave

Na 21 vzorcih zelene solate HID1, INT1, EKO1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3) smo določili število aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO). Vsi vzorci solat so bili sorte kristalka, in vsi vzorci so bili sveži. Vse preiskave smo opravili v treh paralelkah. Želeli smo preveriti, ali način pridelave solate (HID: hidroponski, INT: integriran, EKO: ekološki, BIOD: biodinamičen, KONV: konvencionalen) vplivajo na SŠMO. Ker so bile solate pridobljene tudi od različnih proizvajalcev, smo enak način pridelave primerjali tudi med različnima proizvajalcema (npr. EKO1 proizvajalec F, EKO2 proizvajalec G; INT1 proizvajalec E, INT2 proizvajalec G) (slika 9).



Slika 9: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih sveže solate pridelanih na različne načine

Legenda: N: povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij; BIOD1: solata kristalka, biodinamična pridelava, proizvajalec G (n=3); EKO1: solata kristalka, ekološka pridelava, proizvajalec F (n=3); EKO2: solata kristalka, ekološka pridelava, proizvajalec G (n=3); INT2: solata kristalka, integrirana pridelava, proizvajalec G (n=3); INT1: solata kristalka, integrirana pridelava, proizvajalec E (n=3); HID1: solata kristalka, hidroponska pridelava, proizvajalec E (n=3); KONV1: solata kristalka, konvencionalna pridelava, proizvajalec G (n=3); a, b, c, d, e: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$); n: število vzorcev.

Največje število aerobnih mezofilnih bakterij smo pričakovali na solati pridelani na ekološki način (EKO1, EKO2), saj je pri takem načinu pridelave prepovedana uporaba mineralnih gnojil in pesticidov, ki imajo največji vpliv na rast in razmnoževanje bakterij. Najmanjše število aerobnih mezofilnih bakterij smo pričakovali na solati pridelani na konvencionalen način (KONV1).

Iz rezultatov na sliki 9 vidimo, da je največje število aerobnih mezofilnih bakterij, $6,11 \pm 0,61$ log cfu/g, na solati pridelani na biodinamičen način (BIOD1). Princip biodinamičnega načina pridelave je enak ekološkemu načinu pridelave, samo, da se upošteva še vplive lune in kozmičnih sil. Torej naj bi luna in kozmične sile pozitivno vplivale na rast bakterij, zato je povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij na ekološki pridelani solati (EKO2 in EKO1) za 0,05 log cfu/g manjše od števila aerobnih mezofilnih bakterij na solati, pridelana na biodinamičen način (BIOD1). Seveda bi za potrditev te navedbe potrebovali veliko večje število vzorcev različnih sort solate pridobljenih od različnih proizvajalcev. Razlik med povprečnimi števili aerobnih mezofilnih bakterij na solatah pridelanih na ekološki način pri različnih proizvajalcih (EKO1, proizvajalec F; EKO2 proizvajalec G) nismo določili ($p > 0,05$). Solata pridelana na integriran način (INT2, proizvajalec G), je imela večje število aerobnih mezofilnih bakterij ($5,57 \pm 0,25$ log cfu/g) kot pa solata pridelana na konvencionalen način (KONV1) ($5,21 \pm 0,56$ log cfu/g). Integriran način pridelave naj bi bil bolj zdrav način pridelave, saj je uporaba mineralnih gnojil in fitofarmaceutskih sredstev, v primerjavi s konvencionalnim načinom pridelave, nadzorovan. Obstajajo pa razlike med povprečnimi števili aerobnih mezofilnih bakterij na solati, pridelani na integriran način, različnega

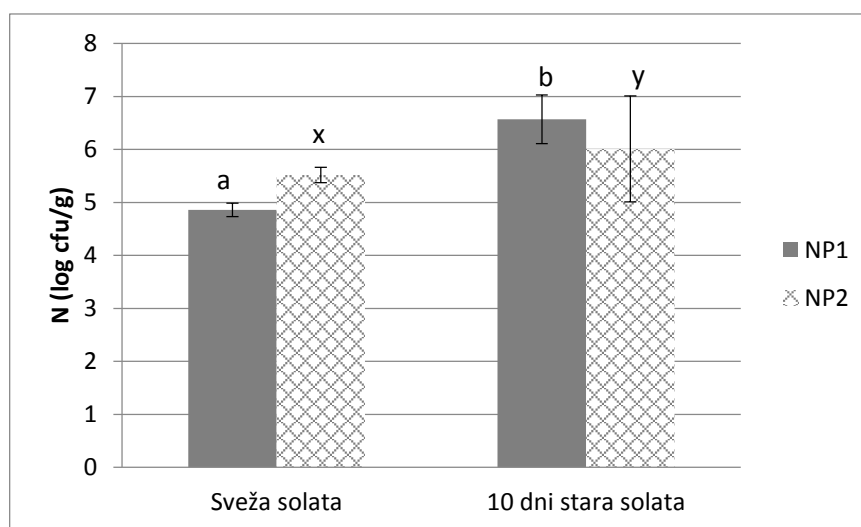
proizvajalca (INT1, proizvajalec E; INT2, proizvajalec G) ($p < 0,05$). Število aerobnih mezofilnih bakterij je bilo na solati INT1 (proizvajalec E) $3,26 \pm 0,24$ log cfu/g, na solati INT2 (proizvajalec G) pa $5,57 \pm 0,25$ log cfu/g. Na sliki 9 vidimo, da je imela solata pridelana na integriran način (INT1) najmanjše povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij. Tako velikih razlik v številu aerobnih mezofilnih bakterij pri solatah pridelanih na integriran način (INT1 in INT2) nismo pričakovali. Vsak proizvajalec uporablja različne vrste ter količine fitofarmaceutskih sredstev ter mineralnih gnojil, posledično je lahko prišlo do tako velike razlike v številu aerobnih mezofilnih bakterij med solato INT1 in solato INT2. Upoštevati moramo še različen kraj pridelave ter druge okoljske dejavnike kot so kakovost vode za zalivanje, sestava zemlje, podnebne razmere, svetloba ter relativna vlaga, senčna ali sončna lega, saj le-ti faktorji vplivajo na naravno mikrobioto solate (Matthews, 2014; Yaron, 2014). Pričakovali smo, da bo število aerobnih mezofilnih bakterij, ki smo jih določili na solati pridelana na hidroponski način (HID1), manjše v primerjavi s solato pridelano na ekološki način (EKO1, EKO2), biodinamičen način (BIOD1) ter integriran način (INT1, INT2). Iz slike 9 vidimo, da je število aerobnih mezofilnih bakterij na solati pridelani na hidroponski način (HID1) večje od solate pridelane na integriran način (INT1) ter manjše od solate pridelane na konvencionalen način (KONV1). S hidroponskim načinom pridelovanja je hranilna vrednost in kontaminacija solate bolje nadzorovana. Vir kontaminacije pri hidroponski pridelavi solate je voda. Sklepali smo, da bo imela solata pridelana na konvencionalen način najmanjše število aerobnih mezofilnih bakterij, vendar so naši rezultati prikazali, da ima najmanjše število aerobnih mezofilnih bakterij solata, pridelana na integriran način ($3,26 \pm 0,24$ log cfu/g). Značilne razlike med povprečnim številom aerobnih mezofilnih bakterij so dobili med solato pridelano na biodinamičen (BIOD1), ekološki (EKO1, EKO2) in integriran (INT2), integriran (INT1), hidroponski (HID1) ter konvencionalni (KONV1) način ($p < 0,05$). Med rezultati skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij pa ni statistično značilnih razlik pri vzorcih solate, pridelanih na ekološki in integriran način (EKO1, EKO2, INT2) ($p > 0,05$).

Selma in sod. (2012) so določili večje število aerobnih mezofilnih bakterij na treh sortah solate, ki so bile pridelane na ekološki način v primerjavi s solato pridelano na hidroponski način. Tudi v našem eksperimentalnem delu smo določili večje število aerobnih bakterij na solati pridelani na ekološki način v primerjavi s solato pridelano na hidroponski način. Oliviera in sod. (2010) so ravno tako določili večje število aerobnih mezofilnih bakterij na solati pridelani na ekološki način ($6,35 \pm 0,69$ log cfu/g), kot na solati pridelani na konvencionalen način ($5,67 \pm 0,80$ log cfu/g).

4.1.2 Število kvasovk ter plesni

4.1.2.1 Vpliv skladiščenja

Poleg števila aerobnih mezofilnih bakterij smo določali na 10 vzorcih zelenih solat NP1 ter NP2 (preglednica 3), še število kvasovk ter plesni. Pet vzorcev iz trgovine D (NP1), ter pet vzorcev od proizvajalca E (NP2). Analizirali smo po pet svežih vzorcev ter po pet vzorcev, ki so bili skladiščeni 10 dni pri 3 ± 1 °C (slika 10).



Slika 10: Povprečno število plesni ter kvasovk na sveži in 10 dni stari solati NP2 in NP1

Legenda: N: povprečno število kvasovk ter plesni; NP1: solata kristalka, integriran način pridelave, trgovina D (n=5); NP2: solata Fancy, integriran način pridelave, proizvajalec E (n=5); a in b ter x in y: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p<0,05$); a, b: pri solati NP1; x, y: pri solati NP2; n: število vzorcev.

Število kvasovk ter plesni na vzorcu sveže solate iz trgovine D (NP1; n=5) je bilo $4,86\pm 0,13$ log cfu/g. Med 10 dnevnim skladiščenjem pri 3 ± 1 °C, se je število kvasovk ter plesni povečalo na $6,57\pm 0,46$ log cfu/g. Pri solati od proizvajalca E (NP2; n=5) je bilo začetno število kvasovk ter plesni $5,52\pm 0,14$ log cfu/g. Med 10 dnevnim skladiščenjem je število kvasovk ter plesni naraslo na $6,02\pm 0,99$. Deset dnevno skladiščenje je vplivalo na povečanje števila kvasovk ter plesni na solati iz trgovine D (NP1) ter od proizvajalca E (NP2). Med 10 dnevnim skladiščenjem je bila solata skladiščena pri optimalni relativni vlagi ($> 85\%$), zato sklepamo, da ni prišlo v času skladiščenja do sprememb v vrednosti a_w solate. Do povečanja števila kvasovk ter plesni je lahko prišlo zaradi ozmotolerantnih kvasovk in plesni, ki rastejo pri vrednosti a_w 0,90-0,75. Med številom kvasovk ter plesni na/v sveži ter 10 dni stari solati iz trgovine D (NP1), obstaja statistično značilna razlika ($p<0,05$). Razlike v številu kvasovk ter plesni na/v sveži in 10 dni stari solati od proizvajalca E (NP2) so statistično značilne ($p<0,05$). Če primerjamo sliki 10 in 8 vidimo, da je na svežih, kot tudi na 10 dni starih solatnih listih skladiščenih pri 3 ± 1 °C, število kvasovk v primerjavi s številom aerobnih

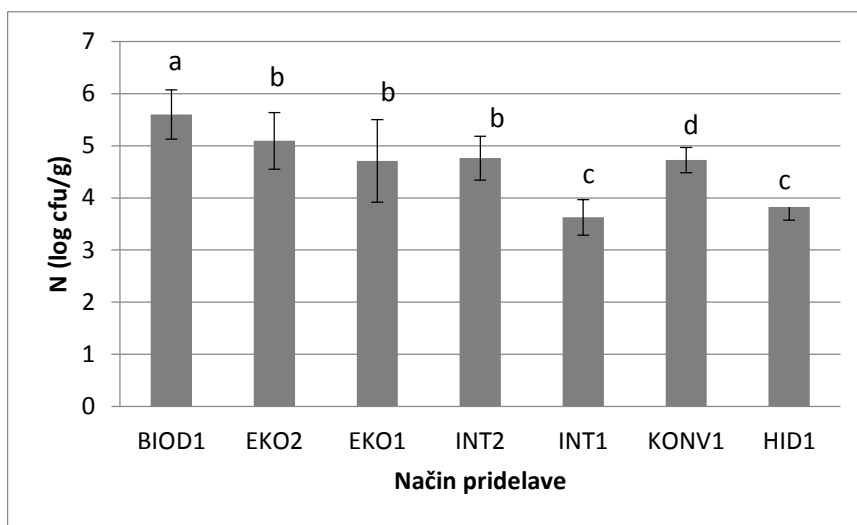
mezofilnih bakterij, manjše. Iz slike 10 vidimo, da so kvasovke ter plesni očitno bile sposobne rasti in razmnoževanja tudi pri 3 ± 1 °C.

Poleg grampozitivnih in gramnegativnih bakterij se v veliki meri na filosferi nahajajo tudi plesni in kvasovke. V veliki meri se nahajajo plesni rodu *Fusarium*, ki med drugim lahko sintetizirajo nevarne toksine (Adamič in sod., 2003). Povečano število kvasovk in plesni pomeni kvar živil, saj le te niso naravna mikrobiota filosfere in so običajno posledica nepravilnega rokovanja z živilom oz. kontaminacije med samo pridelavo in/ali predelavo živila (Rastogi in sod., 2012). Zaenkrat kvasovke ter plesni ne predstavljajo resnih problemov pri vnaprej pripravljenih živilih za uživanje, a vendarle se moramo zavedati, da določene plesni lahko proizvajajo mikotoksine, ki so zdravju škodljivi (Oliviera in sod., 2010).

Agüero in sod. (2011) so solato skladiščili 20 dni pri 0-2 °C pri optimalni relativni vlagi (95–98 %) ter pri nizki relativni vlagi (70-72 %). Število kvasovk in plesni je bilo v začetnem stanju večje na zunanem delu (6,3-6,5 log cfu/g), kot pa v srednjem in notranjem delu solatne glave (5,3-5,5 log cfu/g). Po 6 dnevnem skladiščenju pri optimalni relativni vlagi (95-98 %) je rast plesni in kvasovk sledila značilni rastni krivulji, število je bilo še vedno večje na zunanem delu solatne glave. Število kvasovk in plesni pri nižji relativni vlagi (70-72 %) je bilo večje v primerjavi s skladiščenjem pri optimalni relativni vlagi (95-98 %), vendar razlik v različnih predelih solatne glave ni bilo moč opaziti. Mi smo naše vzorce solat vzorčili v vseh predelih solatne glave. Iz slike 10 vidimo, da se je po 10 dnevih skladiščenja pri 3 ± 1 °C pri optimalni relativni vlagi (> 85 %), število kvasovk ter plesni tudi v našem eksperimentalnem delu povečalo.

4.1.2.2 Vpliv načina pridelave

Na 21 vzorcih zelene solate HID1, INT1, EKO1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3) smo določili število kvasovk ter plesni (SŠKP). Vsi vzorci solat so bili sorte kristalka in vsi vzorci so bili sveži. Vse preiskave smo opravili v treh paralelkah. Želeli smo preveriti, ali način pridelave solate (HID: hidroponski, INT: integriran, EKO: ekološki, BIOD: biodinamičen, KONV: konvencionalen) vplivajo na SŠKP. Ker so bile solate pridobljene od različnih proizvajalcev, smo enak način pridelave primerjali tudi med različnima proizvajalcema (npr. EKO1 proizvajalec F, EKO2 proizvajalec G; INT1 proizvajalec E, INT2 proizvajalec G) (slika 11).



Slika 11: Povprečno število kvasovk ter plesni na vzorcih sveže solate pridelanih na različne načine

Legenda: N: povprečno število kvasovk ter plesni; BIOD1: solata kristalka, biodinamična pridelava, proizvajalec G (n=3); EKO1: solata kristalka, ekološka pridelava, proizvajalec F (n=3); EKO2: solata kristalka, ekološka pridelava, proizvajalec G (n=3); INT2: solata kristalka, integrirana pridelava, proizvajalec G (n=3); INT1: solata kristalka, integrirana pridelava, proizvajalec E (n=3); HID1: solata kristalka, hidroponska pridelava, proizvajalec E (n=3); KONV1: solata kristalka, konvencionalna pridelava, proizvajalec G (n=3); a, b, c, d: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$); n: število vzorcev.

Največje število kvasovk ter plesni smo pričakovali na solati pridelani na ekološki način (EKO1, EKO2), saj je pri takem načinu pridelave prepovedana uporaba mineralnih gnojil in pesticidov, ki imata največji vpliv na rast in razmnoževanje kvasovk ter plesni. Najmanjše število kvasovk ter plesni smo pričakovali na solati pridelani na konvencionalen način (KONV1).

Že pri kvantifikaciji aerobnih mezofilnih bakterij smo določili največje število aerobnih mezofilnih bakterij na solati pridelani na biodinamičen način (BIOD1) in podoben trend je tudi s številom kvasovk ter plesni ($5,59 \pm 0,47$ log cfu/g). Število kvasovk ter plesni na solati pridelani na ekološki način (EKO1, EKO2), je bilo v primerjavi s solato pridelano na biodinamičen način (BIOD1), manjše za 0,67 log cfu/g. Med proizvajalcema F (EKO1) in G (EKO2) ni bilo statističnih značilnih razlik ($p > 0,05$). Že pri določanju skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij smo nakazali možnost, da vpliva na rast in razvoj pri biodinamičnem načinu pridelave najverjetneje še vpliv lune in vesolja. Lahko bi sklepali, da to isto velja tudi za kvasovke ter plesni, vendar bi za tako trditev potrebovali preiskave veliko večjega števila vzorcev solat različnih sort in različnih proizvajalcev. Solati pridelani na integriran način od proizvajalca E (INT1) in proizvajalca G (INT2) imata različno število kvasovk in plesni ($p < 0,05$), in ta rezultat je skladen z rezultati kvantifikacije aerobnih mezofilnih bakterij. Pričakovali smo, da bo število kvasovk ter plesni najmanjše na solati pridelani na konvencionalen način (KONV1), saj je dovoljena uporaba sintetičnih gnojil ter fitofarmaceutskih sredstev. Uporaba le-teh je pri konvencionalnem načinu pridelave manj nadzorovana in omejena, zato smo sklepali, da bo število kvasovk ter plesni najmanjše na

solati pridelani na konvencionalen način (KONV1). Tako kot pri številu aerobnih mezofilnih bakterij je tudi število kvasovk ter plesni najnižje na solati pridelana na integriran način (INT1). Tako velikih razlik v številu kvasovk ter plesni pri solatah pridelanih na integriran način (INT1 in INT2) nismo pričakovali. Vsak proizvajalec uporablja različne vrste ter količine fitofarmacevtskih sredstev ter mineralnih gnojil, to je lahko eden izmed razlogov, zakaj je prišlo do tako velike razlike v številu kvasovk in plesni med INT1 in INT2 solato. Upoštevati moramo še različni kraj pridelave ter druge okoljske dejavnike kot so kakovost vode za zalivanje, sestava zemlje, podnebne razmere, svetloba ter relativna vlaga, ki imajo velik vpliv na naravno mikrobioto solate (Matthews, 2014; Yaron, 2014). Pričakovali smo, da bo število kvasovk ter plesni, ki smo jih določili na solati pridelani na hidroponski način (HID1) manjše v primerjavi s solato pridelano na ekološki način (EKO1, EKO2), biodinamičen način (BIOD1) ter integriran način (INT1, INT2). S hidroponskim načinom pridelovanja je hranilna vrednost in kontaminacija solate bolje nadzorovana. Vir kontaminacije pri hidroponski pridelavi solate je največkrat voda. Naši rezultati (slika 11) so prikazali, da ima najmanjše število kvasovk ter plesni solata, pridelana na integriran način ($3,63 \pm 0,34 \log \text{ cfu/g}$). Razlike v številu kvasovk ter plesni so med ekološko in integrirano (EKO2, EKO1, INT2), biodinamično (BIOD1), integrirano in hidroponsko (INT1, HID1) ter konvencionalno (KONV1) pridelano solato ($p < 0,05$), medtem ko ni razlik med solato pridelano na ekološki in integriran način (EKO1, EKO2, INT2) ter solato pridelano na integriran in hidroponski način (INT1, HID1) ($p > 0,05$).

Oliviera in sod. (2010), so na ekološki pridelani solati tako kot mi, določili večje število kvasovk ter plesni v primerjavi s solato pridelano na konvencionalen način. Selma in sod. (2012) so določili skoraj enako število kvasovk ter plesni na solati pridelani na ekološki ter hidroponski način. V našem eksperimentalnem delu smo določili manjše število kvasovk ter plesni na solati pridelani na hidroponski način v primerjavi s solato pridelano na ekološki način.

4.1.3 Naravna prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*

V desetih vzorcih zelenih solat NP1 (sorta kristalka, trgovina D) in NP2 (sorta Fancy, proizvajalec E) (preglednica 3) smo določali naravno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*. Analizirali smo 10 vzorcev iz trgovine D (NP1) in 10 vzorcev od proizvajalca E (NP2). Po 5 vzorcev solat NP1 in NP2 smo analizirali isti dan kot smo jih vzorčili (sveža solata), nadaljnjih 5 vzorcev solat NP1 in NP2 smo skladiščili 10 dni pri $3 \pm 1^\circ\text{C}$ in jih nato mikrobiološko analizirali. Rezultati so pokazali, da bakterij vrste *L. monocytogenes* ni bilo v nobenem vzorcu (v 1 g). Po izolaciji listerij na gojišču ALOA so zrastle modre kolonije, kar nakazuje, da gre za bakterije rodu *Listeria*, vendar, ker so bile le te brez prosojne cone, ni bila nobena kolonija določena kot domnevno bakterije vrste *L. monocytogenes* in nadaljnje identifikacije nismo opravili.

V 21 vzorcih solat HID1, EKO1, INT1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3), ki so bile pridelane na različne načine, smo ravno tako določali naravno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*. Šest vzorcev je bilo pridelanih na ekološki način (EKO1 in EKO2), 6 vzorcev na integriran način (INT1 in INT2), 3 vzorci na hidroponski način (HID1), 3 vzorci na biodinamičen način (BIOD1) in 3 vzorci na konvencionalen način (KONV1). Analizirali smo sveže solate. Rezultati so pokazali, da v nobenem vzorcu ni bilo bakterij vrste *L. monocytogenes* v 1 g vzorca.

Iz preglednice 1, lahko vidimo, da je prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v živilu nedopustna. Bakterije vrste *L. monocytogenes* niso del naravne mikrobiote solate. Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* na sveži solati je indikator kontaminacije in tako živilo je za potrošnika nesprejemljivo. Oliviera in sod. (2010) v svoji raziskovalni nalogi niso dokazali naravne prisotnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v 72 vzorcih solat pridelanih na ekološki ter konvencionalen način. S tem so prikazali, da je uživanje ekološke solate lahko varno za potrošnika.

4.1.4 Naravna prisotnost bakterij vrste *E. coli*

V desetih vzorcih zelenih solat NP1 (sorta kristalka, trgovina D) in NP2 (sorta Fancy, proizvajalec E) (preglednica 3) smo določili naravno prisotnost bakterij vrste *E. coli*. Na 5 svežih in 5 10 dni starih vzorcih solate proizvajalca E (NP2) (preglednica 3), skladiščenih pri 3 ± 1 °C ni bilo bakterij vrste *E. coli* v 1 g vzorca. Poleg solat proizvajalca E (NP2), smo analizirali še 5 svežih in 5 10 dni starih solat, skladiščenih pri 3 ± 1 °C iz trgovine D (NP1) (preglednica 3). Prisotnost bakterij vrste *E. coli* v 1 g vzorca smo določili pri dveh vzorcih sveže solate NP1 ter pri dveh vzorcih 10 dni stare solate NP1. Za dokaz prisotnosti bakterij vrste *E. coli* smo izvedli test IMViC, ki je bil značilen, kar nakazuje, da so bile v omenjenih vzorcih bakterije vrste *E. coli*.

V 21 vzorcih solat HID1, EKO1, INT1, INT2, EKO2, BIOD1 in KONV1 (preglednica 3), ki so bile pridelane na različne načine, smo poleg bakterij vrste *L. monocytogenes*, ravno tako določali naravno prisotnost bakterij vrste *E. coli*. Šest vzorcev je bilo pridelanih na ekološki način (EKO1 in EKO2), 6 vzorcev na integriran način (INT1 in INT2), 3 vzorci na hidroponski način (HID1), 3 vzorci na biodinamičen način (BIOD1) in 3 vzorci na konvencionalen način (KONV1). Analizirali smo samo sveže solate. Rezultati so prikazali, da v noben vzorcu ni bilo bakterij vrst *L. monocytogenes* ter *E. coli* v 1 g vzorca.

Prisotnost bakterij vrste *E. coli* je indikator fekalne kontaminacije sveže zelenjave. Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila ter Smernice za živila (2008) dopuščajo prisotnost bakterij vrste *E. coli* na sveži zelenjavi v dopustni meri (preglednica 1). V našem eksperimentalnem delu nismo določali števila bakterij vrste *E. coli* na solati, ampak smo preverjali prisotnost v 1 g. Ravno tako nismo določali, ali je šlo za patogene ali ne patogene bakterije vrste *E. coli*. Že samo prisotnost bakterij vrste *E. coli* na vzorcih solate pomeni, da je v določeni fazi pridelave, predelavi, transporta, rokovanja z živilom, prišlo do fekalne kontaminacije. Oliviera in sod. (2010) so v svojem raziskovalnem delu določili

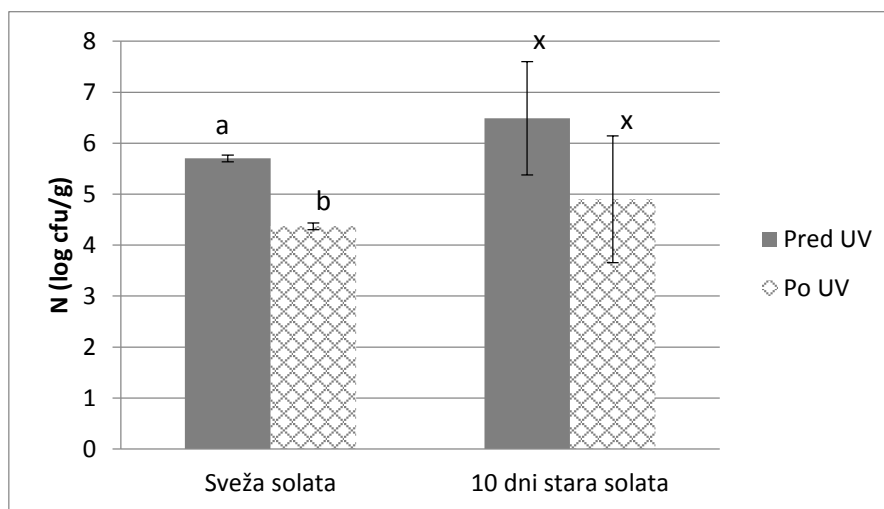
bakterije vrste *E. coli* v 16 vzorcih solate (22,2 %) pridelanih na ekološki način in v 9 vzorcih solate (12,5 %) pridelanih na konvencionalen način. Do kontaminacije z bakterijami vrste *E. coli* je lahko prišlo zaradi ne upoštevanja dobre higienske prakse ali s sporadično kontaminacijo z vodo, ki se uporablja za namakanje ali navlaževanje solate po obiranju. Izkazalo se je, da so bile v tej raziskavi prisotne bakterije vrste *E. coli*, ki niso patogene za človeka.

4.2 STOPNJA ADHEZIJE BAKTERIJSKIH CELIC

V tem delu eksperimentalnega dela nas je zanimala stopnja adhezije bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na svežo in 10 dni staro zeleno solato.

4.2.1 Vpliv tretiranja solate z UV-svetlobo na število aerobnih mezofilnih bakterij na solati

Želeli smo preveriti, ali 30 min-tretiranje z UV-svetlobo vpliva na število aerobnih mezofilnih bakterij na solatnih listih. Zato smo na vzorcih sveže solate IP1, IP2 (preglednica 3) določili število aerobnih mezofilnih bakterij pred in po 30 min tretiranju z UV-svetlobo. Enako preiskavo smo ponovili na 10 dni starih vzorcih solate IP1 in IP3 (preglednica 3), skladiščenih pri 5 ± 1 °C (slika 12).



Slika 12: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih sveže solate in na 10 dni starih vzorcih solate pred in po tretiranju z UV-svetlobo

Legenda: N: povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij; sveža solata: IP1 in IP2 (n=6); 10 dni stara solata: IP1 in IP3 (n=6); n: število vzorcev; a, b; x, y: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$).

Naravna mikrobiota solate je pestra z aerobnimi mezofilnimi bakterijami. Z UV-svetlobo smo zmanjšali število aerobnih mezofilnih bakterij na sveži (IP1, IP2) in 10 dni stari solati (IP1, IP3). Število aerobnih mezofilnih bakterij na sveži solati IP1 in IP2 je bilo pred tretiranjem z UV-svetlobo $5,70 \pm 0,06$ log cfu/g, po tretiranju z UV-svetlobo pa $4,37 \pm 1,24$ log cfu/g, kar pomeni, da se je število aerobnih mezofilnih bakterij zmanjšalo za 1,33 log cfu/g. Na 10 dni stari solati IP1 in IP3, skladiščeni pri 5 ± 1 °C je bilo število aerobnih bakterij pred tretiranjem z UV-svetlobo $6,49 \pm 1,11$ log cfu/g, po tretiranju z UV-svetlobo pa $4,90 \pm 1,24$ log cfu/g. Pri 10 dni stari solati (IP1, IP3) skladiščeni pri 5 ± 1 °C tretiranje z UV-svetlobo ne vpliva na število aerobnih mezofilnih bakterij ($p > 0,05$). Yaron (2014) navaja, da lahko naravna mikrobiota solate vpliva na adhezijo bakterijskih celic na solato. V eksperimentalnem delu smo z uporabo UV-svetlobe želeli zmanjšati število aerobnih mezofilnih bakterij, ki bi lahko posledično vplivale na adhezijo bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*. Ölmez in Temur (2010) so v svoji raziskavi ravno tako uporabili UV-svetlobo za zmanjšanje naravne mikrobiote na solatnih listih.

4.2.2 Optimizacija parametrov, ki vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij na solatni list

Zanimalo nas je, koliko bakterij vrste *L. monocytogenes* se adherira na svežo solato in 10 dni staro solato IP1 (preglednica 3) skladiščeno pri 5 ± 1 °C, ter kolikšno je število bakterij v gojišču PV po 1 urni inkubaciji pri 25 °C po dodatku suspenzije bakterij vrste *L. monocytogenes*. Analize smo izvedli po 1 uri, ter po 24 in 48 urah. V preglednici 5 je prikazana optimizacija parametrov, ki lahko vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na sveži in 10 dni stari solati IP1, skladiščeni pri 5 ± 1 °C.

Preglednica 5: Optimizacija parametrov, ki vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na sveži in 10 dni stari solati IP1, skladiščeni pri 5 ± 1 °C

Čas (h)	Kvantifikacija	Število bakterij N (log cfu/g)		
		Sveža solata	10 dni stara solata	p-vrednost ¹
1	1 l PV	7,49	7,98	/
24	H ₂ O po spiranju	6,78	8,03	>0,05
	List po spiranju	5,84	5,08	
	List brez spiranja	7,05	7,76	
48	H ₂ O po spiranju	7,18	8,79	>0,05
	List po spiranju	6,74	7,36	
	List brez spiranja	7,70	8,76	
	p-vrednost ²	>0,05		

Legenda: IP1: solata sorte kristalka pridelana na integriran način; /: nismo izvedli; PV: peptonska voda; p-vrednost: verjetnost statistično značilne razlike; p-vrednost¹: statistična primerjava med svežo in 10 dni staro solato; p-vrednost²: statistična primerjava med 24 h in 48 h inkubacijo pri 10 °C.

Število bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču PV je bilo pri sveži solati je 7,49 log cfu/ml, pri 10 dni stari solati pa 7,98 log cfu/ml. Pri 10 dni stari solati, smo poleg gojišča PV vzorčili še list solate, brez spiranja, takoj po 1 urni inkubaciji v gojišču PV pri 25 °C. Spiranje solatnih listov odstrani bakterijske celice, ki se niso uspele adherirati na list sveže in 10 dni stare solate. Po 24 urnem skladiščenju sveže solate, smo s spiranjem solatnega lista odstranili 1,2 log cfu/g bakterijskih celic, po 48 urnem skladiščenju pa 0,96 log cfu/g bakterijskih celic. Na listu 10 dni stare solate smo po 24 urnem skladiščenju pri 10 °C s spiranjem z vodo odstranili 2,68 log cfu/g, pri 48 urnem skladiščenju pa 1,4 log cfu/g. Število bakterij vrste *L. monocytogenes* na svežem in 10 dni starem solatnem listu brez spiranja z vodo, narašča. Na listu sveže solate je v 24 urah število bakterij vrste *L. monocytogenes* naraslo za 0,65 log cfu/g, na listu 10 dni stare solate pa za 1,67 log cfu/g. V naslednjih 24 urah je število bakterij vrste *L. monocytogenes* na svežem listu solate naraslo za 0,65 log cfu/g, na listu 10 dni stare solate pa za 1 log cfu/g. Značilnih razlik v stopnji adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na svežih in 10 dni starih solatnih listih po 24 urni ter 48 urni inkubaciji, nismo določili ($p > 0,05$).

Cilj tega poskusa je predvsem optimizacija izbranih parametrov, ki so pomembni za določitev stopnje adhezije bakterijskih celic na solatne liste. Zanimala nas je adhezija bakterij vrste *E. coli* na svežo solato IP2 (preglednica 3) in na 10 dni staro solato IP3 (preglednica 3), skladiščeno pri 5 ± 1 °C. Bakterije vrste *E. coli* smo kvantificirali v posameznem gojišču (FR, PV, pepton) takoj po dodatku suspenzije bakterij vrste *E. coli* (3.2.3) ter po 1 urni inkubaciji pri 25 °C. Stopnjo adhezije bakterij vrste *E. coli* smo določali na solatnih listih po 1 urni inkubaciji pri 25 °C ter po 24 urni in 48 urni inkubaciji pri 10 °C v treh različnih gojiščih (FR, PV, pepton). Solatnih listov v tem delu eksperimentalnega dela nismo spirali s 100 ml destilirane vode. V preglednici 6 so prikazani rezultati optimizacije parametrov, ki lahko vplivajo na stopnjo adhezije bakterij vrste *E. coli* na listu sveže (IP2) ali 10 dni stare solate (IP3) skladiščene pri 5 ± 1 °C.

Preglednica 6: Optimizacija parametrov, ki vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij vrste *E. coli* na listu sveže solate IP2 in na listu 10 dni stare solate IP3, skladiščene pri $5\pm 1^{\circ}\text{C}$

Čas (h)	Gojišče	Število bakterij N (log cfu/g)		
		Sveža solata	10 dni stara solata	p-vrednost ¹
1	FR	6,48	6,79	>0,05
	PV	6,49	6,65	
	Pepton	6,53	7,11	
24	FR	6,48	6,63	>0,05
	PV	6,74	6,72	
	Pepton	7,41	7,15	
48	FR	6,58	6,60	>0,05
	PV	6,76	7,28	
	Pepton	8,43	8,34	
	p-vrednost ²	>0,05		

Legenda: IP2: Sveža solata pridelana na integriran način; IP3: 10 dni stara solata pridelana na integriran način /: preiskave nismo izvedli; PV: peptonska voda; FR: fiziološka raztopina; p-vrednost: verjetnost statistično značilne razlike; p-vrednost¹: statistična primerjava med svežo in 10 dni staro solato; p-vrednost²: statistična primerjava med 24 h in 48 h inkubacijo v treh različnih gojiščih (PV, FR, pepton).

Solatne liste smo 1 uro inkubirali v FR, v PV in v peptonu. Zanimalo nas je, katero gojišče najbolj ustreza bakterijam vrste *E. coli* za adhezijo na solatni list. FR vsebuje KH_2PO_4 . Pepton in PV sta vir ogljika, dušika, vitaminov in mineralov. V FR je bilo število bakterij vrste *E. coli* ob začetku poskusa 7,45 log cfu/ml in je v času 1 ure naraslo za 1,18 cfu/ml. V gojišču PV je znašalo število bakterij vrste *E. coli* 7,81 log cfu/ml, po 1 uri pa 8,82 log cfu/ml. Naraščanje števila bakterij vrste *E. coli* pri 1 uri, je bilo najvišje v gojišču s peptonom. V 1 uri je število bakterij vrste *E. coli* naraslo za 2,24 log cfu/g.

Iz preglednice 6 vidimo, da večjih razlik v številu bakterij vrste *E. coli* na listih sveže solate, ki so se 1 uro inkubirali v FR, v PV in v peptonu, ni. Število adheriranih bakterij vrste *E. coli* na svežem listu solate, ki se je 1 uro inkubiral v FR, je bilo 6,48 log cfu/g, do večjega naraščanja števila bakterij po 24 in 48 urnem skladiščenju ni prišlo. Tudi na listu sveže solate, ki se je 1 uro inkubiral v gojišču PV, ni večjih razlik v številu adheriranih bakterij vrste *E. coli* po različnih časih skladiščenja. Pri listu, ki se je 1 uro inkubiral v peptonu pa je razlika v številu adheriranih bakterij vrste *E. coli* največja. V prvih 24 urah je število adheriranih bakterij vrste *E. coli* naraslo za 0,88 log cfu/g, v naslednjih 24 urah pa za 1,02 log cfu/g. Število adheriranih bakterij vrste *E. coli* na listu 10 dni stare solate, ki se je 1 uro inkubiral v FR, je po različnih časih skladiščenja konstantno. Pri listu, ki se je 1 uro inkubiral v gojišču PV iz preglednice 6 vidimo, da število adheriranih bakterij vrste *E. coli* narašča. Večje število adheriranih bakterij vrste *E. coli* je moč opaziti šele po 48 urnem skladiščenju. Največje razlike v številu adheriranih bakterijskih celic smo opazili pri listu, ki se je 1 uro inkubiral v peptonu. Po 48 urnem skladiščenju je število adheriranih bakterij vrste *E. coli* naraslo za 1,19 log cfu/g. Gojišče pepton ima v primerjavi z gojiščem 0,1 % PV, večjo koncentracijo ogljika, dušika, vitaminov in mineralov. Bakterije vrste *E. coli* so tako imele več hranil za rast in razvoj na solatnem listu po 24 in 48 urnem skladiščenju. Stopnja adhezije

bakterij vrste *E. coli* na svežih in na 10 dni starih solatnih listih, ki so se inkubirali v treh različnih gojiščih (PV, FR in peptonu), je primerljiva ($p > 0,05$).

V članku (Ölmez in Temur, 2010), ki nam je bil v pomoč pri izvedbi eksperimentov so uporabili 0,1 g /100 g PV, zato smo se tudi mi, pri določitvi stopnje adhezije bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* na solati, odločili vnaprej uporabljati gojišče PV.

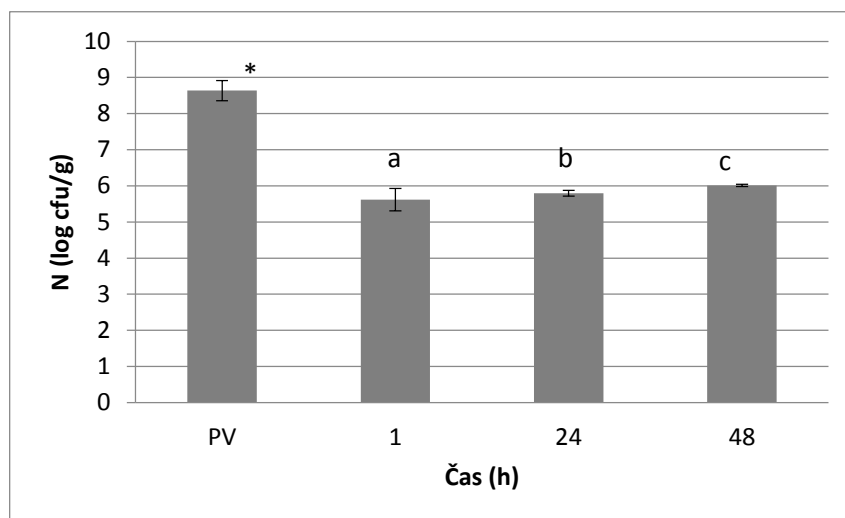
4.2.3 Izbor parametrov za določitev stopnje adhezije bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na solatni list

Glede na pridobljene rezultate prikazane na sliki 12 in v preglednicah 5 in 6, smo določili glavne parametre, ki so pomembni pri določitvi stopnje adhezije bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na solatni list:

- Sveža solata
- 30 minut tretiranje solate z UV-svetlobo
- 1 urna inkubacija solatnih listov z bakterijsko suspenzijo v gojišču PV
- Brez spiranja solatnih listov z destilirano vodo
- Skladiščenje solatnih listov 24 ur in 48 ur pri 10 °C
- Kvantifikacija bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* po 1 urni inkubaciji v gojišču PV pri 25 °C, ter na solatnih listih in nato še na listih solat skladiščenih 24 in 48 ur pri 10 °C.

4.2.4 Adhezija bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na svežo solato

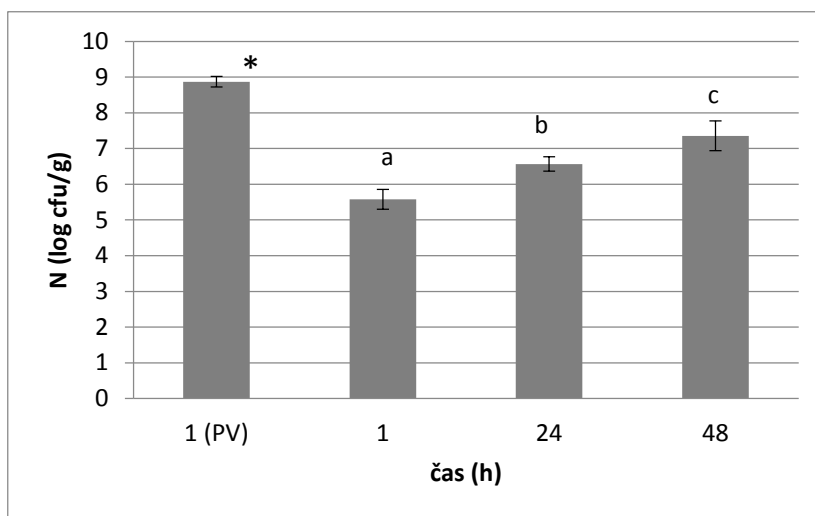
Adhezijo bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* samo določali na vzorcih solat GP1 (preglednica 3) sorte kristalka, pridobljenih na integriran način. Umetno kontaminacijo smo izvedli v gojišču PV (1 uro) s suspenzijama bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*. Bakterije vrst *E. coli* ter *L. monocytogenes* smo kvantificirali v gojišču PV po 1 urni inkubaciji pri 25 °C, na solatnih listih po 1 urni inkubaciji pri 25 °C, ter po 24 in 48 urni inkubaciji solatnih listov pri 10 °C. Začetno število bakterij vrst *L. monocytogenes* v gojišču PV je bilo $8,64 \pm 0,28$ log cfu/g, začetno število bakterij vrst *E. coli* pa $8,87 \pm 0,15$ log cfu/g.



Slika 13: Povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* po 1 h inkubaciji v gojišču PV ter število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* na sveži solati GP1 po 1 h pri 25 °C ter po 24 h in 48 h pri 10 °C

Legenda: N: povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* (n=3); PV: povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* v 0,1 % peptonski vodi ; a, b, c: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$); *: vzorca statistično nismo primerjali; GP1: sveža solata pridelana na integriran način; n: število vzorcev

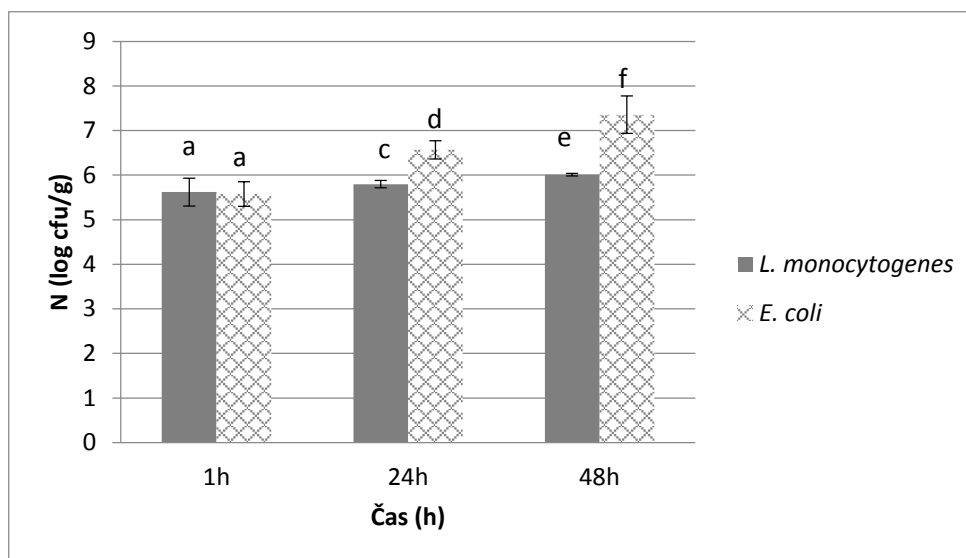
Po 1 urni inkubaciji svežih solatnih listov (GP1) v gojišču PV, se je na solatni list adheriralo 5.62 ± 0.31 log cfu/g bakterij vrste *L. monocytogenes*, kar pomeni, da se približno 3,02 log cfu/ml ni uspelo adherirati. Po 24 in 48 urnem skladiščenju pri 10 °C število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* rahlo narašča. V prvih 24 urah se je število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* povečalo za 0.18 ± 0.08 log cfu/g. Po 48 urnem skladiščenju pri 10 °C je bilo število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* 6.01 ± 0.03 log cfu/g ($p < 0,05$) (slika 13).



Slika 14: Povprečno število bakterij vrste *E. coli* po 1 h inkubaciji v gojišču PV ter število adheriranih bakterij vrste *E. coli* na sveži solati GP1 po 1 h pri 25 °C ter po 24 h in 48 h pri 10 °C

Legenda: N: povprečno število bakterij vrste *E. coli* (n=3); PV: povprečno število bakterij vrste *E. coli* v 0,1 % peptonski vodi; a, b, c: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$); *: vzorca statistično nismo primerjali; GP1: sveža solata pridelana na integriran način; n: število vzorcev

Po 1 urni inkubaciji svežih solatnih listov (GP1) pri 25 °C, se je na list adheriralo $5,58 \pm 0,28$ log cfu/g bakterij vrste *E. coli* kar pomeni, da se približno $3,29$ log cfu/ml ni uspelo adherirati na list sveže solate. S skladiščenjem število adheriranih bakterij vrst *E. coli* narašča. V prvih 24 urah pri 10 °C je število adheriranih bakterij naraslo za $0,99 \pm 0,21$ log cfu/g, v naslednjih 24 urah pa še za $0,79 \pm 0,42$ log cfu/g ($p < 0,05$) (slika 14).



Slika 15: Povprečno število adheriranih bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na sveži solati GP1 po 1 h pri 25 °C ter po 24 h in 48 h pri 10 °C

Legenda: N: povprečno število bakterij vrst *L. monocytogenes* (n=3) in *E. coli* (n=3); a, b, c, d, e, f: rezultati z različno oznako se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$); n: število vzorcev; GP1: sveža solata pridelana na integriran način.

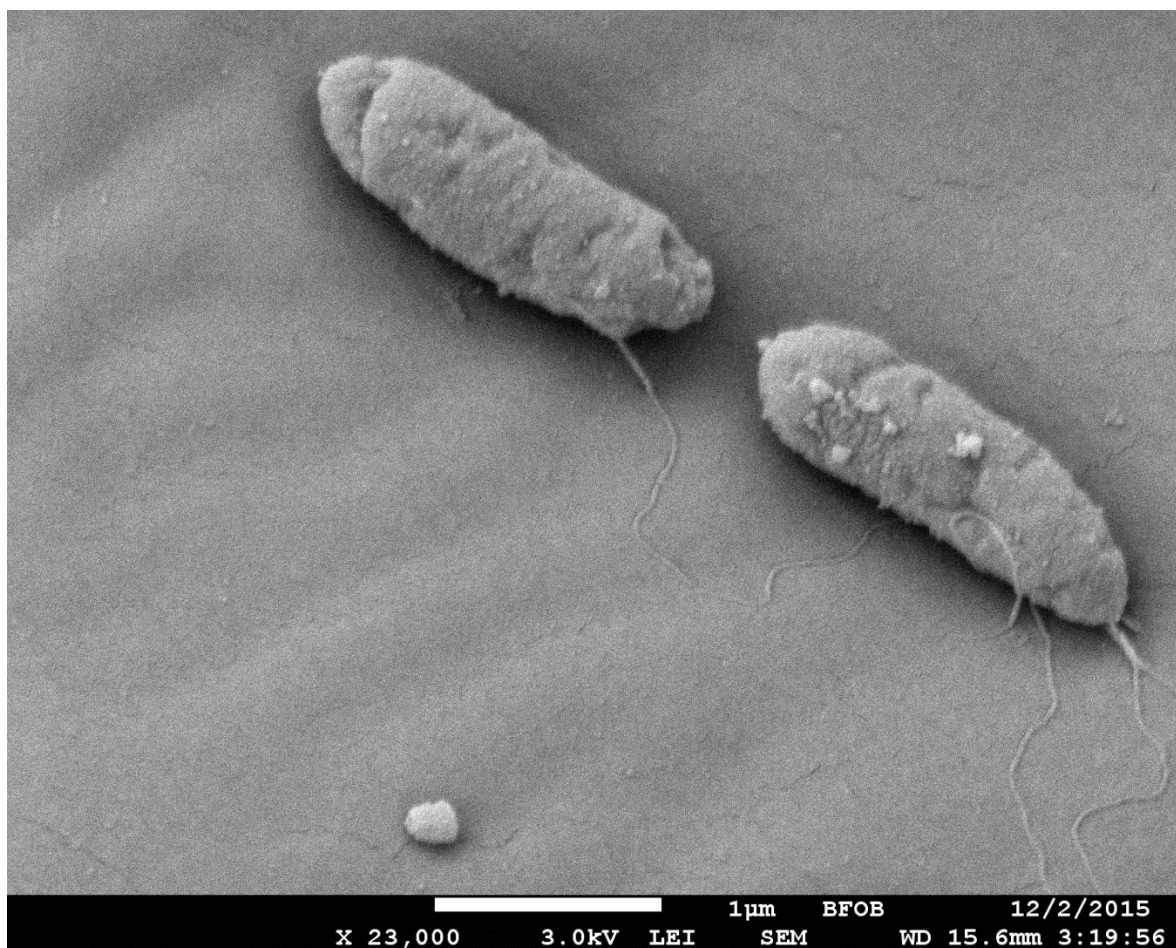
Po 1 urni inkubaciji v gojišču PV pri 25 °C, je bila adhezija bakterij vrste *L. monocytogenes* na listu sveže solate (GP1) za 0,04 log cfu/g večja v primerjavi s številom adheriranih bakterij vrste *E. coli*. Po 24 in 48 urnem skladiščenju iz slike 15 vidimo, da je bilo število adheriranih bakterij vrste *E. coli* pri 24 urnem skladiščenju večje, v primerjavi z bakterijami vrste *L. monocytogenes* za 0,77 log cfu/g, pri 48 urnem skladiščenju pa za 1,34 log cfu/g. Stopnja adhezije bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na sveži solatni list (GP1) se s časom skladiščenja (24 h in 48 h) povečuje ($p < 0,05$) (slika 15).

Dickson in Koohmaraie (1989), Hassan in Frank (2004), Li in McLandsborough (1999) ter Boyer in sod. (2011) navajajo, da je za uspešno adhezijo bakterijskih celic pomembna hidrofilnost. Bolj ko je celica hidrofilna, večje so možnosti za adhezijo na solatni list. *L. monocytogenes* je grampozitivna, hidrofilna bakterija. *E. coli* je gramnegativna bakterija in zaradi odsotnosti O-antigena je lahko manj hidrofilna oz. bolj hidrofobna bakterija. Iz te razlage potem sklepamo, da bi moralo biti število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* na solatnih listih manjše, v primerjavi s številom adheriranih bakterij vrste *E. coli*. Oliviera in sod. (2012) so umetno kontaminirali solato, pridelano na ekološki in konvencionalni način, z bakterijami vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*. Solate so nato skladiščili 8 dni pri 10 °C. Adhezija bakterij vrste *E. coli* je bila tako na ekološki, kot tudi na konvencionalni pridelani solati večja, v primerjavi z adhezijo bakterij vrste *L. monocytogenes*. Take rezultate smo tudi mi dobili pri našem eksperimentalnem delu (slika 15). Kljub hidrofilnosti bakterij vrste *L. monocytogenes*, so se le te v veliki meri adherirale na hidrofoben list solate. Res pa je, da smo solate skladiščili pri 10 °C in pri tej temperaturi bakterije vrste *L. monocytogenes* še vedno rastejo. Ells in Hansen (2006) poročata, da je

stopnja adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na zeljnih listih večja pri 22 °C, kot pri 10 °C. Na adhezijsko sposobnost bakterij vrste *L. monocytogenes* naj bi vplival gen *lcp*, ki omogoča vezavo bakterij vrste *L. monocytogenes* z rastlinsko celično steno (Dongryeoul in sod., 2015).

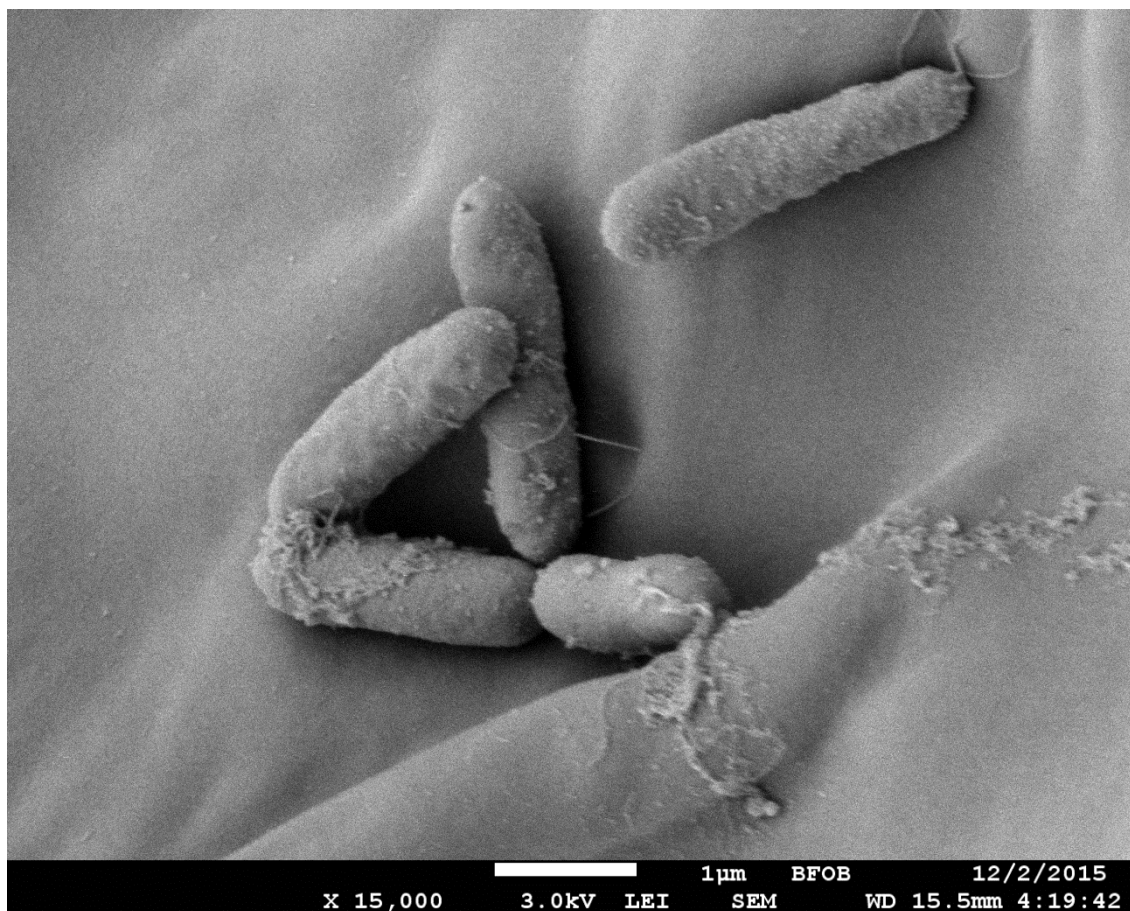
4.2.5 Opazovanje bakterij adheriranih na solatne liste z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo želeli preveriti, ali so se na solatni list (IP1) adherirale bakterije vrste *L. monocytogenes* po umetni kontaminaciji in 24 urni inkubaciji pri 10 °C. Na slikah 16-18 so predstavljeni reprezentativni primeri adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na solatnem listu.



Slika 16: SEM-slika adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na svežem solatnem listu

Na sliki 16 lahko vidimo bakterije vrste *L. monocytogenes* na površini svežega solatnega lista po 24 urni inkubaciji pri 10 °C. Vidimo, da so se bakterije v tem primeru adherirale na površino solatnega lista s pomočjo flagel, ki so značilne za to vrsto bakterij.



Slika 17: SEM-slika EPS bakterij vrste *L. monocytogenes* adheriranih na svežem solatnem listu

Na sliki 17 lahko vidimo EPS na bakterijah vrste *L. monocytogenes* in na svežem solatnem listu po 24 urni inkubaciji pri 10 °C.



Slika 18: SEM-slika adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* v bližini listne reže na svežem solatnem listu

Na sliki 18 vidimo adherirane bakterije vrste *L. monocytogenes* v bližini listne reže. Tudi Ells in Hansen (2006) sta v svoji raziskavi določila, da so se bakterije vrste *L. monocytogenes* adherirale v bližini listne reže.

Glede na to, da smo z mikrobiološko analizo določili visoko stopnjo adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na svežem solatnem listu po 24 urni inkubaciji pri 10 °C, so rezultati SEM prikazali manjšo stopnjo adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes*, vendar kvantifikacija tudi ni bil namen opazovanja solatnih listov s SEM.

Na stopnjo adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na solatni list (vidne na slikah 16-18) je lahko vplivalo veliko dejavnikov. Natančen mehanizem in trdnost adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* na solato sta slabo pojasnjena. Tako je možno, da smo del bakterij v procesu priprave vzorca za opazovanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom sprali.

5 SKLEPI

- Deset dnevno skladiščenje zelene solate pri 3 ± 1 °C vpliva na porast števila aerobnih mezofilnih bakterij ter števila kvasovk in plesni. S skladiščenjem se tako mikrobiološka kakovost solate slabša.
- Različni načini pridelave solate vplivajo na število aerobnih mezofilnih bakterij, ter število kvasovk in plesni. Največje število aerobnih mezofilnih bakterij ter število kvasovk in plesni je bilo na solati pridelani na biodinamičen način, najmanjše pa na solati pridelani na integriran način.
- Bakterij vrste *L. monocytogenes* nismo določili na nobenem vzorcu solate (n=37). Bakterije vrste *E. coli* (v 1 g) smo določili na dveh svežih solatah sorte kristalka, pridelanih na integriran način, iz trgovine D in na dveh 10 dni starih solatah sorte kristalka, pridelanih na integriran način, iz trgovine D in skladiščenih pri 3 ± 1 °C.
- Pri izboru parametrov, ki lahko vplivajo na določitev stopnje adhezije bakterij na solato, smo določili uporabo svežih solatnih listov in 30 min-tretiranje solatnih listov z UV-svetlobo, 1 urno inkubacijo solatnih listov v 0,1 % peptonski vodi z dodano bakterijsko suspenzijo za umetno kontaminacijo.
- Stopnja adhezije bakterij vrste *E. coli* je večja kot pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* po 24 in 48 urni inkubaciji svežih solatnih listov pri 10 °C.

6 POVZETEK

Naravna mikrobiota solate se v različnih fazah pridelave, predelave, transporta, skladiščenja, lahko kontaminira s patogenimi mikroorganizmi, kot so bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*. Taka solata je za potrošnika nesprejemljiva, saj predstavlja resno tveganje za zdravje ljudi. Poleg patogenih mikroorganizmov lahko na mikrobiološko kakovost ter varnost solate vplivajo tudi drugi dejavniki, med katerimi so skladiščenje ter način pridelave solate.

Mikrobiološko kakovost ter varnost solate smo določili s številom aerobnih mezofilnih bakterij, ter s številom kvasovk in plesni na sveži solati, na 10 dni stari solati skladiščeni pri 3 ± 1 °C, ter na solati pridelani na ekološki, biodinamičen, hidroponski, integriran ter konvencionalen način. Hipotezo o povečanju števila aerobnih mezofilnih bakterij, povečanju števila kvasovk in plesni z 10 dnevnim skladiščenjem pri 3 ± 1 °C smo potrdili. Z mikrobiološko analizo smo določili število aerobnih mezofilnih bakterij, število kvasovk in plesni na solati, pridelani na različne načine. Največje število aerobnih mezofilnih bakterij in število kvasovk ter plesni smo določili na solati pridelani na biodinamičen način, najmanjše pa na solati pridelani na integriran način. Pričakovali smo, da bo največje število aerobnih mezofilnih bakterij, in število kvasovk ter plesni na solati pridelana na ekološki način. Predvidevali smo, da bo najmanjše število aerobnih mezofilnih bakterij in število kvasovk ter plesni na solati pridelani na konvencionalen način, zato smo hipotezo zavrnil. Predvidevali smo, da bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* ne bodo prisotne v nobenem vzorcu solat. Žal smo tudi to hipotezo zavrnil, saj smo določili bakterije vrste *E. coli* v 5,4 % vzorcev solat.

V eksperimentalni del smo vključili vzorce svežih solat ter vzorce 10 dni stare solate skladiščene pri 5 ± 1 °C, jih umetno kontaminirali z dodatkom suspenzij bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*, ter določili stopnjo adhezije posameznih bakterij na solatnih listih v odvisnosti od izbranih dejavnikov, kot so spiranje solatnega lista, starost solatnih listov ter uporaba različnih gojišč za umetno kontaminacijo solatnih listov. Z opravljenimi mikrobiološkimi analizami smo prikazali, da imajo bakterije vrste *E. coli* večjo adhezijsko sposobnost od bakterij vrste *L. monocytogenes*, ter da na stopnjo adhezije ne vpliva niti starost solatnih listov niti uporaba različnih gojišč (PV, FR; pepton), kot tudi ne spiranje solatnih listov z vodo. Na podlagi teh ugotovitev smo hipotezo o večji sposobnosti adhezije bakterij vrste *E. coli* sprejeli, hipotezo o vplivu starosti solatnih listov, spiranju le-teh z vodo, ter uporabi različnih gojišč za umetno kontaminacijo pa smo zavrnil. Na stopnjo adhezije bakterijskih celic na solato naj bi vplivala naravna mikrobiota, zato smo izvedli tretiranje solatnih listov z UV-svetlobo (15 minut na vsako stran) z namenom, da zmanjšamo naravno mikrobioto solate. Razlike v številu aerobnih mezofilnih bakterij so bile statistično značilne samo na svežem listu solate.

Zaključimo lahko, da bi bila mikrobiološka kakovost ter varnost solate ob poznavanju mehanizma adhezije bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* lahko boljša. Smiselna bi bila uporaba večjega števila primerljivih vzorcev zelene solate.

7 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 3-42.
- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 195 str.
- Agüero M.V., Ponce A.G., Moreira M.R., Roura S.I. 2011. Lettuce quality loss under conditions that favor the wilting phenomenon. *Postharvest Biology and Technology*, 59: 124-131.
- Babic I., Watada A.E., Buta J.G. 1997. Growth of *Listeria monocytogenes* restricted by native microorganisms and other properties of fresh-cut spinach. *Journal of Food Protection*, 60, 8: 912-917.
- Barta D. J., Tibbitts T.W. 2000. Calcium localization and tipburn development in lettuce leaves during early enlargement. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125: 294-298.
- Benton J. J. 2014. Complete guide for growing plants hydroponically. Boca Raton, Taylor and Francis Group: 203 str.
- Boyer R.R., Sumner S.S., Williams R.C., Kniel K.E., McKinney J.M. 2011. Role of O-antigen on the *Escherichia coli* O157:H7 cells hydrophobicity, charge and ability to attach lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 228-232.
- Briandet R., Leriche V., Carpentier B., Bellon F.M.N. 1999a. Effects of the growth conditions on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 62: 994-998.
- Briandet R., Meylheuc T., Maher C., Bellon F.M.N. 1999b. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5328-5333.
- Carlin F., Nguyen-The C., Morris C.E. 1996. Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *Journal of Food Protection*, 59: 698-703.
- CDC. 2015. People at risk. Atlanta, CDC - Centers for disease control and prevention: 3str. <http://www.cdc.gov/listeria/risk.html> (november 2015)
- Davis C. L., Bransky R. H. 1991. Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3052-3055

- Demeter. 2015. Blagovna znamka Demeter. Komen, Demeter Slovenija: 6 str.
http://www.demeter.si/index.html#načela_biodinamike (oktober 2015)
- Dickson J.S., Koohmaraie M. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 832–836.
- Dobney S., Chiasson D., Lam P., Smith S. P., Snedden W. A. 2009. The calmodulin related calcium sensor CML42 plays a role in related substances. *Journal of Biological Chemistry*, 57: 3052-3055.
- Dongryeoul B., Seo K. S., Zhang T., Wang C. 2015. Characterization of a potential *Listeria monocytogenes* virulence factor associated with attachment to fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 6855-6861.
- Ells T.C., Hansen L. T. 2006. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. attachment to intact and cut cabbage. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 34-42.
- FAO. 2015. AGP – Diversity and performances of horticulture species and cultivars. Rome, Food and Agriculture Organization: 6 str.
<http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/hort-indust-crops/microgardens/speciesandcultivars/en/> (december, 2015)
- Frank J.F. 2001. Microbial attachment to food and food contact surfaces. *Advances in Food and Nutrition Research*, 43: 320-370.
- Gorski L., Palumbo J.D., Mandrell R.E. 2003. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent on temperature and flagellar motility. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 258–266.
- Hassan A.N., Frank J.F. 2004. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 grown in tryptic soy broth and nutrient broth to apple and lettuce surfaces as related to cell hydrophobicity, surface charge, and capsule production. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 103–109.
- Herppich W.B., Mempel H., Geyer M. 1999. Effects of postharvest mechanical and climatic stress on carrot tissue water relations. *Postharvest Biology and Technology*, 16: 43–49.
- Hladnik J., Vodnik D. 2007. Regulacija prevodnosti listnih rež. *Acta agriculturae Slovenica*, 89, 1: 147-157.
- Hunter P. J., Hand P., Pink D., Whipps J. M., Bending G. D. 2010. Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca* species) phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 8117-8125.
- ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Lysteria monocytogenes*. 1996: 16 str.

- ISO 4831. Microbiology – General guidance for the enumeration of coliform – most probable number technique. 1991: 11 str.
- ISO 4833. Microbiology – General guidance for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C. 1991: 4 str.
- ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. 1999: 5 str.
- ISO 7954. Microbiology – General guidance for the enumeration of yeast and moulds – Colony count technique at 25 °C. 1987: 3 str.
- Kinkel, L. L. 1997. Microbial population dynamics on leaves. Annual Review of Phytopathology, 35: 327-347.
- Krese M. 1989. Hidroponika. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 44 str.
- Kristkova E., Doležalova I., Lebeda A., Vinter V., Novotna A. 2008. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. Horticultural Science (Prague), 35, 3: 113-129.
- Lešić R., Borošić J., Buturac I., Herak-Čustić M., Pljak M., Romić D. 2004. Povrčarstvo, 2. dop. izd. Zagreb, Zrinski: 655 str.
- Li J., McLandsborough L.A. 1999. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. International Journal of Food Microbiology, 53: 185-193.
- Liao C.-H., Fett W.F. 2001. Analysis of native and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. Journal of Food Protection, 64, 8: 1110-1115.
- Lindow S. E., Brandl M. T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology, 69: 1875-1883.
- Mariano R. L., McCarter S. M. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. Microbial Ecology, 26: 47-58.
- Matthews K. R. 2014. Leafy vegetables. V: The produce contamination problem: causes and solutions. 2nd ed. Matthews K.R., Sapers G. M., Gerba C. P. (eds.). Amsterdam, Elsevier/Academic press: 187-201.
- McMahon M.A.S., Wilson I.G. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. International Journal of Food Microbiology, 70, 1-2: 155-162.
- Mew T. W., Mew I. P. C., Huang J. S. 1984. Scanning electron microscopy of virulent and avirulent strains of *Xanthomonas campestris* pv *oryzae* on rice leaves. Phytopathology, 74: 635-641.

- Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 120-138.
- MKGP. 2015a. Ekološko kmetovanje. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 4 str.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/ekolosko_kmetovanje/
(oktober 2015)
- MKGP. 2015b. Ekološka pridelava. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 2 str.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/promocija_lokalne_hrane/lokalno_pridelava_na_zelenjava/nacini_pridelave/ (oktober 2015)
- MKGP. 2015c. Integrirana pridelava. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 2 str.
http://www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/integrirana_pridelava/
(oktober, 2015)
- Moreira M.R., Roura S.I., del Valle C. 2003. Quality of Swiss chard produced by conventional and organic methods. *LWT - Food Science and Technology*, 36: 135–141.
- Oliviera M., Usall J., Vinas I., Anguera M., Gatus F., Abadias M. 2010. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27: 679-684.
- Oliviera M., Vinas I., Anguera M., Abadias M. 2012. Fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of natural background microbiota on conventional and organic lettuce. *Food Control*, 25: 678-683.
- Ölmez H., Temur S.D. 2010. Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 964-970.
- Osvald J., Kogoj-Osvald M. 2003. Integrirano pridelovanje zelenjave. Ljubljana, ČŽD Kmečki glas: 295 str.
- Peel M., Donachie W., Shaw A. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of General Microbiology*, 134: 2171-2178.
- Ponce A., Roura S.I., del Valle C., Fritz R. 2002. Characterization of native microbial population of Swiss chard (*Beta vulgaris*, type cicla). *LWT - Food Science and Technology*, 35: 331–337.
- Poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v letu 2012. 2013. Ljubljana, Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin: 83 str.

- Quintana J. M., Harrison H. C., Palta J. P., Nienhus J., Kmiecik K., Miglioranza E. 2001. Stomatal density and calcium concentration of six snap bean cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 110-114.
- Rastogi G., Sbodio A., Tech J. J., Suslow T. V., Coaker L. G., Leveau J. H. J. 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 6: 1812-1822.
- Roura S.I., Davidovich L.A., del Valle C.E. 2000. Quality loss in minimally processed Swiss chard related to amount of damaged area. *LWT - Food Science and Technology*, 33: 53–59.
- Sattler F., Wistinghausen E. 1995. Kmetovanje po biološko-dinamični metodi. Vrzenec, Društvo za biološko-dinamično gospodarjanje Ajda: 323 str.
- Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E., King S.H., Nicholls E.S., Broome C.V. 1983. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, 308: 203-206.
- Selma M.V., Luna C.M., Martinez-Sanchez A., Tudela J.A., Beltran D., Baixauli C., Gil M.I. 2012. Sensory quality, bioactive constituents and microbiological quality of green and red fresh-cut lettuces (*Lactuca sativa* L.) are influenced by soil and soilless agricultural production systems. *Postharvest Biology and Technology*, 63: 16-24.
- Smernice za izvajanje uredbe komisije (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. 2008. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 50 str.
www.zi.gov.si/fileadmin/zi.gov.si/pageuploads/SMERNICE_ZA_IZVAJANJE_UREDBE_KOMISIJE_O_MIKROBIOLOSKIH_MERILIH_ZA_ZIVILA.doc (november, 2015)
- Smole Možina S., Bem Z. 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V. Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 49-82.
- Stopar D. 2007. Priročnik iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 430 str.
- Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila (Besedilo velja za EGP). 2005. Uradni list Evropske unije, 48, L338: 1-26.
- Van der Linden I., Cottyn B., Uyttendaele M., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Maes M. 2013. Survival of enteric pathogens during butterhead lettuce growth: crop stage, leaf age, and irrigation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 6: 1-7.
- Vatanyoopaisarn S., Nazli A., Dodd C.E., Rees C.E., Waites W.M. 2000. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 860–863.

- Whipps J. M., Hand P., Pink D. A. C., Bending G. D. 2008. Human pathogens and the phyllosphere. *Advances in Applied Microbiology*, 64: 183-221.
- WHO. 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs. WHO meeting report, Microbiological risk assessment 14. Geneva, World Health Organisation: 7-9.
- Yadav R. K. P., Karamanoli K., Vokou D. 2005. Bacterial colonization of the phyllosphere of Mediterranean perennial species as influenced by leaf structural and chemical features. *Microbial Ecology*, 50: 185-196.
- Yaron S. 2014. Microbial attachment and persistence on plants. V: The produce contamination problem: causes and solutions. 2nd ed. Matthews K.R., Sapers G. M., Gerba C. P. (eds.). Amsterdam, Elsevier/Academic press: 21-46.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Barbari Jeršek za izbrano tematiko, za vse nasvete in vodenje pri eksperimentalnem delu, za vso potrpežljivost tekom pisanja naloge ter za strokoven in hiter pregled celotne naloge. Hvala, da ste mi omogočili magistrirati.

Zahvaljujem se prof. dr. Magdi Tušek Žnidarič za pregled vzorcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Hvala tudi recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za vse priskrbljene vzorce za izvedbo eksperimentalnega dela ter za strokoven pregled magistrske naloge.

Hvala Mii Ličen za vso potrpežljivost ter nesebično pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Hvala Lini Burkan Makivić za strokoven pregled magistrske naloge.

Posebna zahvala gre tudi mami in očetu, ki sta mi omogočila študij Prehrane, ter mi tekom študija ves čas stala ob strani in me podpirala.

Hvala tudi svojemu možu za vso podporo, koristne nasvete ter oblikovno pomoč.

Hvala tudi vsem sošolkam in sošolcem za vso podporo, pomoč in nepozabna doživetja med študijem.