

# Mikrobiološke opasnosti u gotovim salatama

---

Jelić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:888877>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-23**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Petra Jelić**

**MIKROBIOLOŠKE OPASNOSTI U GOTOVIM SALATAMA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, siječanj, 2021.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za ekologiju i toksikologiju  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambeno inženjerstvo  
**Nastavni predmet:** Opasnosti vezane uz hranu  
**Tema rada** Mikrobiološke opasnosti u gotovim salatama  
**Mentor:** doc. dr. sc. *Tihana Marček*  
**Komentor:** prof. dr. sc. *Hrvoje Pavlović*

### Mikrobiološke opasnosti u gotovim salatama

*Petra Jelić, 0113139730*

### Sažetak:

Gotove salate su proizvodi spremni za neposrednu potrošnju budući su narezani, oprani, zapakirani i čuvani hlađenjem. Uslijed rezanja biljnog tkiva, bez obzira na pranje, moguć je rast mikroorganizama prisutnih na sirovini ili radnim površinama. Cilj ovog rada jest provjeriti mikrobiološku ispravnost gotovih salata s različitim rokom trajanja, te istražiti kako sastav proizvoda utječe na populaciju mikroorganizama. Uzorci su prikupljeni s maloprodajnih lokacija tijekom veljače i lipnja 2020. godine. U uzorcima je mikrobiološkim metodama određena prisutnost mikroorganizama i parazita metodom sedimentacije i diferencijalnih bojenja. U salatama kojima je istekao rok trajanja, u većim brojevima, detektirani su kvasci, plijesni i enterobakterije te bakterijska vrsta *Staphylococcus aureus*, stoga takve salate nisu sigurne za konzumaciju. Nasuprot tome, bakterije roda *Salmonella*, koliformne i sulfitoreducirajuće klostridije, te paraziti i njihovi životni oblici nisu pronađeni. Međutim, utvrđeno je kako cjelovite salate imaju veći udio spora roda *Alternaria* sp. nego narezane. Nadalje, salate pripremljene od jedne vrste povrća sadrže veći broj spora *Alternaria* sp. od miješanih salata.

**Ključne riječi:** Gotove salate, mikroorganizmi, bakterije, paraziti, povrće

**Rad sadrži:** 47 stranica  
19 slika  
4 tablica  
0 priloga  
45 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. doc. dr. sc. <i>Lidija Dujmović</i>      | Predsjednik   |
| 2. doc. dr. sc. <i>Tihana Marček</i>        | član-mentor   |
| 3. prof. dr. sc. <i>Hrvoje Pavlović</i>     | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | zamjena člana |

**Datum obrane:** 15. veljače 2021.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Applied Chemistry and Ecology  
Sub-department of Ecology and Toxicology  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Course title:** Foodborne hazards  
**Thesis subject:** Microbiological hazards in fresh-cut salads  
**Mentor:** *Tihana Marček*, PhD, assistant prof.  
**Co-mentor:** *Hrvoje Pavlović*, PhD, prof.

### Microbiological Hazards in Fresh-Cut Salads

*Petra Jelić*, 0113139730

#### Summary:

Fresh-cut salads are products which can be used for immediate consumption after cutting, washing and packaging. Despite washing procedure of raw salads, working surfaces can be a substrate for microorganism growth as a result of salads mechanical processing. The aim of this work was to examine the microbiological quality of ready-to-eat salads with different shelf life and to investigate how the composition of the product affects the population of microorganisms. Samples were collected from retail locations during February and June 2020. The presence of microorganisms and parasites in the samples was determined by microbiological methods by sedimentation and differential staining. Yeasts, moulds and enterobacteria, as well as the bacterial specie of *Staphylococcus aureus*, have been detected in salads that have expired, in higher numbers, so such salads are not safe for consumption. On the other hand, bacteria of the genus *Salmonella*, coliform and sulphite-reducing clostridia, and parasites and their life forms were not found. However, the number of *Alternaria* sp. spore was higher in whole leaf salads than in chopped salads. Furthermore, salads which contained only one vegetable type showed more *Alternaria* sp. spores than mixed salads.

**Key words:** "ready-to-eat" salads, microorganisms, bacteria, parasites, vegetables

**Thesis contains:** 47 pages  
19 figures  
4 tables  
0 supplements  
45 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. <i>Lidija Dujmović</i> , PhD, assistant prof. | chair person  |
| 2. <i>Tihana Marček</i> , PhD, assistant prof.   | supervisor    |
| 3. <i>Hrvoje Pavlović</i> , PhD, prof.           | co-supervisor |
| 4. <i>Natalija Velić</i> , PhD, associate prof.  | stand-in      |

**Defense date:** February 15, 2021.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1.	GOTOVE („FRESH-CUT“) SALATE.....	4
2.2.	MIKROBIOLOŠKE OPASNOSTI.....	9
2.2.1.	Enterobakterije.....	9
2.2.2.	Klostridije .....	10
2.2.3.	Plijesni i kvasci .....	12
2.2.4.	<i>Salmonella</i> .....	13
2.2.5.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.3.	KVARENJA GOTOVIH („FRESH-CUT“) SALATA .....	16
2.4.	PARAZITI .....	17
2.4.1.	Učinak klimatskih promjena na pojavnost parazita u hrani.....	18
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1.	ZADATAK.....	21
3.2.	MATERIJAL I METODE .....	21
3.2.1.	Prikupljanje uzoraka.....	21
3.2.2.	Priprema uzoraka za mikrobiološke analize i pregled na parazite .....	21
3.2.3.	Mikrobiološke analize .....	24
3.2.4.	Pretraga na parazite .....	26
3.2.5.	Obrada rezultata.....	26
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	27
5.	ZAKLJUČAK .....	38
6.	LITERATURA .....	40

## **1. UVOD**

Gotove salate su minimalno procesirani proizvodi jer njihova proizvodnja obuhvaća uglavnom procese pranja, rezanja, guljenja i sl., te se na kraju procesa pakiraju u ambalažu koja im osigurava dulje vrijeme skladištenja i čuvanja na rashladnim policama trgovačkih centara. Na ovaj način se zadržava njihov bogat nutritivni sastav i svježina samog proizvoda (Caradonna i sur., 2017). Iz tog razloga je potražnja, a samim time i proizvodnja, porasla u zadnjih nekoliko godina (Garreth, 2002).

Budući se radi o namirnicama koje se konzumiraju sirove, poput voća i povrća, češća je pojava bolesti koje se prenose hranom. Uglavnom se radi o parazitskim i bakterijskim uzročnicima bolesti kojima se salate najčešće mogu kontaminirati prilikom primarne proizvodnje, prerade, skladištenja ili transporta. Uzročnici bolesti se mogu nalaziti u vodi za navodnjavanje biljaka ili stajskom gnojivu, također moguća je kontaminacija tijekom transporta sirovina ili neprimjerenog ručnog branja uroda (Garreth, 2002). Najčešći bakterijski uzročnici bolesti koje se mogu pronaći u gotovim salatama su enterobakterije (*Salmonella*), klostridije, *Staphylococcus aureus*, te ponekad kvasci i plijesni.

Bolesti koje se prenose hranom, osim što ugrožavaju ljudsko zdravlje, negativno utječu i na poslovanja industrije i njihova tržišta, stoga je svrha ovog istraživanja utvrditi prisutnost plijesni, kvasaca, koliformnih i sulfitoreducirajućih klostridija i bakterija roda *Salmonella*, kao i prisutnost bioloških opasnosti – životnih oblika parazita, u uzorcima gotovih salata.

Brojni paraziti razvili su niz adaptivnih prilagodbi na klimatske promjene što povećava šansu za preživljavanje čime se povećava zastupljenost parazitoza. Također, neprimjereni održavanje sanitacijskih čvorova i izvora pitke vode, kao i nepropisno odlaganje otpadnih voda, uvelike pridonosi pojavi epidemija (Utaaker i Robertson, 2015).

## **2. TEORIJSKI DIO**



## 2.1. GOTOVE („FRESH-CUT“) SALATE

Devedesetih godina proizvodnja gotovih salata dostiže vrhunac u Europi. U međuvremenu se povećala i proizvodnja organskih namirnica, te su takve namirnice postale dostupne svim potrošačima. Moglo ih se konzumirati u restoranima ili su se prodavale u supermarketima (Garreth, 2002). Prvenstveno su salate stekle popularnost zbog njihove svježine, odličnog okusa i minimalno promijenjenog nutritivnog sastava. S obzirom kako se s godinama postepeno ubrzavao način života, potrošači danas preferiraju praktične proizvode koji se mogu konzumirati bilo kada i bilo gdje s naglaskom na tome da se pripremaju jednostavno i brzo. Sve te zahtjeve ispunjavaju gotove salate ili tzv. „ready- to-eat salads“. Nadalje, uvoz raznih proizvoda iz različitih dijelova svijeta nam omogućava konzumiranje svježeg raznovrsnog voća i povrća čak i kad nije njihova sezona dozrijevanja ili koji ne rastu i dozrijevaju u našim područjima.

Prije prerade važno je odabrati i prekontrolirati sirovinu, jer kvaliteta sirovine određuje kvalitetu krajnjeg proizvoda. Prilikom branja povrća potrebno je paziti da se biljno tkivo ne ošteti jer kroz oštećenja mogu prodrijeti mikroorganizmi i ubrzati proces razgradnje i truljenja biljke. Također nije preporučljivo da se povrće za salate navodnjava s irigacijskim i otpadnim vodama ili gnoji sa životinjskim gnojivom. Nadalje, biljku nakon branja treba ohladiti na temperaturu oko 4 °C kako bi se usporili procesi disanja i dozrijevanja tijekom skladištenja prije proizvodnje. Kod odabira sorti biljaka preporučuje se uzgoj onih koje su otporne na bolesti, oštećenja tkiva i ekstremne klimatske promjene. Ostali faktori koji se kontroliraju su cjelokupni izgled povrća i njegova svježina, prisutnost kukaca, primjesa, ostaci pesticida i umjetnih gnojiva (Varoquaux i Mazollier, 2002).

Nakon kontrole sirovina započne prerada. Povrće se podrezuje odnosno skraćuje kako bi se uklonili vanjski suhi ili oštećeni dijelovi biljke koji nisu za konzumaciju. Ovdje je važno koristiti vrlo oštar nož kako bi se izbjeglo enzimsko posmeđivanje koje se manifestira u obliku pogoršanja teksture i promjene organoleptičkih svojstava. Kod zelenog povrća, posmeđivanje predstavlja najveći problem zato što su zelene salate bogate fenolnim tvarima poput klorogenske kiseline i kafeoil vinskih esterom koje su supstrati za polifenol oksidazu. Posmeđivanje možemo odgoditi, neko vrijeme, ispiranjem obrezanog povrća. Na taj način se ispiru biljni sokovi, stoga se koriste stolovi za obrezivanje s vodenim transporterom koji odvodi

obrezanu sirovinu (gore), dok trakasti transporter odovodi otpad nakon obrezivanja sa stola (dolje) (**Slika 1**). Posmeđivanje se može spriječiti i hlađenjem. Budući se radi o osjetljivoj fazi proizvodnje, preferira se ručno rezanje sirovina, ali može se koristiti i automatsko rezanje, pomoću strojeva (Varoquaux i Mazollier, 2002) (**Slika 2**).



**Slika 1** Ručno obrezivanje kupusa

<http://www.tsdesigns.org/>

Obrezano povrće se, potom, usitnjava na manje dijelove. I u ovoj fazi treba voditi računa da se usitnjavanje provodi u vodi ili da se nakon rezanja usitnjeni materijal ispiru pitkom vodom kako bi izbjegli posmeđivanje. Pri tome se najčešće se koristi vodeni rezač (Varoquaux i Mazollier, 2002).



**Slika 2** Automatsko rezanje i ispiranje celera

<https://produceprocessing.net/>

Sljedeća faza u preradi povrća je ispiranje kloriranom vodom, u svrhu dezinfekcije. Na ovaj način se broj mikroorganizama, koji su na sirovine dospjeli prilikom branja ili prethodne prerade, svodi na prihvatljivu razinu. Najčešće korišteni spojevi s klorom su hipoklorit i plinoviti klor, a koncentracija aktivnog klora u otopini bi trebala biti oko 80 ppm. Ovisno o vrsti procesa, koncentracija klorirane otopine se može određivati i mjeriti kontinuirano ili svakih par sati (Varoquaux i Mazollier, 2002). Učinkovitost dezinfekcije klora ovisi o pH vrijednosti klorirane otopine koja bi trebala biti između 6,5 i 7,5. Nizak pH može uzrokovati koroziju procesne opreme, dok visok pH ima manja dezinfekcijska svojstva (Gehring i Kaletunç, 2017).

Danas se nastoji smanjiti primjena klora kod svježih organskih namirnica. Štoviše, u Njemačkoj, Belgiji i Nizozemskoj je zabranjena primjena klora kao dezinficijensa za minimalno procesirane namirnice, dok se u Francuskoj provodi redovito. Kao alternativa kloru može se koristiti ozon, a razmatra se i primjena organskih kiselina, vodikova peroksida, te  $\gamma$  zračenje (Varoquaux i Mazollier, 2002).

Oprane i dezinficirane salate se moraju osušiti u što kraćem vremenu, jer se mikroorganizmi mogu brzo razmnožiti i uzrokovati kvarenje. Sušenje se provodi u tunelskim sušionicima i

centrifugama (**Slika 3 i 4**). Prilikom sušenja u centrifugama mogu se oštetiti biljni materijali, pa se češće koristi sušenje u tunelima.



**Slika 3** Centrifuga za sušenje povrća

[www.fengxiangfoodmachinery.com](http://www.fengxiangfoodmachinery.com)

Kod tunelskog sušenja, prerađena salata se pomoću vibrirajućeg transportera transportira kroz tunel dok istovremeno prolazi i zrak za sušenje. Kako bi se spriječila križna kontaminacija sa mikroorganizmima iz zraka, zrak se filtrira kroz posebne filtere i dodatno dezinficira sa UV zrakama.



**Slika 4** Tunelski sušionik za povrće

[www.virtualmarket.fruitlogistica.de](http://www.virtualmarket.fruitlogistica.de)

Na kraju se proizvod važe, a nakon vaganja pakira u vrećice od polipropilena. U vrećicu se uvodi ugljikov dioksid ili dušik u točno određenim omjerima kako bi se uspostavila atmosfera koja će osigurati dulji rok trajanja i usporiti razvoj kvarenja.

Jedna od mnogih pozitivnih strana gotovih salata je njihov nutritivno vrijedni sastav vitaminima, mineralima i vlaknima. Nasuprot tome, da bi se zadržao takav sastav, one su minimalno prerađivane, a to znači da se korištenjem takvih proizvoda izlažemo raznim opasnostima za zdravlje. Radi se, najčešće, o mikrobiološkim i kemijskim opasnostima te, nešto rjeđe, fizikalnim opasnostima. Primjerice, mikrobiološke opasnosti koje možemo pronaći na povrću su bakterije roda *Salmonella*, *Shigella* i *E. coli* serotip H157:O7 (Hurst, 2002), a od parazitskih praživotinja *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* sp. i *Toxoplasma gondii* (Caradonna i sur., 2017).

Mnogi isti ili slični proizvodi se povlače sa tržišta upravo zbog sumnje ili dokazane prisutnosti gore navedenih bakterija.

## 2.2. MIKROBIOLOŠKE OPASNOSTI

Mikroorganizmi iz tla su prirodno prisutni na svježem voću i povrću. Često ne uzrokuju kvarenje niti predstavljaju prijetnju za ljudsko zdravlje ukoliko se radi o svježem i cijelom, neoštećenom voću ili povrću. S druge strane, takvi proizvodi mogu biti izvor patogena koje uzrokuju bolesti koje se prenose hranom (Habibi i Bahreini, 2012). Međutim, postupcima rezanja, guljenja i usitnjavanja se razaraju biljne stanice i stanični sokovi koji se otpuštaju, predstavljaju hranjivu podlogu za patogene mikroorganizme i uzročnike kvarenja, te se oni ubrzano razmnožavaju. Svojstva patogenih bakterija čija je prisutnost ispitivana u gotovim salatama su navedena u nastavku.

### 2.2.1. Enterobakterije

Porodicu enterobakterija (lat. *Enterobacteriaceae*) sačinjavaju različiti rodovi i vrste, a najvažnije koje se mogu pronaći u svježem povrću su *Cronobacter* sp., *Salmonella enterica*, *Shigella* (*boydii*, *flexneri*, *sonnei* i *dysenteriae*), *Escherichia coli*, *Yersinia* (*enterocolitica*, *pseudotuberculosis*) (Manhique i sur., 2020).

Iako unutar porodice ima puno rodova i vrsta i serotipova, oni posjeduju neka zajednička svojstva. Radi se o aerobnim i fakultativno anaerobnim bakterijama štapićastoga oblika, osjetljive na temperature iznad 60 °C, isušivanje, te niski pH. Gram negativne su, asporogene. Stanovnici su različitih staništa poput biljaka, kukaca, životinja, ljudi, vode, tla, ali mogu kontaminirati svježe namirnice pri uzgoju ili prilikom prerade hrane (Heard, 2002). Enterobakterije uzrokuju kvarenje svježih namirnica poput mlijeka i mliječnih proizvoda, crvenog mesa, mesa peradi, te voća i povrća (Lawley i sur., 2008). Njihova prisutnost na svježem voću i povrću ukazuje na zagađenje fekalijama, tj. činjenicu da su biljke bile navodnjavane s kanalizacijskom vodom ili loše higijenske uvjete prerade, rukovanja, transporta i čuvanja sirovina i gotovih proizvoda. Osim toga, one mogu biti prisutne i na radnim površinama i priboru u pogonu, rukama djelatnika što ukazuje na neodržavanje osobne higijene radnika, ali i nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju pogona i radnih površina.

Enterobakterije su i fakultativni anaerobi, što znači da mogu preživjeti u uvjetima niske koncentracije kisika, a to im omogućava rast i razmnožavanje u uvjetima modificirane

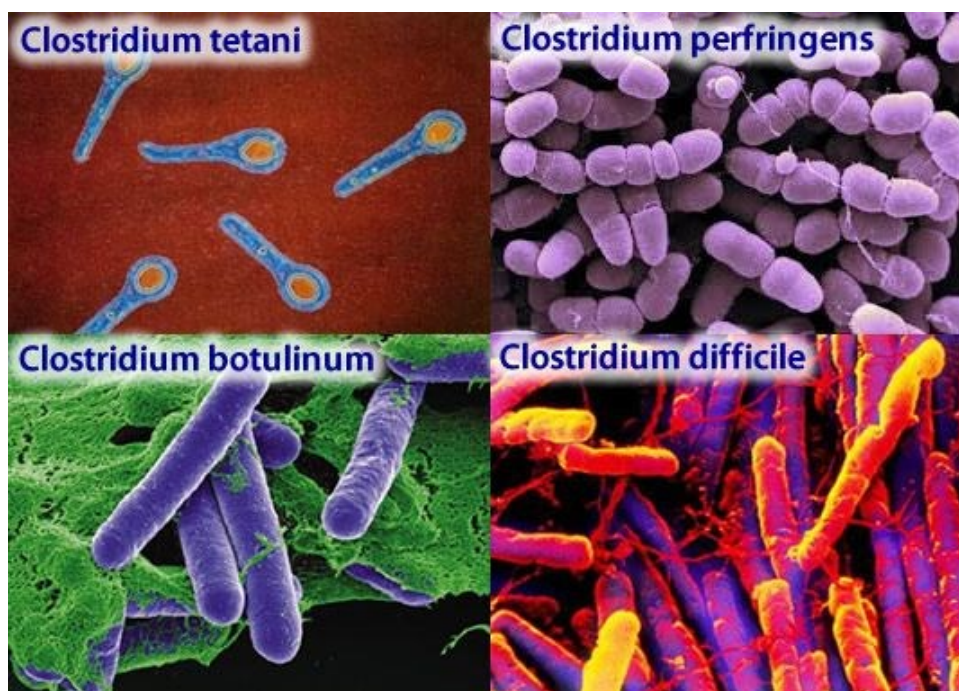
atmosfera u kojima se pakiraju gotove salate. Kao fakultativni anaerobi, neke žive u crijevima sisavaca, pa se još nazivaju i crijevnim ili koliformnim bakterijama. Također, razgrađuju glukozu do kiselina, alkohola i estera procesom fermentacije. Ova dva svojstva im omogućavaju kvarenje gotovih salata (Heard, 2002).

Najvažnije koliformne vrste bakterija iz porodice enterobakterija su *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Enterobacter* (Manhique i sur., 2020). One su, uglavnom, apatogene i žive u probavnom traktu ljudi ili životinja kao komenzali. Njihova prisutnost u svježim namirnicama ili vodi se koristi kao indikator prisutnosti patogenih bakterija, koje izazivaju ozbiljne infekcije gastrointestinalnog trakta, čiji je glavni simptom dijareja. Ostali simptomi su povraćanje, bolovi u trbuhu, groznica, koji nastupaju 12-24h nakon unosa bakterija (Lawley i sur., 2008). Neki mogu dospjeti u krv i odande do ostalih organa u tijelu. Obilne dijareje uzrokovane enterobakterijama nerijetko predstavljaju uzrok smrti kod djece, starijih osoba, te imunokompromitiranih osoba u razvijenim dijelovima svijeta (Keusch i Skirrow, 2005).

### 2.2.2. Klostridije

Porodica klostridija obuhvaća 13 rodova (Wiegel, 2009) unutar kojih se nalazi 168 vrsta (Rainey i sur., 2009). To su obligatorni anaerobi štapićastog oblika. Većina ih je gram pozitivna, iako manji broj njih je gram negativno. Posjeduju sposobnost stvaranja ovalnih ili okruglih endospora (Rainey i sur., 2009). Kako se radi o velikom broju vrsta iz ove porodice bakterija, njihova staništa se razlikuju. Osim u hrani, možemo ih pronaći u fecesu, stajskom gnojivu, kanalizacijskom mulju, pitkoj vodi, morskom sedimentu, slanim jezerima i na različitim dijelovima ljudskog tijela, te, zbog otpornosti endospora na isušivanje i visoke temperature možemo reći da su sveprisutne (Wiegel, 2009).

Za ljudsko zdravlje, važnije vrste ovog roda su *Clostridium difficile* i *Clostridium tetani*, a u preradi i proizvodnji hrane najvažnije su *Clostridium botulinum* i *Clostridium perfringens* (Slika 5). Njihova staništa su tlo, svježe i minimalno procesirano povrće, te svježe sjemenke klice (Heard, 2002).



Slika 5 Najvažnije bakterijske vrste iz porodice *Clostridium*

[www.pinterest.com](http://www.pinterest.com)

*Clostridium botulinum* uzrokuje trovanje botulinom u nedovoljno termički obrađenoj konzerviranoj hrani, dimljenim, vakuumiranim proizvodima i onima koji su pakirani u modificiranoj atmosferi, gdje se navedena bakterija umnožila u velikom broju i proizvela botulin. Dakle, ona dobro raste i razmnožava se u uvjetima bez kisika. Botulin je snažan neurotoksin koji, u malim koncentracijama, može uzrokovati smrt zbog zastoja disanja. Trovanje botulinom se manifestira i u obliku mučnine, povraćanja, proljeva, te paralize živčanog sustava, pri čemu osoba ne može pričati, gutati ili žvakati hranu. Nije zamjećena prisutnost ove bakterije kod povrća koje je skladišteno pri niskim temperaturama hladnjaka, stoga je važno izbjegavati izlaganje povrća visokim temperaturama (Heard, 2002). Dakle, najbolja zaštita od umnožavanja vegetativnih oblika, klijanja spora i trovanja botulinom je prevencija. Sirovine i gotove proizvode odmah nakon pripreme skladištiti pri što nižim temperaturama jer ovu bakteriju, kao i njezine spore, uništava jedino temperatura sterilizacije.

*Clostridium perfringens*, za razliku od botulina, proizvodi enterotoksine koji su manje fatalni za konzumenta, ali ne i manje važni. Enterotoksini su produkti bakterija koji se mogu naći u vodi i hrani, a uzrokuju gastrointestinalne probleme poput proljeva i bolova u trbuhu (Heard,



2002). Simptomi trovanja enterotoksinima *Clostridium perfringens* nastupaju već nakon par sati od unosa kontaminirane hrane i traju od 12-24h. Posljedice mogu biti pogubne jedino za starije osobe i osobe slabijeg imunološkog sustava (McClane, 2003).

### 2.2.3. Plijesni i kvasci

Plijesni kontaminiraju svježe povrće preko tla, vode za navodnjavanje, gnojiva, preko neprimjerno oprane opreme za njihovu branje. Primjerice *Cladosporium* sp. i *Penicillium* sp. se mogu pronaći u probavnom traktu i koži toplokrvnih životinja (Nwankwo i sur., 2015). Ostali važni rodovi plijesni su *Aspergillus*, *Rhizopus* i *Fusarium*.

Plijesni predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje zbog toga što proizvode mikotoksine. Oni su toksični produkti njihovog metabolizma i mogu, u malim koncentracijama, uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme. Na primjer, daleko najpoznatiji mikotoksin je aflatoksin kojeg proizvodi plijesan - *Aspergillus flavus* (Slika 6). Prisutnost aflatoksina u hrani se strogo kontrolira zbog kancerogenog djelovanja. Mikotoksini u visokim koncentracijama mogu uzrokovati akutne i kronične zdravstvene tegobe unutrašnjih organa, ali imaju i teratogeni i mutageni učinak. Primjenom dobre proizvođačke prakse možemo prevenirati kontaminaciju gotovih salata plijesnima, a samim time i potencijalnim mikotoksinima (Marinelli i sur., 2012).



Slika 6 Plijesan *Aspergillus flavus*

<https://biol421.opened.ca/>

Kvasci su jednostanični organizmi koji pretežito rastu u vlažnim uvjetima, namirnicama bogatim šećerima i solima, stoga uzrokuju kvarenje raznih proizvoda poput sirupa, džemova, marmelada, konzerviranih salata i sl. Za razliku od plijesni i viših gljiva ne proizvode sekundarne toksične metabolite. Također, kvasci su fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji sudjeluju u važnim fermentacijskim procesima kojima se dobivaju alkoholna pića ili kruh. Najvažniji kvasci koji uzrokuju kvarenje hrane su *Zygosaccharomyces*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces* sp., te rod *Candida* koji, osim kvarenja, uzrokuje i infekcije ljudi (Rawat, 2015) (Slika 7).



**Slika 7** Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

<https://fineartamerica.com/>

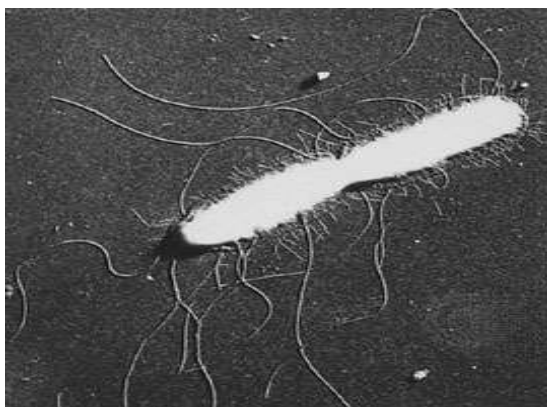
#### **2.2.4. Salmonella**

Bakterije roda *Salmonella* su gram negativne i pripadaju porodici enterobakterija. Iako se salmoneloze povezuju s namirnicama životinjskog podrijetla, u posljednjih nekoliko godina sve su češće epidemije uzrokovane svježim voćem i povrćem koje je kontaminirano salmonelom. Izvori zaraze su, pretežito, zelene lisnate salate na čije se listove bakterije snažno pričvršćuju. Tijekom prerade salate se režu, sjeckaju i sl., pri čemu se otpuštaju njihovi sokovi, koji potpomažu bržem razvitku bakterija, a tako i snažnijem prihvaćanju za biljno tkivo (Koukkidis i sur., 2016).

Salmonela može kontaminirati svježe biljke u bilo kojem trenutku proizvodnje. Međutim, kontaminacija se, najčešće, događa preko zagađene vode za navodnjavanje ili pranje tijekom

prerade, križnom kontaminacijom preko radnika ili radnih površina i pribora (Kroupitski i sur., 2009).

Serotipovi *Salmonella enterica* posjeduju sposobnost stvaranja biofilmova. Pomoću njih one mogu preživjeti na površinama kad su izložene nepovoljnim uvjetima poput procesa prerade i proizvodnje. Stoga se može reći da je taj biofilm svojevrsna prilagodba/obrana na različite nepovoljne životne uvjete u kojima se mogu naći ove bakterije poput isušivanja, prisutnost dezinfekcijskih sredstava ili antibiotika i sl. (Steenackers i sur., 2012). Također mogu preživjeti niske temperature hlađenja i uvjete niskog pH. Dakle, važno je spriječiti kontaminaciju hrane salmonelom jer kada stvore biofilme na svježem povrću jako se teško uklanjaju i ne postoji tretman kojim ih možemo ukloniti u potpunosti (Koukkidis i sur., 2016). Najvažniji serotipovi koje povezujemo s hranom su *Salmonella* Enteritidis (**Slika 8**) i *Salmonella* Typhimurium.



**Slika 8** *Salmonella* Enteritidis

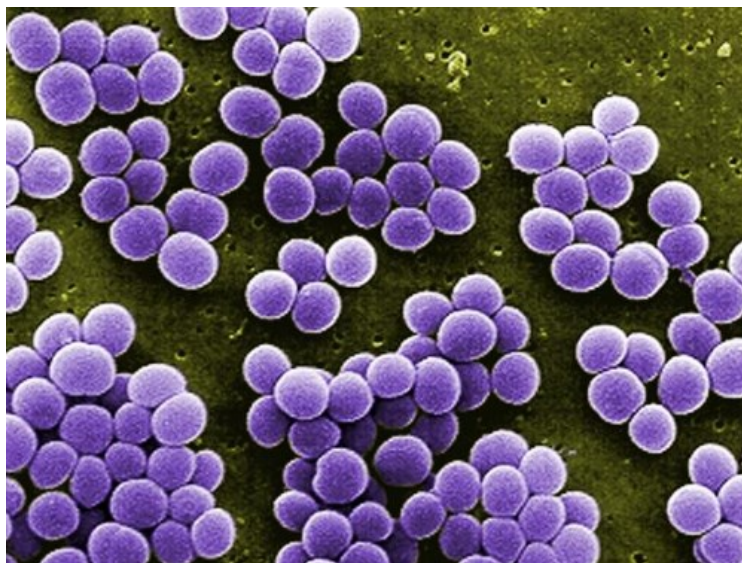
[www.britannica.com](http://www.britannica.com)

### **2.2.5. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* je gram pozitivna bakterija okruglog oblika, te pripada porodici *Staphylococcaceae* (**Slika 9**). Općenito, stafilokoki su otporni na isušivanje, visoke koncentracije soli, te su vrlo otporni na antibiotike (Saifullah i sur., 2018). Najčešće se može pronaći u gotovim jelima koja nisu skladištena pri temperaturi hlađenja, zbog čega se ova bakterija može umnožiti u velikom broju. U velikom broju slučajeva može kontaminirati i svježe

povrće. Također je prirodno prisutna na sluznici nosa i na rukama ljudi, stoga se lako može prenijeti na povrće tijekom procesa prerade (Heard, 2002). Prisutnost stafilokoka na gotovim salatama znači da se prerada odvijala u ne higijenskim uvjetima jer je dokazano kako se prenosi preko ljudskog izvora (Saifullah i sur., 2018).

Proizvode razne toksične spojeve katalaze, hijaluronaze, lipaze, toksine koji oštećuju membrane stanica, kao i enterotoksine koji su najpoznatiji (Eykn, 2005). Enterotoksini su stabilni pri visokim temperaturama, te izazivaju gastroenteritise koje prati povraćanje, mučnina i trbušni bolovi. Jačina navedenih simptoma ovisi o količini prisutnog enterotoksina. Budući su enterotoksini otporni na visoke temperature, naglasak je na prevenciji. Odmah nakon prerade, kuhanja i tijekom transporta treba osigurati nisku temperaturu hlađenja gotove hrane, jer će se tako spriječiti njihovo razmnožavanje i proizvodnja enterotoksina (Kothe i sur., 2019). Nadalje, treba osigurati odgovarajuće higijenske uvjete proizvodnje, pogotovo ako se prerada hrane odvija ručno.



**Slika 9** *Staphylococcus aureus*

[www.infectiousdiseaseadvisor.com](http://www.infectiousdiseaseadvisor.com)

### 2.3. KVARENJA GOTOVIH („FRESH-CUT“) SALATA

Kvarenje hrane može se pojaviti uslijed mehaničkog oštećenja, oštećenja tkiva zbog kukaca, povećane enzimske aktivnosti, te prisutnosti mikroorganizama kvarenja. Takva hrana nije sigurna za konzumaciju jer može biti izvor uzročnika bolesti koje se prenose hranom, ali isto tako nije poželjna zbog promijenjenih organoleptičkih svojstava (Rawat, 2015).

Svježe voće i povrće je lako pokvarljiva hrana s kratkim rokom trajanja. Ono se sastoji od živog tkiva koje, još uvijek, diše, stoga bi trebalo biti svježe i zdravo do trenutka prodaje u trgovinama (Rawat, 2015). Mikroorganizmi kvarenja proizvode različite enzime, koji svojom aktivnošću razgrađuju makromolekule poput polisaharida, proteina i lipida. Posljedica je omekšanje teksture, likvefakcija, gubitak boje, stvaranje neugodnih mirisa, gubitak vitamina, minerala i sl. (Tournas, 2005a).

Kontaminacija voća i povrća mikroorganizmima i parazitima iz okoliša se može dogoditi u bilo kojem trenutku tijekom branja, proizvodnje, prerade, skladištenja ili transporta. Štoviše, ukoliko gotove salate nisu propisno pakirane, u trgovačkim lancima se može dogoditi naknadno ubrzani rast raznih mikroorganizama, od bakterija do plijesni i kvasaca, pogotovo u uvjetima visoke temperature.

Podložnost biljaka razvoju mikroorganizama razlikuje se prema vrstama, točnije njihovim fizikalno-kemijskim procesima, okolišu, klimi, prisutnosti kemijskih kontaminanata poput fungicida i insekticida. U polju važne uloge imaju voda za navodnjavanje ukoliko je porijeklom kanalizacijska, nadalje, gnojiva, pogotovo stajska koja obiluju mikroorganizmima, a možda i parazitima (Shehu i sur., 2014). Također, prisutnost divljih životinja u usjevima, kiša, kukci, prašina, pogoduju kontaminaciji voća i povrća u polju. Tijekom prerade, najčešće iz ljudskog izvora kašljanjem, kihanjem, povraćanjem i sl. mogu kontaminanti završiti na sirovinama.

U procesu proizvodnje se za sprječavanje kvarenja gotovih salata i produljenje roka trajanja, najviše koristi ispiranje povrća sa kloriranim vodom, te tretiranje s ozonom i ugljikovim dioksidom, kao i pakiranje u modificiranoj atmosferi. Važno je i održavanje lanca niskih temperatura od trenutka proizvodnje do polica u trgovačkim lancima. Ostale ne termičke metode koje se mogu koristiti su primjena UV zračenja, visokog tlaka, ultrazvuka, pulsirajućeg

električnog polja, itd. Zračenje se rijetko primjenjuje zbog neodobravanja potrošača, a ostale metode su skupe (Barth i sur., 2009).

## 2.4. PARAZITI

Parazite definiramo kao organizme kojima drugi organizam nazvan domaćin ili domadar, služi kao izvor hrane i staništa. Parazitizam je vrsta odnosa gdje parazit živi i raste u drugom organizmu, najčešće na štetu domaćina, ali ga odmah ne usmrćuje (Doyle, 2003). Domadari, međudomadari i vektori, mogu biti ljudi, životinje, biljke, kukci, te ih može biti i više od jednog, ovisno o životnom ciklusu parazita. Osim za hranu, domadari im služe kao stanište u kojem se mogu razmnožavati. Neki paraziti mogu preživjeti u okolišu bez domadara (tzv. „free-living stage“) tj. domadar im je potreban samo u određenim fazama životnog ciklusa, za razliku od nekih parazita koji su kroz cijeli ciklus vezani uz domaćina (FAO, 2014).

Paraziti se mogu pojaviti u nekoliko životnih oblika poput cisti, oocisti, jajašaca ili ličinki koje mogu, u određenom trenutku, inficirati ljude. Infektivni stadij parazita može putem fecesa završiti u hrani, vodi za navodnjavanje ili vodi za piće. Također, jedan od mogućih puteva infekcije domaćina je i nehigijensko skladištenje hrane, te radnici (FAO, 2014).

Da bi se što bolje prilagodili okolišnim uvjetima te uvjetima unutar domaćina paraziti su, u odnosu na ostale biološke opasnosti, razvili niz prilagodbi koje im omogućavaju preživljavanje. Tako ciste, oociste ili jajašaca stvaraju debelu ovojnicu koja ih štiti od nepovoljnih vanjskih uvjeta sve dok ne pronađu domaćina. Debele ovojnice jajašaca, cisti i oocisti su otporne na probavne sokove i enzime. Kod parazitskih vrsta plošnjaka otpornost na probavne sokove pruža debela skleroproteinska kutikula. U adaptivne mehanizme ubraja se sustav organa za pričvršćivanje, kao što su prijanjaljke i kukice, pomoću kojih se trakavice i metilji drže za stijenku crijeva i drugih organa. Reducirana osjetila, spolni dimorfizam, brojno potomstvo, jednostavan životni ciklus govore o razvoju u visoko specijaliziranom smijeru (Mehlhorn, 2016).

Infekcije parazitima se povezuju s nerazvijenim dijelovima svijeta, stoga su paraziti kao uzročnici bolesti kod ljudi, u odnosu na kemijske i ostale biološke kontaminante, u razvijenim regijama, nažalost često podcijenjeni (FAO, 2014). Drugi razlog njihove podcijenjenosti su kratkotrajne probavne smetnje koje obično kod većine ljudi prođu neopaženo a simptomatska

slika često ovisi o imunološkom stanju pojedinca. Najugroženije skupine za razvoj bolesti su osobe sa slabijim imunološkim sustavom, djeca i starci. Dugoročno, prisutnost parazita u tijelu može izazvati brojne kronične posljedice nepoznate etiologije, a zakašnjelo liječenje može dovesti do razvoja zdravstvenih problema, pa čak i smrti. Unatoč tome, u zadnjih nekoliko godina broj infekcija parazitima raste. Razlog tome je povećan uvoz svježeg voća i povrća iz raznih dijelova svijeta, trend konzumacije sirovih i minimalno procesiranih proizvoda, migranti, putovanja u nerazvijene dijelove svijeta kao i globalno zatopljenje (Doyle, 2003).

#### 2.4.1. Učinak klimatskih promjena na pojavnost parazita u hrani

Klimatske promjene koje pogađaju Zemlju zadnjih nekoliko desetljeća rezultat su globalnog zatopljenja, a podrazumijevaju povećanje temperature, otapanje polarnog leda, porast razine svjetskoga mora, pojavu obilnih kiša te snažnih vjetrova (Wu i sur., 2016). Kako će vremenske prilike utjecati na životne cikluse parazita, ovisi o broju njihovih domaćina, prisutnosti međudomadara i vektora, te prilagođenosti životnih oblika specijaliziranih za preživljavanje izvan domaćina. Ekstremne klimatske promjene mijenjaju staništa što se odražava na brojnost jedinki koji predstavljaju izvor hrane za domaćine koji su ključni u životnom ciklusu parazita. Primjer direktne transmisije parazita o klimatskim uvjetima je ovčji metilj (*Fasciola hepatica*). Kišna, umjereno topla razdoblja s puno vlage, pogoduju povećanju brojnosti populacije puža barnjaka (*Galba truncatula*) koji je međudomadar životnog ciklusa ovčjeg metilja. Porast populacije međudomadara povećava izgled za uspješnu transmisiju ličinačkog stadija metilja kojeg nazivamo metacerkarija (Utaaker i Robertson, 2015). Povećanje brojnosti metacerkarija, znači i veću vjerojatnost ulaska metilja u populaciju domaćina. Slično tomu, veća pojavnost parazitskih praživotinja roda *Giardia* sp. i *Cryptosporidium* sp., uočena je u toplijem dijelu godine (Utaaker i Robertson, 2015). Klimatski faktori mogu utjecati na promjenu sastava autohtone vegetacije kao i na prekomjerno bujanje biljaka i korova koji služe kao zaklon i hrana malim glodavcima. Glodavci predstavljaju vektore za transmisiju trakavica do konačnog domaćina. Tako, porast brojnosti miševa i voluharica značajno pogoduje povećanju populacije lisica. Što može rezultirati povećanim brojem lisica koje mogu biti zaražene ehinokokom (Utaaker i Robertson, 2015). U novije vrijeme zabilježeno je pomicanje granica južnog areala lisičje trakavice (*Echinococcus multilocularis*) iz Slovenije i Mađarske prema Republici

Hrvatskoj (Beck i sur., 2016). S obzirom na trend konzumiranja svježih, minimalno procesiranih namirnica, kao što su svježe voće i povrće, sirovo ili polusirovo meso, marinirani riblji proizvodi i sl. raste rizik zaraze (Erdogrul i Şener, 2005; Robertson i Gjerde, 2001). Najčešći paraziti u mesu i ribi su vrste *Taenia solium*, *Toxoplasma gondii*, *Echinococcus granulosus*, *Opisthorchiidae*, dok povrće i voće može biti izvor vrste *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium* sp., *Giardia* sp., *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus* te *Entamoeba histolytica* (FAO, 2014).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost plijesni, kvasaca, koliformnih bakterija, sulfitoreducirajućih klostridija, te bakterija roda *Salmonella*, kao i prisutnost cista i jajašaca u gotovim salatama.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Prikupljanje uzoraka

Salate su kupljene u trgovačkim centrima na području grada Osijeka. Istraživanje je provedeno na ukupno 40 uzoraka „fresh-cut“ salata. Uzorci su uključivali različite vrste salata poput matovilca, radiča, zelene salate, mrkve i sl.

#### 3.2.2. Priprema uzoraka za mikrobiološke analize i pregled na parazite

U sterilnim uvjetima, odvagano je 60 g uzorka salate u sterilnu vrećicu (Slika 10).



Slika 10 Vaganje uzoraka (vlastita fotografija)

U vrećicu je uliveno 300 mL sterilne fiziološke otopine (0,85 % otopine NaCl) i homogenizirano u stomaheru 60 sekundi (**Slika 11**).



**Slika 11** Priprema ulijevanja fiziološke otopine (vlastita fotografija)

Nakon homogenizacije uzoraka, uzorcima je određena mikrobna populacija, standardnim mikrobiološkim analizama. Vrećice su, potom, ostavljene u konusnom položaju kako bi se sadržaj vrećica sedimentirao 24h na sobnoj temperaturi.

Sutradan su dna vrećica probušena sterilnom iglom i po 10 mL uzorka je sakupljeno u konusnu epruvetu. Između svakog bušenja vrećice iglom, igla je sterilizirana. Zatim su epruvete s uzorcima centrifugirane 10 minuta pri 3500-3700 rpm pri sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja otpipetiran je višak tekućine i oko 2-3 mL taloga je dalje upotrijebljeno za pretragu na parazite (**Slika 12**).



**Slika 12** Uklanjanje viška tekućine pipetom nakon centrifuge (vlastita fotografija)

Preparati za analizu parazita obojeni su „Kinyoun carbol fuchsin“ bojenjem. Za svaki uzorak radila su se dva ponavljanja.

Na središte čiste predmetnice otpipetirano je 10  $\mu$ L uzorka i razmazano mikrobiološkom ušicom, te osušeno na zraku. Nakon sušenja, preparat je fiksiran unošenjem predmetnice u plamen špiritne lampe 10 puta, potom ohlađen.



**Slika 13** Pripremanje uzoraka za bojenje parazita (vlastita fotografija)

Pripremljeni uzorci su obojani karbol fuksinom, pri čemu je fiksirani preparat prekriven bojom 2 minute. Nakon isteka vremena preparat je ispran vodom. Nakon ispiranja vodom, preparat je obezbojen zakiseljenim etanolom, 3-5 sekundi do nestanka crvene boje (www.dalynn.com, 2015). Nakon ispiranja, preparat je obojen metilenskim plavilom, 30 sekundi, ispran vodom, te ostavljen sušenju na zraku. Na kraju su osušeni preparati mikroskopirani objektivom uljne imerzije.

### 3.2.3. Mikrobiološke analize

Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (www.mps.hr), u analiziranim uzorcima svježe narezanih salata su određene sljedeće skupine mikroorganizama:

- Bakterije roda *Salmonella*
- Bakterije vrste *Staphylococcus aureus*
- Enterobakterije
- Sulfitoreducirajuće klostridije, te

- Kvasci i plijesni

### **Bakterije roda *Salmonella***

Bakterije roda *Salmonella* su određene u uzorku izravnim naciepljivanjem inokuluma bez preduzgoja u puferiranoj peptonskoj vodi. Tako se dobije broj stanica u 1 g uzorka (u usporedbi s prisutnost/odsustvo pomoću preduzgoja). U sterilnim uvjetima je pripremljeno osnovno razrjeđenje (60 g usitnjene svježe narezane salate odvagano je u sterilne plastične vrećice za stomaher u koje je uliveno 300 mL sterilne fiziološke otopine). Nakon homogenizacije u stomaheru od 60 sekundi, 0,1 mL inokuluma je (u paralelama) prenesen na krute podloge za prebrojavanje salmonela (XLD agar, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) i razmazan sterilnim metalnim štapićem po Drigalskom. Nakon 24 h inkubacije pri 37°C, naciepljene ploče su pregledane na pojavu kolonija bakterija roda *Salmonella* (crno obojene kolonije).

### **Bakterije vrste *Staphylococcus aureus***

Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* su određene prenošenjem 0,1 mL osnovnog razrjeđenja na krutu ploču Baird-Parkerovog agara (BP agar, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija), razmazane sterilnim metalnim štapićem po Drigalskom i inkubirane pri 37°C tijekom 48 sati. Porasle crne kolonije okružene sivo-bijelim neprozirnim prstenom i prosvijetljenom zonom razgrađenog lecitina iz žumanjka su prebrojane i njihov broj je preračunat na 1 g analiziranog uzorka.

### **Enterobakterije**

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* su određene prenošenjem inokuluma iz početnog razrjeđenja u sterilne petrijeve zdjelice, u koje je uliven VRBG agar (ljubičasto-crveni-žučni-glukozni agar, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija), rastopljen i ohlađen pri 45°C u vodenoj kupelji. Nakon homogenizacije podloge i inokuluma te skrutnjavanja, ploča je prelivena s dodatnim slojem VRBGA (cca 10 mL). Nakon 24 satne inkubacije pri 37°C, prebrojane su sitne,

crvene kolonije (uz provjeru oksidaza testom – bakterije porodice *Enterobacteriaceae* su oksidaza negativne) i njihov broj je preračunat na 1 g analiziranog uzorka.

#### **Sulfitoreducirajuće klostridije**

Početno pripremljeno razrjeđenje je pasterizirano pri 80°C tijekom 10 minuta u vodenoj kupelji. Nakon pasterizacije i hlađenja, 0,1 mL inokuluma je unesen do dna epruvete sa sterilnim SPS agarom (SPS agar, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) i pažljivo ispuhan. Nakon skrutnjavanja podloge, epruvete su inkubirane pri 37°C tijekom 3-5 dana. Sulfitoreducirajuće klostridije u podlozi rastu kao crno obojene kolonije u dubini agara.

#### **Kvasci i plijesni**

Broj kvasaca i plijesni, u analiziranim uzorcima svježe narezanih salata, je određen prenošenjem inokuluma iz odgovarajućeg pripremljenog razrjeđenja u petrijeve zdjelice u koje je uliven agar s ekstraktom kvasca, glukozom i kloramfenikolom (Yeast glucose chloramphenicol agar, YGC agar, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija). U podlozi se nalazi antibiotik kloramfenikol koji inhibira rast bakterijskih stanica. Nakon homogenizacije podloge i inokuluma, uzorci su inkubirani u 25°C tijekom 5-7 dana. Nakon inkubacije, prebrojane su kolonije kvasaca i plijesni i njihov broj preračunat na 1 g analiziranog uzorka. Kolonije kvasca su provjerene mikroskopski, a porasle kolonije plijesni su determinirane do roda i vrste pomoću priručnika za determinaciju.

#### **3.2.4. Pretraga na parazite**

Za mikroskopsku pretragu na parazite na predmetnicu je otpipetirano 30 µL taloga i 20 µL lugola, a sadržaj je promiješan nastavkom pipete i pokriven pokrovnicom. Svaki uzorak je mikroskopiran u dva ponavljanja. Prisutnost cisti odnosno jajašaca provjerena je pri ukupnom povećanju 200×, a po potrebi i pri 400× (El Said Said, 2012).

#### **3.2.5. Obrada rezultata**

Dobiveni rezultati su obrađeni u MS Office Excelu.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



Prilikom mikrobioloških analiza uzoraka u veljači, detektirana je prisutnost enterobakterija, bakterija vrste *Staphylococcus aureus*, kvasaca i plijesni, te odsutnost bakterija roda *Salmonella* i sulfitoreducirajućih klostridija.

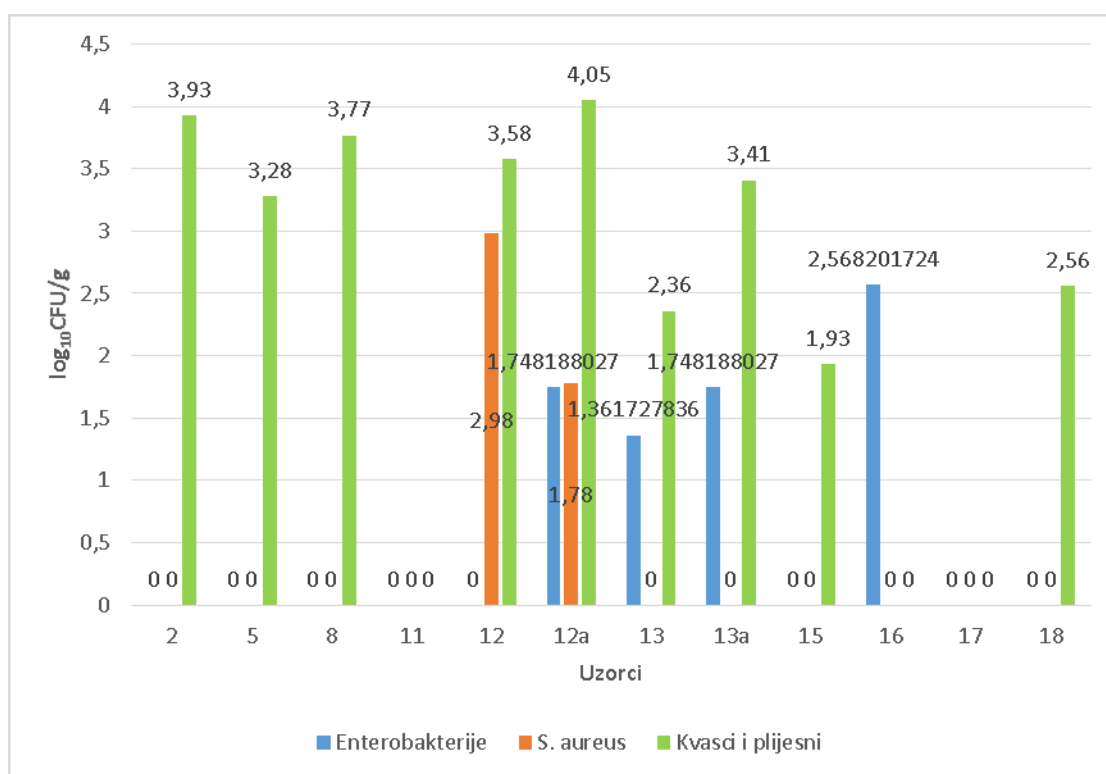
Brojevi pronađenih mikroorganizama prikazani su u **Tablici 1**. Salate kojima je istekao rok trajanja imaju povišen broj mikroorganizama, pogotovo kvasaca i plijesni (**Slika 14**). Nadalje, **Slika 15** predstavlja grafički prikaz salata kojima nije istekao rok trajanja. Međutim, podaci o isteku roka trajanja za uzorke 7, 10 i 14 nedostaju jer nisu bili navedeni na ambalaži, ali obzirom na vrijednosti CFU/g, možemo pretpostaviti da im je istekao rok trajanja. Napatogene bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*, te ostale nepatogene gram negativne bakterije čine dominantnu mikrofloru svježeg povrća, dok kvasci i plijesni, uz povrće, prevladavaju u velikom broju i na svježem voću. Dakle oni su prirodno prisutni na povrću i voću, a dospjeli su iz tla, vode, zraka itd. (Quadri i sur., 2015).

Prema Vodiču o mikrobiološkim kriterijima za ispravnost hrane (MPRRR, 2011), svi uzorci iz **Tablice 1** (ukupno osam) koji prelaze vrijednosti iznad  $10^3$  CFU/g za kvasce i plijesni se ne preporučuju za konzumaciju. Nasuprot tome, u svim salatama je broj enterobakterija u skladu s kriterijima Vodiča.

**Tablica 1** Broj bakterija, kvasaca i plijesni u uzorcima iz veljače 2020.

UZORAK	ENTEROBAKTERIJE		<i>S. aureus</i>		KVASCI I PLIJESNI	
	CFU	log <sub>10</sub> CFU	CFU	log <sub>10</sub> CFU	CFU	log <sub>10</sub> CFU
1	79	1,90	0	0	540	2,73
2	0	0,00	0	0	8600	3,93
3	0	0,00	0	0	85	1,93
4	12	1,08	0	0	56	1,75
5	0	0,00	0	0	1910	3,28
6	236	2,37	0	0	790	2,90
7	75	1,88	0	0	5600	3,75
8	0	0,00	0	0	5900	3,77
9	325	2,51	0	0	0	0,00
10	45	1,65	0	0	680	2,83
11	0	0,00	0	0	0	0,00
12	0	0,00	960	2,98	3760	3,58
12a	56	1,75	60	1,78	11200	4,05
13	23	1,36	0	0	230	2,36
13a	56	1,75	0	0	2580	3,41
14	23	1,36	0	0	5830	3,77
15	0	0,00	0	0	85	1,93
16	370	2,57	0	0	0	0,00
17	0	0,00	0	0	0	0,00
18	0	0,00	0	0	365	2,56

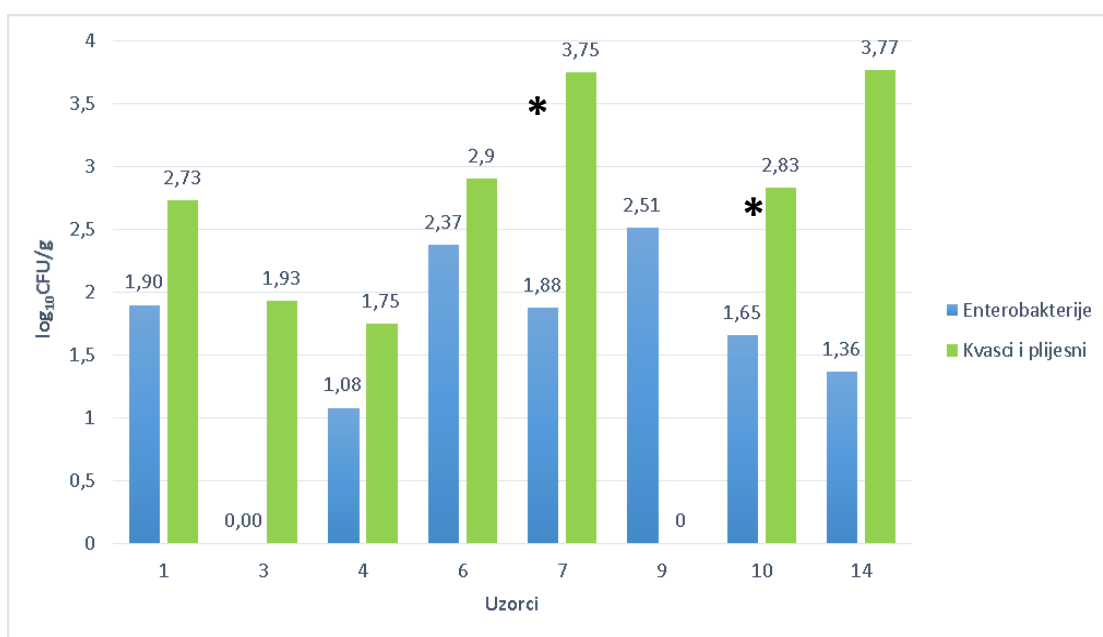
Slično, kao u **Tablici 1**, u istraživanju Al-Kharousi i sur. (2016), enterobakterije dominiraju u uzorcima, dok je *Staphylococcus aureus* pronađen u jednom uzorku u koncentraciji 2,5 log<sub>10</sub> CFU/g.



**Slika 14** Grafički prikaz gotovih salata iz veljače 2020. kojima je istekao rok trajanja

U dva uzorka je pronađena bakterijska vrsta *Staphylococcus aureus*. Radi se o uzorcima 12 i 12a kojima je istekao rok trajanja (**Slika 14**). Prethodno je navedeno, kako je *S. aureus* porijeklom od ljudskog izvora. Vrijednosti za *S. aureus* u uzorku 12a iznose 2,98 log<sub>10</sub> CFU/g, što je iznad maksimalnih dopuštenih vrijednosti (10<sup>2</sup> CFU/g = 2 log<sub>10</sub> CFU/g) kako je navedeno u Vodiču (MPRRR, 2011). Stoga, ova salata nije zdravstveno ispravna i ne bi se trebala konzumirati.

Štoviše, većina tih salata koje bilježe veći broj mikroorganizama u odnosu na ostale, su rezane ili sjeckane, što pogoduje bržem razvoju navedenih mikroorganizama. Dakle, broj mikroorganizama uzročnika kvarenja i onih patogenih se povećao zbog mehaničkog oštećenja biljnih stanica prilikom obrade salate, pri čemu se otpustio sadržaj staničnih sokova povrća koji služi kao hranjiva podloga za razne mikroorganizme. Posljedica toga je narušavanje kvalitete gotove salate i gubitak njezine svježine. Znači, broj prisutnih mikroorganizama ovisi o svježini sirovina, procesu obrade, ali i uvjetima i vremenu trajanja skladištenja, pakiranju i sl.



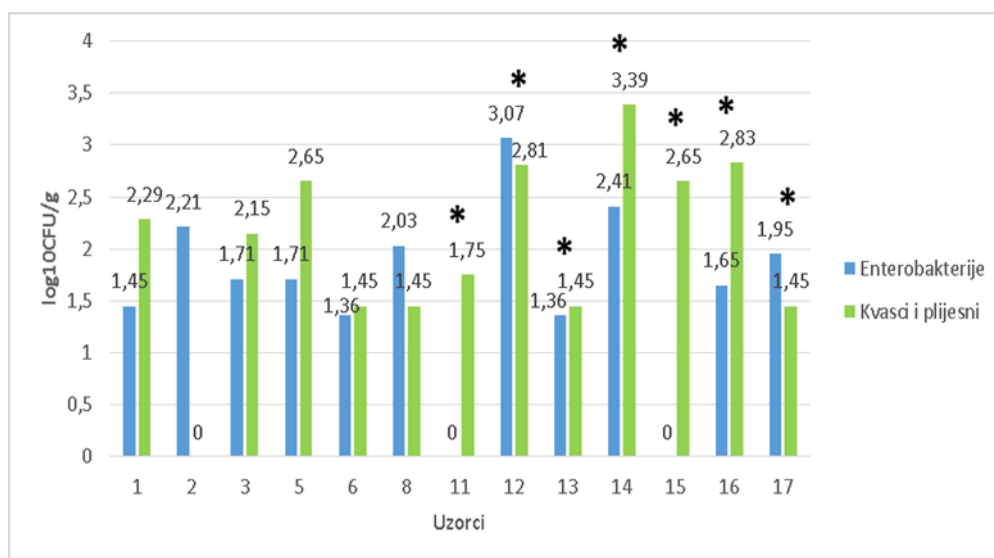
**Slika 15** Grafički prikaz gotovih salata iz veljače 2020. kojima nije istekao rok trajanja

Analize uzoraka iz lipnja potvrđuju prisutnost enterobakterija, te kvasaca i plijesni. Bakterije roda *Salmonella*, *S. aureus* i sulfitoreducirajuće klostridije nisu pronađene. Slične podatke kao u **Tablici 2**, dobili su u svome istraživanju Cardamone i sur. (2015). Vrijednosti iznad 2,0 log<sub>10</sub> CFU/g za enterobakterije u većini uzoraka, dok stafilokoki i sulfitoreducirajuće klostridije nisu pronađene niti u jednom uzorku.

**Tablica 2** Broj bakterija, kvasaca i plijesni u uzorcima iz lipnja 2020.

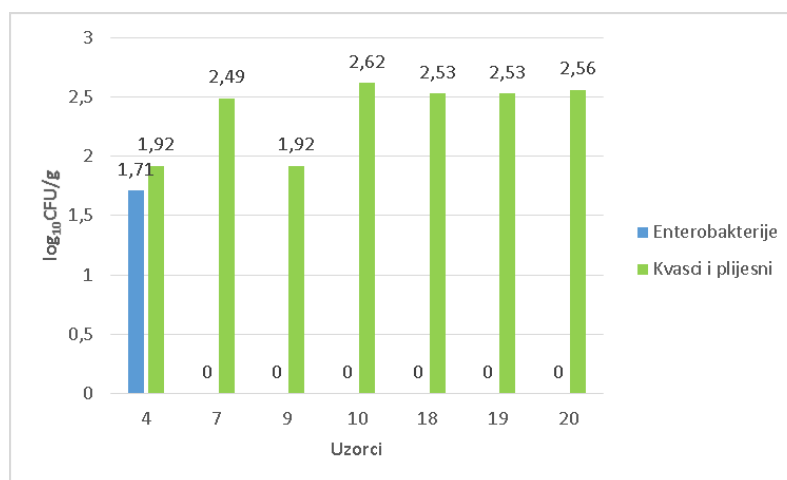
UZORAK	ENTEROBAKTERIJE		KVASCI I PLIJESNI	
	CFU	log <sub>10</sub> CFU	CFU	log <sub>10</sub> CFU
1	28	1,45	196	2,29
2	163	2,21	0	0,00
3	51	1,71	140	2,15
4	51	1,71	84	1,92
5	51	1,71	448	2,65
6	23	1,36	28	1,45
7	0	0,00	308	2,49
8	107	2,03	28	1,45
9	0	0,00	84	1,92
10	0	0,00	420	2,62
11	0	0,00	56	1,75
12	1177	3,07	644	2,81
13	23	1,36	28	1,45
14	258	2,41	2436	3,39
15	0	0,00	448	2,65
16	45	1,65	672	2,83
17	90	1,95	28	1,45
18	0	0,00	338	2,53
19	0	0,00	338	2,53
20	0	0,00	364	2,56

Enterobakterije, kvasci i plijesni su ponovno detektirani u najvećem broju jer zajedno čine prirodnu mikrofloru povrća. Uzorcima sa **Slike 16** je istekao rok trajanja, dok za uzorke označene \* nemamo podatke o roku trajanja.



**Slika 16** Grafički prikaz gotovih salata iz lipnja 2020. kojima je istekao rok trajanja

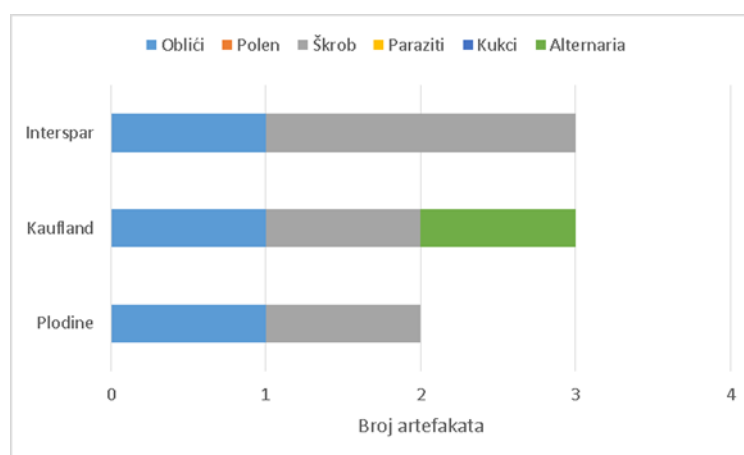
Nadalje, uzorci pod brojevima 12 i 14 nisu u skladu s kriterijima Vodiča (MPRRR, 2011), stoga nisu za konzumaciju. Dakle, nađene vrijednosti u uzorku 12 iznose 3,07 log<sub>10</sub> CFU/g , te odstupaju od maksimalnih dopuštenih vrijednosti (10<sup>3</sup> CFU/g) za enterobakterije. Isto tako uzorak 14 nije mikrobiološki ispravan za konzumiranje jer prelazi maksimalne dopuštene kriterije za kvasce i plijesni (10<sup>3</sup> CFU/g). Svi ostali uzorci su u skladu sa Vodičem (MPRRR, 2011), ali zbog roka trajanja, koji je istekao, se ne preporučuju za konzumaciju. Nasuprot tome uzorci salata sa **Slike 17** su mikrobiološki ispravne i s odgovarajućim rokom trajanja, te se mogu sigurno jesti.



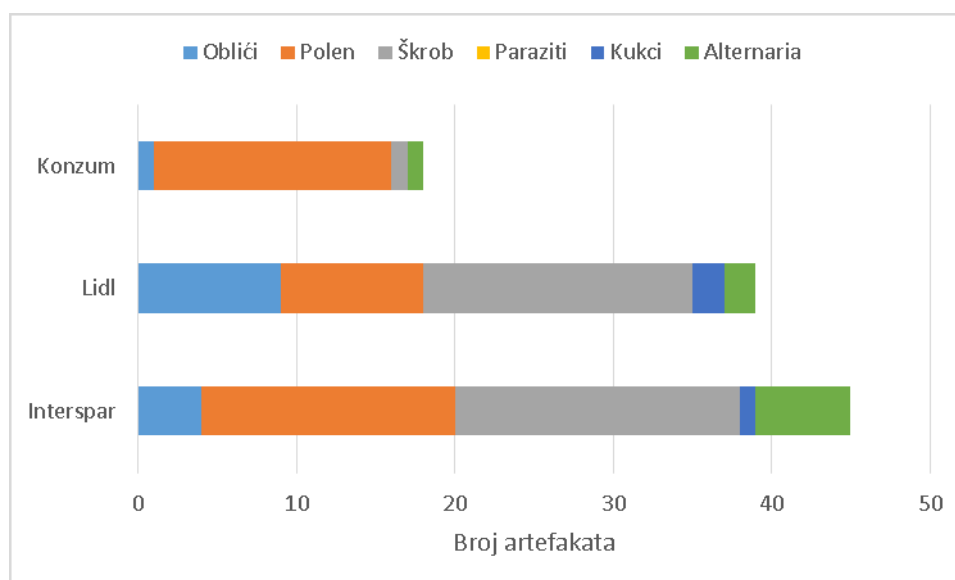
**Slika 17** Grafički prikaz gotovih salata iz lipnja 2020. kojima nije istekao rok trajanja

Budući nisu pronađeni paraziti, niti njihovi životni oblici, u uzorcima svježih salata uočena je pojavnost neparazitskih elemenata odnosno, artefakata u sedimentima salata. Pronađeni artefakti bili su biljnog podrijetla (pelud, škrob), životinjskog podrijetla (dijelovi kukaca, jaja kukaca i oblići) te spore plijesni roda *Alternaria*. *Alternaria* je plijesan koja kontaminira svježe voće i povrće nakon branja. Oko 20 vrsta iz roda *Alternaria* proizvode toksične tvari (Battilani i sur., 2008). Općenito se spore roda *Alternaria* prenose zrakom, najbolje tijekom kišnih i vjetrovitih perioda koji potpomažu njihovom razvitku i rasprostranjivanju (Sherf i Macnab, 1986). Inače rastu na pri 22- 28°C, ali mogu rasti i na nižim temperaturama, posebice tijekom skladištenja ili transporta (Barkai-Golan, 2008). Ova je plijesan poznata i kao kontaminant sirovina nakon berbe/žetve. Nadalje, velik broj spora može biti i posljedica neprikladnih uvjeta skladištenja i transporta. Prisutnost roda *Alternaria* u svježim salatama, potvrđena je u sličnim istraživanjima (Marinelli i sur., 2012; Shehu i sur., 2014; Tournas, 2005b). Pronađeni oblići u uzorcima salata pripadaju fitoparazitima koji ne predstavljaju zdravstvenu opasnost za čovjeka. No s ekonomskog stajališta, njihova prisutnost uzrokuje štete na biljci jer mnoge vrste služe kao vektori virusnih i bakterijskih bolesti korijena i izdanka (Singh i sur., 2013). Prisutnost fitoparazitskih oblića česta je pojava u korjenastom i na lisnatom povrću (Gullino i sur., 2019).

U lipnju u salatama je uočena veća prisutnost artefakata u odnosu na veljaču (**Slike 18 i 19**). Štoviše neke komponente u veljači, poput peludi i kukaca uopće nisu pronađene. S dolaskom toplijeg dijela godine za većinu cvjetnjača započinje intenzivna priprema za proces oprašivanja, odnosno produkciju peluda. Pelud se prenosi putem vjetra, kukaca ili vode te tako može dospjeti i na povrće.



**Slika 18** Prikaz artefakata u „ready to eat“ salatama prikupljenih u trgovačkim lancima u veljači 2020.



**Slika 19** Prikaz artefakata u „ready to eat“ salatama prikupljenih u trgovačkim lancima u lipnju 2020.

Ponekad eksina peludnog zrnca izgledom može podsjećati na jajašca oblića i što zahtjeva dodatnu provjeru (Szwabe i Kurnatowski, 2012). S druge strane broj oblića i kukaca je porastao što se može povezati s dolaskom toplijih i duljih dana koji pogoduju otvaranju reproduktivnog ciklusa, povećanim potrebama za hranom i parenjem.

Udio artefakata i pljesni roda *Alternaria* s obzirom na način rezanja salata vidljiv je iz **Tablice 3**. Cjelovite salate imale su više spora roda *Alternaria* u odnosu na narezane salate, dok je udio



artefakata u obje vrste pakiranih salata bio približno jednak. Iz ovoga možemo pretpostaviti da su velike lisne površine bolji supstrat za umnožavanje jer imaju cjelovitu nervaturu koja stvara utore u kojima se zadržavaju spore. Također, moguće je da su cjelovite salate manje obrađivane odnosno prane više puta, pri čemu su se spore roda *Alternaria* isprale. Nadalje, razlika u postotku artefakata je mala. Nešto veći udio artefakata imale su narezane salate što može biti posljedica oslobađanja škrobnih zrnaca iz pričuvnih organa kao što je korijen mrkve i celera. Međutim, treba uzeti u obzir i činjenicu da uzoraka narezanih salata ima za tri puta više u odnosu na cijele gotove salate.

**Tablica 3** Zastupljenost artefakata i spora roda *Alternaria* sp. prema načinu rezanja salate na svim lokacijama trgovačkih lanaca tijekom veljače i lipnja 2020.

Vrsta salate	Cjelovite			Vrsta salate	Narezane		
	N	<i>Alternaria</i>	Artefakti		N	<i>Alternaria</i>	Artefakti
Rukola	7	0	9	Matovilac i rotkvica	1	0	2
Matovilac, radič	1	0	0	Rezana zelena salata	3	1	13
Salata Misancija (rukola, špinat)	1	0	1	Rezana zelena i crvena salata	2	0	0
Baby špinat	3	1	21	Kupus bijeli	2	0	8
Matovilac	6	8	27	Kupus crveni	3	0	12
				Dijetna salata (mrkva, crveni i bijeli kupus)	3	0	7
				Mrkva i jabuka	1	0	0
				Mrkva	1	0	3
				Celer korijen	1	0	0
				Baby mix (špinat, blitva, kelj)	1	0	7
				Endivija i radič	3	0	2
Ukupno	18	9	58	Ukupno	21	1	54
Artefakti (%)		31.03		Artefakti (%)		38.89	
<i>Alternaria</i> (%)		50.00		<i>Alternaria</i> (%)		4.76	

N - ukupan broj određene vrste salate

*Alternaria* - broj spora plijesni roda *Alternaria* sp.

Artefakti - broj artefakata u uzorku

Dok, udio artefakata i pljesni roda *Alternaria* s obzirom na sastav salata vidljiv je iz **Tablice 4**. Usporedbom sastava salate, utvrđeno je da jedna vrsta salata bolje pogoduje zadržavanju artefakata i spora roda *Alternaria* nego mješavina salata iz čega se može pretpostaviti da su miješane salate možda bolje isprane.

**Tablica 4** Zastupljenost artefakata i spora roda *Alternaria* sp. prema sastavu salate na svim lokacijama trgovačkih lanaca tijekom veljače i lipnja 2020.

Jedna vrsta				Miješana			
Vrsta salate	N	<i>Alternaria</i>	Artefakti	Vrsta salate	N	<i>Alternaria</i>	Artefakti
Rukola				Matovilac i radič			
Baby špinat				Salata Misancija (rukola, špinat)			
Matovilac				Matovilac i rotkvica			
Rezana zelena salata	26	10	93	Rezana zelena i crvena salata	13	0	19
Kupus bijeli				Dijetna salata (mrkva, crveni i bijeli kupus)			
Kupus crveni				Mrkva, jabuka			
Mrkva				Baby mix (špinat, blitva, kelj)			
Celer korijen				Endivija, radič			
<b>Ukupno</b>	<b>39</b>	<b>10</b>	<b>112</b>	<b>Ukupno</b>	<b>39</b>	<b>10</b>	<b>112</b>
Artefakti (%)		83.04		Artefakti (%)		16.96	
<i>Alternaria</i> (%)		100		<i>Alternaria</i> (%)		0	

N - ukupan broj određene vrste salate

*Alternaria* - broj spora plijesni roda *Alternaria* sp.

Artefakti - broj artefakata u uzorku

## **5. ZAKLJUČAK**

Na temelju provedenog istraživanja u ovome radu, možemo zaključiti:

1. Način rezanja svježih salata utječe na brojnost spora *Alternaria* i artefakata, pri čemu je zastupljenost artefakata i spora roda *Alternaria* je veća u cjelovitim salatama nego u narezanim.
2. Salate uzorkovane u lipnju imale su veću zastupljenost spora roda *Alternaria* i artefakata nego salate uzorkovane u veljači.
3. Sastav salate utječe na zastupljenost spora roda *Alternaria* i artefakata, pri čemu je zabilježen njihov veći udio u salatama pripremljenim od jedne vrste povrća u odnosu na miješane salate.
4. U veljači je, u uzorcima, utvrđena prisutnost enterobakterija, kvasaca, plijesni i bakterija vrste *Staphylococcus aureus*, dok bakterija roda *Salmonella* i sulfitoreducirajuće klostridije nisu pronađene.
5. U uzorcima iz lipnja su pronađene enterobakterije, te kvasci i plijesni, a bakterija vrste *Staphylococcus aureus*, bakterija roda *Salmonella* i sulfitoreducirajuće klostridije nisu pronađene.
6. Ukupno osam uzoraka analiziranih u veljači nisu mikrobiološki ispravne i ne preporučuju se za konzumaciju. Od njih, sedam odstupa od maksimalnih dopuštenih vrijednosti za kvasce i plijesni, a jedan zbog bakterije *S. aureus*.
7. Dvije salate analizirane u lipnju nisu mikrobiološki ispravne zbog povišenih vrijednosti za enterobakterije, kvasce i plijesni.
8. Rok trajanja utječe na mikrobiološku ispravnost salata. One kojima je istekao rok trajanja nisu sigurne za ljudsko zdravlje i ne preporučuju se za konzumaciju zbog pronađenih mikroorganizama iznad maksimalnih dopuštenih vrijednosti.

## **6. LITERATURA**

- Al-Kharousi SZ, Guizani N, Al-Sadi MA, Al-Bulushi MI, Shaharoon B: Hiding in fresh fruits and vegetables: Opportunistic pathogens may cross geographical barrier. *International Journal of Microbiology* 1:1-14, 2016.
- Barkai-Golan R: *Alternaria* mycotoxins. U *Mycotoxins in fruits and vegetables*, str. 185-204. Academic Press, San Diego, Burlington, London, 2008.  
<https://books.google.hr/books?id=ySRh-nWkHl4C&printsec=frontcover&dq=Barkai+golan++mycotoxins&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwikiKcku4ntAhWgCRAIHUSiBZwQ6AEwAHoECAMQAg#v=onepage&q=Barkai%20Golan%20%20mycotoxins&f=false> [23.10.2020.]
- Barth M, Hankinson TR, Zhuang H, Breidt F: Microbiological spoilage of fruits and vegetables. U *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*, str. 135-183. Springer, Lake Forest, 2009.
- Battilani P, Barbano C, Logrieco A: Risk assesment and safety evaluation of mycotoxins in fruits. U *Mycotoxins in fruits and vegetables*, str. 1-24. Academic Press, San Diego, Burlington, London, 2008. <https://books.google.hr/books?id=ySRh-nWkHl4C&printsec=frontcover&dq=Barkai+golan++Alternaria+mycotoxins&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwiW3t2fzcrsAhVwAxAIHbVVDH8Q6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q=Barkai%20golan%20%20Alternaria%20mycotoxins&f=false> [17.11.2020.]
- Beck R, Mihaljević Ž, Brezak R, Bosnić S, Lohman Janković I, Deplazes P: Prvi nalaz trakavice *Echinococcus multilocularis* u Republici Hrvatskoj. U *Znanstveno-stručni skup. 6. Hrvatski veterinarski kongres*, str. 305-309. Hrvatska veterinarska komora, Veterinarski fakultet i Hrvatski veterinarski institut, Opatija, 2016.
- Caradonna T, Marangi M, Del Chierico F, Ferrari N, Reddel S, Bracaglia G, Normano G, Putignani L, Giangaspero A: Detection and prevalence of protozoan parasites on ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food Microbiology* 67:67-75, 2017.

- Cardamone C, Aleo A, Mamina C, Oliveri G, Di Noto AM: Assesment of the microbiological quality of fresh produce on sale in Sicily, Italy: preliminary results. *Journal of Biological Research* 22:1-6, 2015.
- Doyle ME: [Foodborne parasites: A review of scientific literature review](#). Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison, 2003.
- El Said Said, D: Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria Journal of Medicine* 48:345-352, 2012.
- Erdogrul Ö, Şener H: The contaminaton of various fruit and vegetable with *Enterobius vermicularis*, *Ascaris* eggs, *Entamoeba histolyca* cysts and *Giardia* cysts. *Food Control* 16:559-562, 2005.
- Eykyn SJ: Staphylococci. U *Oxford textbook of medicine*, str. 470-477. Oxford University Press, New York, 2005. <https://books.google.hr/books?id=EhjX517cGVsC&pg=RA1-PA489&dq=enterobacteria&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwi86ayRttzrAhXCCuwKHRVYCU84ChDoATACegQIAhAC#v=onepage&q=enterobacteria&f=false> [23.10.2020.]
- FAO, Food and Agricultural Organisation of the United Nations: *Multicriteria – based ranking for risk management of food-borne parasites*. FAO, WHO Press, Rim, 2014.
- Garreth EH: Fresh-cut Products: Tracks and Trends. U *Fresh-cut fruits and vegetables: Science, technology and market*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2002.
- Gehringer RA, Kaletunç G: *Chlorinated water sanitation of leafy green vegetables for fresh produce processors*. Ohio State University, College of Food, Agricultural, and Environmental Sciences, 2017. <https://ohioline.osu.edu/factsheet/aex-262> [23.10.2020.]
- Gullino ML, Gilardi G, Garibaldi A: Ready-to-eat salad crops: A plant pathogen`s heaven. *Plant Disease* 103:2153-2170, 2019.

- Habibi BMN, Bahreini M: Microbiological quality of mixed fresh-cut salads and mixed ready-to-eat fresh herbs in Mashhad, Iran. U *Nutrition and Food Sciences*, str. 62-66. IACSIT Press, Singapur, 2012.
- Heard MG: Microbiology of fresh-cut produce. U *Fresh-cut fruits and vegetables: Science, technology and market*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2002.
- Hurst CW: Safety aspects of fresh-cut fruits and vegetables. U *Fresh-cut fruits and vegetables: Science, technology and market*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2002.
- Keusch GT, Skirrow MB: Enterobacteria, campylobacter and miscellaneous food poisoning bacteria. U *Oxford textbook of medicine*, str. 489-502. Oxford University Press, New York, 2005. <https://books.google.hr/books?id=EhjX517cGVsC&pg=RA1-PA489&dq=enterobacteria&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKewi86ayRttzrAhXCCuwKHRVYCU84ChDoATACegQIAhAC#v=onepage&q=enterobacteria&f=false> [23.10.2020.]
- Kroupitski Y, Pinto R, Brandl MT, Belausov E, Sela S: Interaction of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology* 106:1876-1885, 2009.
- Kothe CI, Pessoa JP, Malhieros PS, Tondo EC: Assessing growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* on fruits and vegetables. *Journal of Infection in Developing Countries* 13:480-486, 2019.
- Koukkidis G, Haigh R, Allcock N, Jordan S, Freestone P: Salad leaf juices enhance *Salmonella* growth, colonization of fresh products and virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 83:1-13, 2016.
- Lawley R, Curtis L, Davis J: *The food safety hazard guidebook*. RSC Publishing, London, 2008. <https://books.google.hr/books?id=KiK9fcE4xvAC&pg=PA104&dq=Lawley++enterobacteria&hl=en&sa=X&ved=2ahUKewjjxrW8z8rsAhUeBhAIHdReCoEQ6AEwAHoECAyQAg#v=onepage&q=Lawley%20%20enterobacteria&f=false> [23.10.2020.]



- Manhique GA, Hessel CT, Plessis EMDU, Lopes SM, de Oliveira ES, Cesar TE, Korto L: Prevalence of *Enterobacteriaceae* on ready-to-eat salads, drinking water and surfaces in food markets in Mamputo, Mozambique. *Journal of Food and Nutritional Research* 8:63-73, 2020.
- Marinelli L, Maggi O, Aurigemma C, Tuffi D, De Giusti M: Fresh vegetables and ready-to eat salads: phenotypic characterization of moulds and molecular characterization of yeasts. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità* 24:301-309, 2012.
- McClane AB: *Clostridium perfringens*. U *International handbook of foodborne pathogens*, str. 91-104. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2003.  
[https://books.google.hr/books?id=sbwCpA-r9EQC&pg=PA91&dq=clostridium+perfringens&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwjOILvY\\_eDrAhXGKewKHWvABe8Q6AEwAnoECAIQAg#v=onepage&q=clostridium%20perfringens&f=false](https://books.google.hr/books?id=sbwCpA-r9EQC&pg=PA91&dq=clostridium+perfringens&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwjOILvY_eDrAhXGKewKHWvABe8Q6AEwAnoECAIQAg#v=onepage&q=clostridium%20perfringens&f=false) [23.10.2020.]
- Mehlhorn H: *Human parasites: Diagnosis, treatment, prevention*. Springer, Dusseldorf, 2016.  
<https://books.google.hr/books?id=8cLeDAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Mehlhorn+H:+Human+parasites&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwik4rq41crsAhXrk4sKHQrOCQAQ6AEwAHoECAEQAg#v=onepage&q=Mehlhorn%20H%3A%20Human%20parasites&f=false> [23.10.2020.]
- MPRRR, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja: *Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu*. Narodne Novine 74/08, 156/08, 89/10, 2011.
- Nwankwo IU, Eze VC, Onwuakor CE, Friday JU: Evaluation on the degree of contamination on salad vegetables sold in Umuahia main market. *American Journal of Microbiological Research* 3:41-44, 2015.
- Quadri OS, Yousuf B, Srivastava AK: Fresh-cut fruits and vegetables: Critical factors influencing microbiology and novel approaches to prevent microbial risks - A review. *Cogent Food & Agriculture* 1:1-11, 2015.

- Rainey FA, Hollen BJ, Small A: Genus I. Clostridium Prazmowski 1880, 23<sup>AL</sup>. U *Bergleys manual of systematic bacteriology*, str. 738-787. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009. <https://books.google.hr/books?id=0-VqgLiCPFc&pg=PA737&dq=clostridiaceae+family&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwiO0v6w7uDrAhVC2qQKHdAFDaYQ6AEwAXoECAIQAg#v=onepage&q=clostridiaceae%20family&f=false> [23.10.2020.]
- Rawat S: Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research* 5:47-56, 2015.
- Robertson LJ, Gjerde B: Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection* 64:1793-1798, 2001.
- Saifullah S, Abbas F, Samad A, Rizwan M, Bugti FS, Saima, Roomeela, Yousaf M, Mykhaylo T, Raziq A: *Staphylococcus aureus* prevalence on fresh salad and vegetables in Quetta city. *Pure and Applied Biology* 7:255-262, 2018.
- Shehu K, Maishanu AM, Salau IA: A preliminary study of microbial contamination of leafy vegetables in Sokoto Metropolis, Nigeria. *Aech International Journal of Science and Technology* 3:140-144, 2014.
- Sherf AF, Macnab AA: *Vegetable diseases and their control*. A Wailey-Interscience Publication, New York, Singapur, Chichester, Toronto, Brisbane, 1986. [https://books.google.hr/books?id=kbYNgTGxz4wC&pg=PA348&dq=alternaria+spores+vegetables&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwiTg\\_iZ-sLsAhViiYsKHXA6Bl8Q6AEwAHoECAUQAg#v=onepage&q=alternaria%20spores%20vegetables&f=false](https://books.google.hr/books?id=kbYNgTGxz4wC&pg=PA348&dq=alternaria+spores+vegetables&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwiTg_iZ-sLsAhViiYsKHXA6Bl8Q6AEwAHoECAUQAg#v=onepage&q=alternaria%20spores%20vegetables&f=false) [23.10.2020.]
- Singh SK, Hodda M, Ash GJ: Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 43:334-374, 2013.
- Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ: *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International* 45:502-531, 2012.

- Szwabe K, Kurnatowski P: Comparative analysis of morphometric features of the eggs of selected alimentary tract parasites and of the plant pollens. *Annals of Parasitology* 58:87–96, 2012.
- Tournas VH: Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical Reviews in Microbiology* 31:33-44, 2005a.
- Tournas VH: Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology* 99:71-77, 2005b.
- Utaaker KS, Robertson LJ: Climate change and foodborne transmission of parasites: A consideration of possible interactions and impacts for selected parasites. *Food Research International* 68:16-23, 2015.
- Varoquaux P, Mazollier J: Overview of European fresh-cut produce industry. U *Fresh-cut fruits and vegetables: Science, technology and market*. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 2002.
- Wiegel J: Family I. *Clostridiaceae* Pribram 1933 90<sup>AL</sup>. U *Bergey's manual of systematic bacteriology*, str. 736-738. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009.  
<https://books.google.hr/books?id=0-VqgLiCPFcC&pg=PA737&dq=clostridiaceae+family&hl=hr&sa=X&ved=2ahUKEwiO0v6w7uDrAhVC2qQKHdAFDaYQ6AEwAXoECAIQAg#v=onepage&q=clostridiaceae%20family&f=false> [23.10.2020.]
- Wu X, Lu Y, Zhou S, Chen L, Xu B: Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. *Environment international* 86:14-23, 2016.  
[https://www.dalynn.com/dyn/ck\\_assets/files/tech/SK50.pdf?fbclid=IwAR1KkBNnrB-J1ssvFhCP98QxxD5YbVHDG3yi1yrX9hehrpjPrnuQc9U\\_f6c](https://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/SK50.pdf?fbclid=IwAR1KkBNnrB-J1ssvFhCP98QxxD5YbVHDG3yi1yrX9hehrpjPrnuQc9U_f6c) [3.12.2020.]
- <http://www.tsdesigns.org/3-level-processing-trim-lines-2/> [8.9.2020.]
- <https://produceprocessing.net/article/waterjet-cutting-shows-promise-with-some-produce-items/> [9.9.2020.]

<https://www.fengxiangfoodmachinery.com/centrifugal-vegetable-spin-dryer-3513999.html>

[9.9.2020.]

[https://www.virtualmarket.fruitlogistica.de/en/Continuous-Air-Drying-Tunnel-Mod-Eco-](https://www.virtualmarket.fruitlogistica.de/en/Continuous-Air-Drying-Tunnel-Mod-Eco-Dryer,p1034413)

[Dryer,p1034413](https://www.virtualmarket.fruitlogistica.de/en/Continuous-Air-Drying-Tunnel-Mod-Eco-Dryer,p1034413) [9.9.2020.]

<https://www.pinterest.com/pin/113504853087536279/> [11.9.2020.]

[https://biol421.opened.ca/saving-plants-from-the-enemy-aspergillus-flavus-and-its-toxic-](https://biol421.opened.ca/saving-plants-from-the-enemy-aspergillus-flavus-and-its-toxic-sidekick-aflatoxin-b1/)

[sidekick-aflatoxin-b1/](https://biol421.opened.ca/saving-plants-from-the-enemy-aspergillus-flavus-and-its-toxic-sidekick-aflatoxin-b1/) [6.10.2020.]

<https://fineartamerica.com/featured/1-saccharomyces-cerevisiae-yeast-scimat.html>

[6.10.2020.]

<https://www.britannica.com/science/Salmonella-enteritidis> [7.10.2020.]

[https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/topics/nosocomial-infections/s-aureus-](https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/topics/nosocomial-infections/s-aureus-infection-associated-with-higher-mortality-in-ra/)

[infection-associated-with-higher-mortality-in-ra/](https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/topics/nosocomial-infections/s-aureus-infection-associated-with-higher-mortality-in-ra/) [7.10.2020.]