Mikrobiološka i parazitska ispravnost gotovih salata različitog podrijetla

Novosel, Fides

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:044903

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Fides Novosel

MIKROBIOLOŠKA I PARAZITSKA ISPRAVNOST GOTOVIH SALATA RAZLIČITOG PODRIJETLA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, ožujak, 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 Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Opasnosti vezane za hranu
Tema rada Mikrobiološka i parazitska ispravnost gotovih salata različitog podrijetla
Mentor: doc.dr.sc. *Tihana Marček*
prof.dr.sc. *Hrvoje Pavlović*

Mikrobiološka i parazitska ispravnost gotovih salata različitog podrijetla

Fides Novosel, 0113140177

Sažetak:
Gotove ili fresh-cut salate su svježi proizvodi od voća i povrća čija je potrošnja u stalnom porastu zbog visokih nutritivnih vrijednosti i jednostavnost i pripreme. Cilj ovoga rada bio je utvrditi prisutnost patogenih mikroorganizama, uzročnika kvarenja gotovih salata i parazita u gotovim salatama s različitim rokom trajanja kao i provjeriti sastav mikrobne populacije. Salate su sakupljene tijekom svibnja i srpnja 2020. godine s maloprodajnih lokacija na području grada Osijeka. Nakon ispiranja i sedimentacije, mikrobiološka i parazitska ispravnost je provjerena klasičnim mikrobiološkim metodama. Uzorci su bili kontaminirani bakterijama porodice *Enterobacteriaceae* te kvascima i plijesnima. Dijelu uzoraka iz mjeseca svibnja istekao je rok trajanja, ali broj bakterija, kvasaca i plijesni nije bio veći nego u uzorcima ispravnog roka trajanja. U salatama nije pronađena niti jedna parazitska vrsta. Veći broj spora roda *Alternaria* sp. zabilježen je u svibnju te u cjelovitim salatama i salatama pripremljenim od jedne vrste povrća.

Ključne riječi: Mikroorganizmi, paraziti, svježe salate, maloprodajne lokacije, *Alternaria* sp.

Rad sadrži: 45 stranica
9 slika
4 tablice
0 priloga
57 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

1.	*doc. dr. sc. Lidija Dujmović*	predsjednik
2.	*doc. dr. sc. Tihana Marček*	član-mentor
3.	*prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović*	član-komentor
4.	*izv. prof. dr. sc. Natalija Velić*	zamjena člana

Datum obrane: 05. ožujka 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 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Food hazards
Thesis subject Microbiological and Parasitic Safety of Fresh-Cut Salads of Different Origin
Mentor: *Tihana Marček,* PhD, assistant prof.
Hrvoje Pavlović, PhD, prof.

Microbiological and Parasitic Safety of Fresh-Cut Salads of Different Origin

Fides Novosel, 0113140177

Summary: Ready to eat or fresh-cut salads are fresh fruit and vegetable products whose consumption tend to increase due to high nutritional value and simplicity of preparation. The aim of this study was to determine the presence of pathogenic microorganisms, spoilage causative agents of fresh-cut salads, and parasites in ready to eat salads with different shelf life, as well as to check the composition of microbial populations. Salads were collected during May and July 2020 from retail locations in the city area of Osijek. After washing and sedimentation, microbiological and parasitic safety of samples was checked by classical microbiological methods. The samples were contaminated with bacteria of the *Enterobacteriaceae* family and yeasts and molds. The higher number of bacteria, yeasts and molds was detected in the samples from May with a regular expiration date compared to those salads that crossed the shelf life. Parasitic species were not found in the salads. Salads made of one type of vegetable and uncut salads as well sampels from May, contained more spores of *Alternaria* sp.

Key words: Microorganisms, parasites, fresh-cut salads, retail locations, *Alternaria* sp.

Thesis contains: 45 pages
9 figures
4 tables
0 supplements
57 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Lidija Dujmović*, PhD, assistant prof — chair person
2. *Tihana Marček*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Hrvoje Pavlović*, PhD, prof. — co-supervisor
4. *Natalija Velić*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: March 05, 2021.

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

Zahvaljujem svojim mentorima doc. dr. sc. Tihani Marček i prof. dr. sc. Hrvoju Pavloviću na podršci, pomoći i korisnim savjetima tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojem bratu, dečku i prijateljima uz koje je studentski život bio znatno lakši i zabavniji.

Posebno se zahvaljujem roditeljima koji su mi bili najveća podrška i bez kojih ne bih bila ovdje, a ovaj rad posvećujem mojoj Bruni.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Gotove („fresh-cut“) salate 3

2.2. Mikrobiološke opasnosti 5

2.2.1. Enterobakterije 6

2.2.2. Klostridije 7

2.2.3. Plijesni i kvasci 8

2.2.4. *Salmonella* 9

2.2.5. Staphylococcus aureus 12

2.3. Kvarenja gotovih („fresh-cut“) salata 13

2.4. Paraziti 14

2.4.1. Hrana kao izvor parazita 17

2.4.2. Klimatske promjene i paraziti 18

2.4.3. Strategija smanjenja rizika – kontrola proizvodnje 18

3. EKSPERIMENTALNI DIO 20

3.1. Zadatak 21

3.2. Materijali i metode 21

3.2.1. Prikupljanje uzoraka 21

3.2.2. Priprema uzoraka za mikrobiološke analize i pregled na parazite 21

3.2.5. Obrada rezultata 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 27

5. ZAKLJUČCI 36

6. LITERATURA 38

POPIS SLIKA 44

POPIS TABLICA 45

1. UVOD

S obzirom na sve veću potražnju za svježim i praktičnim obrocima, tržište za gotove svježe proizvode naglo se povećalo u zadnja dva desetljeća. S druge strane, također je zabilježen i porast broja slučajeva trovanja hranom kao posljedica kontaminacije mikroorganizmima i parazitima (Buck i sur., 2003).

Jedan od bitnih faktora koji bi mogli utjecati na porast parazitoza su klimatske promjene koje obuhvaćaju gotovo sve vrste živih bića na Zemlji. Nadalje, uzrok porasta parazitoza također proizlazi iz masovnih migracija stanovništva, bilo iz ekonomskih, političkih ili osobnih razloga. Uz to, razmjena dobara u zadnjih je nekoliko desetljeća snažno napredovala te se mnoge namirnice svakodnevno transportiraju kroz široku industrijsku mrežu. Iz dana u dan potražnja je sve veća za širokim spektrom namirnica, a zbog ubrzanog životnog stila to se posebno odnosi na gotove proizvode očuvane svježine, poput nasjeckanog voća i povrća, koji omogućavaju brz obrok. Međutim, raznovrstan broj novih proizvoda i trgovanja namirnicama, uz izmijenjene prehrambene navike stanovništva, dovode i do neadekvatnog zbrinjavanja otpada što povećava mogućnost razvoja i razmnožavanja parazita (Wu i sur., 2016; Caradonna i sur., 2017).

Česta je zabluda da se parazitoze javljaju isključivo u siromašnijim zemljama ili tropskim dijelovima svijeta te se, ponekad, zanemaruje činjenica kako su one prisutne globalno, uključujući i najbogatije zemlje svijeta (Utaaker i Robertson, 2014).

Iz navedenih razloga, istraživanja koja se bave proučavanjem faktora koji utječu na porast broja parazitoza, mogla bi biti od velike koristi u prilagođavanju na potencijalne promjene koje nas očekuju.

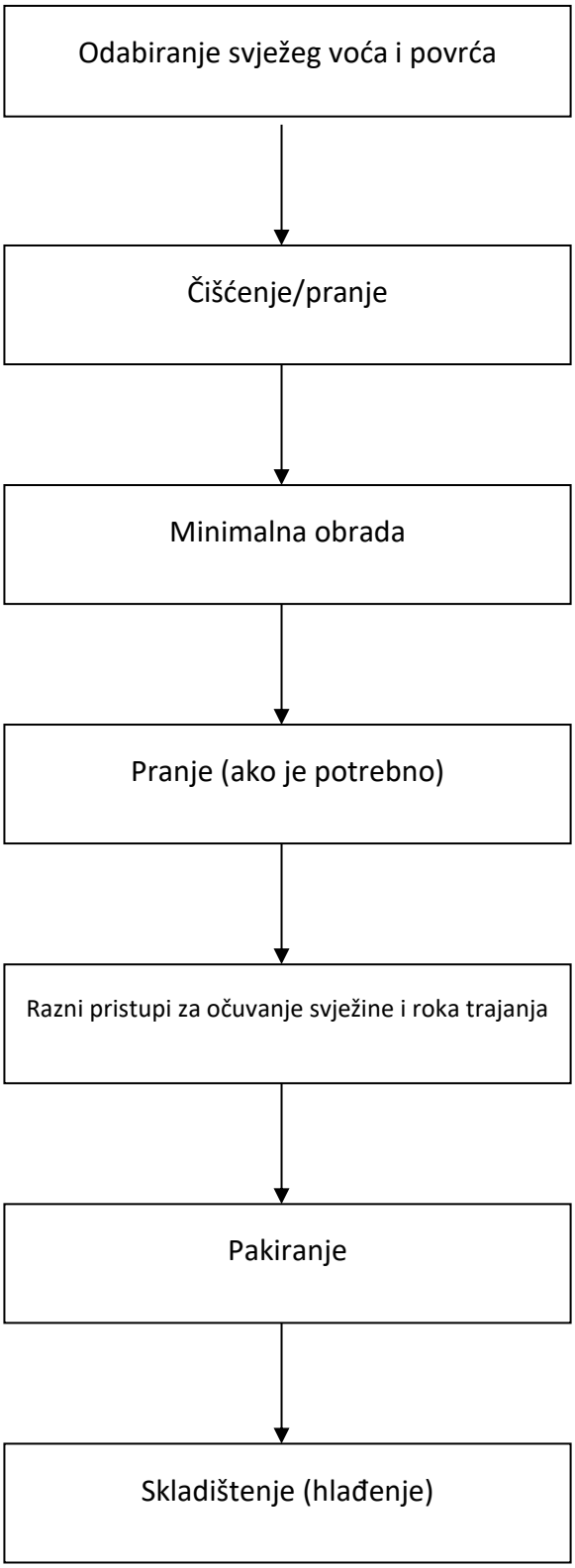
Cilj eksperimentalnog dijela ovoga rada je utvrditi mikrobiološku i parazitsku ispravnost uzoraka gotovih salata („fresh-cut“ salata) iz trgovačkih lanaca na području grada Osijeka tijekom svibnja i srpnja 2020. godine. Nadalje, u uzorcima će se utvrditi sastav mikrobne populacije te prisutnost patogenih organizama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Gotove („fresh-cut“) salate

Gotovi svježi proizvodi od voća i povrća danas se mogu pronaći na policama većine trgovačkih lanaca, posebice u razvijenim zemljama. Osim izuzetnih nutritivnih karakteristika (Slavin i Lloyd, 2012), gotove su salate vrlo praktične za konzumaciju u svakodnevici. Sve veći broj različitih kombinacija takvih proizvoda kupcima omogućava mnoštvo izbora te ispunjenje svih zahtjeva i potreba, a uz to je u skladu s trendom koji se odnose na zdravu hranu te uštedu vremena. Osim toga, namirnice se mogu pronaći u bilo koje doba godine, kao pojedinačno zapakirani ili miješani proizvod, usitnjen i pripremljen na više različitih načina, a u pakiranju se često nalazi i pribor za konzumaciju proizvoda (Massaglia i sur., 2019).

Prema definiciji IFPA-e (The International Fresh-Cut Produce Association), gotovi „fresh-cut“ proizvodi su svi proizvodi od voća, povrća ili kombinacija navedenoga koja je fizički promijenjena od početnog oblika ali ostaje u svježem stanju (IFPA i PMA, 1999). Točnije rečeno, gotovi proizvodi od voća i povrća su oni proizvodi koji prošli proces rezanja, pranja, sjeckanja, guljenja i ribanja. Primjeri uključuju rezani ananas, očišćenu i naribanu mrkvu, opranu salatu, oguljen i narezan krumpir i sl. Tijekom obrade dolazi do razaranja tkiva i mnogih mikrobioloških i biokemijskih reakcija te proizvodi od svježeg voća i povrća nakon obrade imaju kraći rok trajanja nego što ima netaknuto (Dauthy 1995, Yousuf i sur., 2020). Osim spomenutih procesa usitnjavanja, procedura pripreme „fresh-cut“ proizvoda uključuje dezinfekciju, pakiranje i sušenje. Općeniti prikaz proizvodnog procesa prikazan je u **Shematskom prikazu 1**. Tijekom obrade, najveći gubici kvalitete posljedica su gubitka vode, rasta mikroorganizama, oksidativnih procesa, gubitka aromatskih komponenata i povećanje staničnog disanja te sazrijevanja (Martín-Belloso i sur., 2006).



Shematski prikaz 1 Općeniti prikaz proizvodnog lanca (prilagođeno iz Yousuf i sur., 2020)

Kontaminacija „fresh-cut“ proizvoda moguća je tijekom proizvodnog procesa, ali ipak glavni razlog zbog kojeg se takvi proizvodi dovode u vezu s parazitskom i mikrobiološkom ispravnošću je minimalno procesiranje, tj. nedostatak obrade u kojima bi se u potpunosti eliminirali potencijalno štetni (mikro)organizmi. Ako je namirnica kontaminirana tijekom branja, patogene bakterije ostaju prisutne i tijekom proizvodnog procesa. Dakle, ključ za smanjivanje rizika kod takvih proizvoda je identificirati glavni izvor kontaminacije i prijenosa patogenih bakterija (Olmez, 2016).

Unatoč svim mjerama redukcije rizika od kontaminacije, bolesti uzrokovane hranom su, ipak, relativno česta pojava. Primjerice, američka Agencija za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration, FDA*) je objavila povlačenje s tržišta nekoliko proizvoda tvrtke Fresh Express koji su sadržavali svježu, minimalno procesiranu zelenu salatu iceberg, crveni kupus i mrkvu. Proizvodi su povezani s parazitozama izazvanim parazitskom vrstom *Cyclospora cayetanensis,* a prodavani su u velikom broju saveznih država SAD-a. Tijekom dva mjeseca, broj zabilježenih parazitoza bio je 701, od kojih je 38 osoba zahtijevalo bolničko liječenje (FDA, 2020).

Nadalje, konzumacija voća i sirovog povrća povećava rizik od ciklosporijaze u Europi, dok isto vrijedi i za toksoplazmozu (Caradonna i sur., 2017).

2.2. Mikrobiološke opasnosti

Sve veća konzumacija sirove hrane, u posljednje vrijeme, postala je dio trenda zdravog životnog stila. Međutim, kontaminacija povezana s konzumacijom sirove hrane mogla bi predstavljati rizik za potrošače. Sirova hrana, poput povrća, može se kontaminirati patogenim ili nepatogenim bakterijama u nekoliko točaka prije i poslije berbe i proizvodnje – putem sustava navodnjavanja, fecesa, prašine, tla, ljudskog dodira, sustava distribucije i skladištenja te kontaminirane opreme (Beuchat, 1996).

Infekcije uzrokovane hranom neprestani su problem u zdravstvenom sustavu te predstavljaju značajan socijalni i ekonomski teret. Između ostalih, obično su bakterije prikazane kao istaknut izvor crijevnih infekcija. Ipak, virusni patogeni, gljive i paraziti također su vrlo važni u uzročnici bolesti povezanih s hranom (Lee i sur., 2014).

2.2.1. Enterobakterije

Naziv enterobakterije ili crijevne bakterije, odnosi se na skupinu gram-negativnih štapića koji ne stvaraju spore, mogu biti kapsulirane ili nekapsulirane, pokretne ili nepokretne, fakultativni su anaerobi i dobro preživljavaju u nepovoljnim uvjetima. Dužina im se kreće od 2 do 3 µm a širina od 0,5 do 0,7 µm. Dosad je otkriveno otprilike 30 rodova i 110 vrsta, a svega 30-ak može prouzročiti bolest kod ljudi. Ipak, uz stafilokoke i streptokoke, pripadaju u bakterije koje najčešće uzrokuju bolesti. Prirodno im je stanište probavni sustav čovjeka i životinja te kod čovjeka čine ukupno 1-2% ukupne crijevne mikroflore (Kalenić i sur., 2013). Također ih je moguće pronaći u okolišu, npr. vodi, tlu i biljkama (D'Agostino i Cook, 2016).

Neki od najpoznatijih predstavnika enterobakterija su *Salmonella, Escherichia, Shigella, Klebsiella, Proteus, Enterobacter, Citrobacter, Yersinia, Hafnia, Serratia, Edwardsiella* i *Erwinia*. Optimalna temperatura razmnožavanja iznosi 37°C, dok se vrste iz rodova *Hafnia*, *Serratia* i *Yersinia* mogu umnožavati i pri mnogo nižim temperaturama.

Enterobakterije u namirnicama indikator su fekalnog zagađenja. Ako je dokazana njihova prisutnost, namirnice se smatraju zdravstveno neispravnima. Prisutnost se može dokazati uzimanjem mikrobioloških briseva s površina, ruku osoblja i pribora te u tom slučaju ukazuju na nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju (ZZJZDNZ, 2020). Kod proizvodnje gotovih salata, kontaminacija enterobakterijama moguća je u svim fazama proizvodnog procesa (Osaili i sur., 2018).

Enterobakterije se vrlo često javljaju na voću i povrću pa mogu predstavljati rizik od kontaminacije pri proizvodnji gotovih salata, a u prilog tome govore istraživanja koje su proveli Al-Kharousi i sur. (2016) te Osaili i sur. (2018). Prvo je istraživanje pokazalo da su enterobakterije izolirane iz 60% ispitanog voća i, čak, 91% povrća, dok je u drugom zabilježen velik broj enterobakterija na rezanim listovima zelene salate.

Štetni učinci koje mogu izazvati uključuju infekcije urinarnog trakta, gastroenteritis, meningitis, upalu pluća, septikemiju i hemolitički-uremički sindrom.

2.2.2. Klostridije

Bakterije roda *Clostridium* ili klostridije, su anaerobne, sporogene, gram-pozitivne bakterije, koje su široko rasprostranjene u prašini, tlu, na biljkama i u probavnom traktu ljudi i životinja.

Ove bakterije karakterizira stvaranje spora u nepovoljnim uvjetima, kao što su visoka i niska temperatura, kemijska obrada te rast u aerobnim uvjetima. Najznačajniji u mikrobiologiji namirnica su *Clostridium botulinum* koja proizvodi vrlo snažne neurotoksine koji uzrokuju botulizam i *Clostridium perfringens* koji uzrokuje toksikoinfekciju hranom.

C. botulinum najčešće se povezuje sa sušenim proizvodima, konzerviranom hranom, poput mesnih konzervi, konzervirane ribe i slično. Posebnu opasnost predstavlja ako je prilikom procesa hrana neadekvatno termički ili kemijski obrađena, a trovanje ima vrlo teške simptome te velik rizik od smrtnog ishoda. *C. perfringens* čest je kontaminant kojeg nalazimo u mljevenom mesu, piletini, mlijeku i mliječnim proizvodima te obično izaziva pojavu većeg broja oboljelih zbog nepravilnog skladištenja hrane, npr. u restoranima, bolnicama, školskim kantinama ili događajima na kojim se poslužuje hrana za velik broj gostiju. Međutim, osim navedenih namirnica, može se pronaći i na povrću i proizvodima od povrća, uključujući začine i začinsko bilje. Simptomi trovanja su proljev, povraćanje i trbušna bol koja obično traje 12 do 24 sata, dok kod starijih osoba ili dojenčadi to može trajati i do dva tjedna. Također, trovanje enterotoksinom *C. perfringens* jedno je od najčešćih trovanja u SAD-u (FDA, 2012).

2.2.3. Plijesni i kvasci

Kvasci i plijesni pripadaju carstvu Gljiva i eukariotski su organizmi. Kvasci su jednostanični, dok su plijesni višestanični organizmi. Plijesni su građene od povezanih i umreženih stanica hifa koje tvore micelij, dok ih kvasci nemaju. Najčešće se razmnožavaju nespolno. Kvasci i plijesni imaju niz korisnih uloga u prehrambenoj, farmaceutskoj i drugim industrijama, npr. u pivarstvu i mljekarstvu te proizvodnji korisnih tvari poput antibiotika.

Vjerojatno najpoznatiji kvasac je *Saccharomyces cerevisiae,* koji je poznat po tome što se, između ostaloga, koristi pri proizvodnji kruha. Druga hrana u čijoj se proizvodnji koriste kvasci i plijesni uključuje umak od soje i druge fermentirane proizvode od zrna soje te nekoliko vrsta poput onih s plemenitom plijesni. Neke vrste viših gljiva, poput tartufa i drugih gljiva koriste se kao namirnice u prehrani ljudi. S druge strane, neki su kvasci i plijesni štetni za ljudsko zdravlje, npr. kvasci roda *Candida* ili plijesni rodova *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium* (iako se neke neopasne vrste spomenutih rodova intenzivni koriste u različitim fermentacijama prehrambenih proizvoda). Neke plijesni proizvode sekundarne metabolite koji mogu biti toksični, poput mikotoksina koji su česta pojava kod pšenice, riže i kukuruza (Benedict i sur., 2016).

Gljive pronalazimo i u crijevima zdravih ljudi. Međutim, pretpostavka je da je skoro uvijek riječ o kvascima i plijesnima iz hrane i okoliša, usne i nosne šupljine, koji su, tek prolazno, prisutni u probavnom traktu. Probavni trakt čovjeka sadrži nepovoljne uvjete za razvoj kvasaca i plijesni u crijevima - niska raspoloživost kisika i antimikrobne tvari.

Za razliku od parazita i bakterija, manje se pažnje pridaje fungalnim patogenima. Lee i suradnici (2014) smatraju kako su rizici povezani s fungalnim patogenima podcijenjeni. Naime, u istome je istraživanju opisan slučaj povlačenja s tržišta grčkog jogurta tvrtke *Chobani* koji je bio kontaminiran plijesni *Mucor circinelloides* koji proizvode mikotoksine te su, uz plijesni roda *Rhizopus*, jedan od uzročnika mukormikoze koja može biti smrtonosna, posebice kod imunokompromitiranih osoba. Kod više od 200 potrošača zabilježeni su simptomi mučnine, povraćanja i dijareje.

2.2.4. *Salmonella*

Rod *Salmonella* sastoji se od preko 2700 serotipova (Beuchat, 1996). Pripadnici roda *Salmonella* su gram-negativne, štapićaste bakterije koje ne proizvode spore. Ističu se u nekim posebnostima u klasifikaciji i nazivlju u odnosu na druge bakterijske rodove. One su pokretne, izuzev serotipa *Salmonella* Gallinarumi i *Salmonella* Pullorum koji su jedini nepokretni pripadnici roda. Predstavnik roda je *Salmonella enterica* koja se dijeli na šest podvrsta: *arizonae*, *enterica*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* i *salamae*. Gotovo sve salmonele značajne u humanoj i veterinarskoj medicini pripadaju podvrsti *Salmonella enterica* subsp*. enterica*. 69% izolata iz čovjeka pripada serotipovima *Salmonella* Enteritidis i *Salmonella* Typhimurium (Marinculić i sur., 2009).

Salmonella mogu na nizu hranjivih podloga proizvesti vidljive kolonije unutar 24 sata pri oko 37°C. Optimalna temperatura rasta iznosi 35 - 37°C, ali ovisno o sojevima i hranjivoj podlozi, rast je moguć u rasponu 5 - 47°C. Osim temperature važan je parametar rasta i pH vrijednost. Optimalna pH vrijednost je između 6,5 i 7,5, dok su baktericidne vrijednosti pH ispod 4,0 i iznad 9,0. Sojevi *Salmonella* obično su relativno osjetljivi na niske vrijednosti aktiviteta vode te ih inhibiraju visoke koncentracije soli.

Prirodno im je stanište probavni trakt životinja i ptica. Kao crijevni mikroorganizmi ove se bakterije izlučuju s izmetom iz kojeg se mogu prenijeti na različita mjesta. Kao takve nalaze se u vodi i hrani te ih zatim mogu unijeti druge životinje i ljudi koji postaju prenosioci, ponovno prenoseći *Salmonella* i nastavljajući ciklus (Vlaemynck, 1996).

Najčešće epidemije salmoneloze povezane su s piletinom i drugim mesnim proizvodima, jajima i mliječnim proizvodima. Salmoneloze povezane s voćem i povrćem, također, su zabilježene. Značajni slučajevi uključuju trovanja svježom rajčicom, sirovim proklijalim zrnom graha, dinjama i lubenicama (Beuchat, 1996). Prikaz nekih vrsta povrća povezanih s epidemijom salmoneloze prikazan je u **Tablici 1**.

Bolesti koje mogu izazvati *Salmonella* dijele se na tifusne i netifusne bolesti. Tifusne bolesti obično se javljaju kao posljedica korištenja kontaminirane vode i hrane te su rijetke u zemljama dobrog komunalnog standarda. S druge strane, netifusne bolesti su češće u razvijenijim zemljama, pa tako i u Hrvatskoj. Obično je uzrokovan serotipom *S.* Enteritidis i *S*. Typhimurium, a može ga uzrokovati od 1500 do 2000 različitih serotipova salmonela. Ovaj

oblik salmoneloza se naziva enterokolitis i najčešće se prenosi hranom. Simptomi enterokolitisa uključuju mučninu, povraćanje, grčeve u trbuhu, proljev, povišenu tjelesnu temperaturu i glavobolju, a kao dodatna komplikacija moguća je i upala zglobova. U Hrvatskoj je tijekom 2006. godine oboljelo ukupno 4734 osobe od salmoneloznog enterokolitisa, od čega su registrirane 52 epidemije sa 756 oboljelih. U 2007. godini oboljela je 3331 osoba, a zabilježeno je 36 epidemija s 324 oboljele osobe (Marinculić i sur., 2009).

Tablica 1 Globalne epidemije povezane s povrćem kontaminiranim Salmonellom (Koukkidis i Freestone, 2018)

Soj	Namirnica	Broj slučajeva	Godina	Zemlja
***Salmonella* Montevideo**	Sirove klice	8	2018	USA
***Salmonella* Muenchen i *Salmonella* Kentucky**	Alfaalfa klice	26	2016	USA
***Salmonella* Reading i *Salmonella* Abony**	Alfalfa klice	36	2016	USA
***Salmonella* Anatum**	Zelena salata	54	2016	Australija
***Salmonella* Poona**	Krastavac	907	2015	USA
***Salmonella* Enteritidis**	Proklijali grah	115	2014	USA
***Salmonella* Newport**	Krastavac	275	2014	USA
***Salmonella* Enteritidis**	Alfalfa klice	25	2011	USA
***Salmonella* Enteritidis**	Alfalfa klice	140	2010 - 2011	USA
***Salmonella* Newport**	Alfalfa klice	44	2010	USA
***Salmonella* Saintpaul**	Alfalfa klice	235	2009	USA
***Salmonella enterica* Bovismorbificans**	Alfalfa sjeme	42	2009	Finska
***Salmonella* Stanley**	Alfalfa klice	51	2007	Švedska
***Salmonella* Weltevreden**	Alfalfa klice	45	2007	Danska, Finska, Norveška

2.2.5. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus je gram-pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija kuglasta oblika, nepokretna, ne tvori spore. Bakterijske stanice ove vrste promjera su između 0,5 i 1,5 µm. Nakon diobe stanice mogu ostati pojedinačne, u parovima, kratkim lancima, tetradama, a najkarakterističnije su nepravilne nakupine stanica u obliku grozda. Proizvode razne enzime koje pridonose patogenosti te enterotoksin koji je čest uzročnik trovanja hranom. Vegetativne oblike bakterije, ali ne i toksine, uništava temperatura od 60°C tijekom 8 minuta (Marinculić i sur., 2009).

Staphylococcus aureus jedan je od najotpornijih patogena koji ne stvaraju spore. Optimalna temperatura za rast je 37°C do 40°C, ali može rasti i pri temperaturama od 7 do 50°C, pH između 4,0 i 9,8, s optimumom između 6 i 7 (Medveďová i Valík, 2012).

Prema Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (*Centers for Disease Control and Prevention*, *skraćeno: CDC,* 2011) otprilike 30% osoba u nosu ima stafilokoke (CDC, 2011). Ne izazivaju bolest kod zdravih osoba, ali imaju sposobnost stvaranja toksina koji se ne uništavaju pri termičkoj obradi te uzrokuju trovanje hranom. Osobe koje su kliconoše predstavljaju opasnost za ostale, naročito, onda kada su im zanimanja vezana za proizvodnju i/ili distribuciju hrane, koju mogu kontaminirati ovom bakterijom.

Enterotoksini obično nastaju u hrani koja sadrži znatne količine ugljikohidrata ili bjelančevina, kada se drži u neprikladnim uvjetima koji omogućuju razmnožavanje stafilokoka. Onečišćenje hrane stafilokokima je, najčešće, posljedica nehigijenskog postupka s namirnicama, ali namirnice mogu biti i primarno kontaminirane stafilokokima. Radi izbjegavanja kontaminacije hrane stafilokokima, treba voditi računa o higijeni objekata i djelatnika te o pravilnoj temperaturi pohrane hrane, preporučljivo nižoj od 7,2°C. Stafilokoki se nalaze u zraku, prašini, blatu, kanalizaciji, vodi, mlijeku, hrani, opremi koja se koristi u pripremi hrane, površinama u okolišu, životinjama i ljudima. Iako su najznačajniji izvor stafilokoka koji uzrokuju intoksikacije ljudi koji rade s hranom, izvor kontaminacije hrane stafilokokima mogu biti i oprema i prostor u prehrambenoj industriji (Marinculić i sur., 2009).

2.3. Kvarenja gotovih („fresh-cut“) salata

Dok većina prerade u prehrambenoj industriji, kao posljedicu ima produžen rok trajanja, prerada voća i povrća pri izradi gotovih salata ima upravo suprotan učinak. Nakon minimalnog procesiranja kakvo se koristi kod pripreme ovih proizvoda, voće i povrće generalno ima ubrzanu respiraciju, što znači brži metabolizam te, posljedično, i brže starenje, odnosno propadanje. Također, ubrzana respiracija može rezultirati bržim gubitkom kiselina, šećera i drugih komponenti odgovornih za kvalitetu okusa i nutritivnu vrijednost namirnice (Dauthy, 1995).

Nadalje, sjeckanje, guljenje i, općenito, usitnjavanje i obrada uzrokuju fizičku štetu tkivima što dovodi do veće proizvodnje etilena, tzv. hormona zrenja. Osim toga, povećava se i aktivnost biokemijskih reakcija koje uzrokuju promjenu boje (uključujući posmeđivanje), promjenu okusa, teksture i nutritivne kvalitete. Značajan utjecaj na brzinu respiracije imaju temperatura i atmosfera pomoću kojih se ovakvi procesi mogu usporiti. Gotove salate obično imaju rok trajanja 10 do 14 dana (Cantwell i Suslow, 2002). Promjena boje, kao posljedica enzimatske aktivnosti, jedan je od glavnih defekata gotovih salata, što uključuje enzimatsko posmeđivanje, promjena boje zelenog povrća u žutu te blijeda boja kod povrća intenzivne boje (Watada i Qi, 1999).

Osim navedenoga, velik utjecaj na kvarenje gotovih salata imaju mikroorganizmi koji se nalaze na svježim namirnicama ili u njih dospiju tijekom prerade.

Glavne grupe mikroorganizama povezane s kvarenjem i kontaminacijom svježih namirnica su bakterije i gljive, dok virusi i paraziti (npr. *Gardia* sp.) predstavljaju velik problem zbog kontaminacije, ali ne uzrokuju kvarenje proizvoda. Razaranje tkiva tijekom prerade namirnica omogućuje mikroorganizmima uvjete za umnožavanje jer se razaranjem tkiva povećava dostupnost nutrijenata. Također, tijekom prerade i rukovanja namirnicama, može doći do kontaminacije humanim patogenima poput bakterija *E. coli*, *Yersinia* i *Salmonella*. Iako se konstantno teži nižim temperaturama kako bi se usporio rast mikroorganizama i očuvala svježina i mikrobiološka ispravnost namirnice, ipak treba pripaziti i na psihrotrofne organizme koji su tolerantni na niske temperature, poput bakterija roda *Pseudomonas* i *Listeria* (Cantwell i Suslow, 2002).

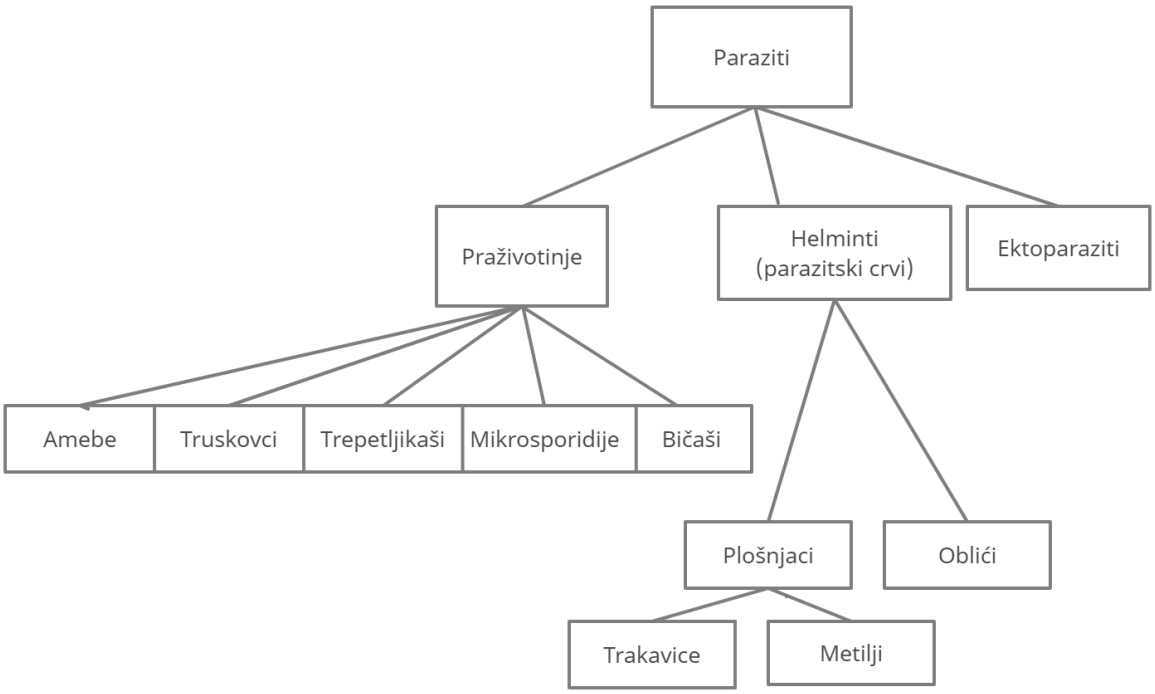
2.4. Paraziti

Pojam „parazit“ (prema grč. *„parásitos“*, *„pará“ = pokraj, uz, i „sitos“ = žito, hrana*) u prijevodu predstavlja „osobu koja jede s tuđega stola“. S obzirom da oni hranu dobivaju bez potrage za njom, termin je dobio negativnu konotaciju. Termin se također počeo upotrebljavati za životinje, koje djelomično ili u potpunosti žive na račun domaćina (Mehlhorn, 2016).

Parazitizam je oblik životne zajednice u kojem nametnik, tj. parazit, živi na račun drugog organizma. Dakle, paraziti su organizmi koji svoju hranu uzimaju od drugih živih bića pri čemu im nije u interesu usmrtiti svog domaćina za razliku od predatora koji u pravilu ubijaju svoj plijen. Paraziti su obično manji od svoga domaćina (Doyle, 2003).

Zajednice među organizmima mogu biti pozitivne i negativne, te mogu biti između jedinki istih vrsta (intraspecijski) ili između više vrsta (interspecijski). Interspecijski odnosi mogu biti amenzalizam, neutralizam, kompeticija, parazitizam, predatorstvo, mutualizam i komenzalizam. Parazit koji živi na površini tijela svojega domaćina zove se ektoparazit, a onaj koji živi u njegovoj unutrašnjosti, npr. u krvi ili organima, zove se endoparazit. Parazitizam može biti trajan (trakavice, metilji i sl.) te povremen (krpelj, komarac) ili periodičan, ako se koristi samo u jednom dijelu životnog ciklusa (Klapec i sur., 2020).

Prema Levinson (2014) paraziti se dijele u tri skupine: praživotinje (*Protozoa*), oblenjaci (*Aschelmintes*) i ektoparaziti (**Slika 1**). Paraziti iz skupine Protozoa su jednostanični organizmi koji pripadaju carstvu Protista, dok su oblenjaci i ektoparaziti višestanični organizmi i pripadaju carstvu Animalia. Više taksonomske skupine parazita uključuju dva koljena, *Aschelmintes* i *Platodes* (plošnjaci). Unutar oblenjaka nalazi se razred *Nematoda* (oblići) kojemu pripadaju i parazitski oblići (npr. zavojita trihina, dječja glista, rudarska glista, i dr.). Iz koljena plošnjaci, dolaze paraziti razreda *Cestoda* (trakavice) i metilji (*Trematoda*). Ektoparaziti dolaze iz koljena hematofagnih člankonožaca (*Arthropoda*), razreda *Insecta* (kukci) (npr. buhe, krpelji i dr.); koljena *Annelida* (kolutićavci) (npr. pijavice) te koljena *Chordata* (svitkovci) (npr. šišmiši).



Slika 1 Klasifikacija parazita (prilagođeno iz Levinson, 2014)

Unatoč velikom broju parazitoza, relativno se malo zna o parazitima te se njihova simptomatologija u medicinskoj parazitologiji često miješa s bolestima koje izazivaju bakterije i virusi. Paraziti koji izazivaju infekcije hranom uključuju bičaša iz roda *Giardia*, kriptosporidije i toksoplazme iz koljena truskovci, amebe, zatim obliće iz rodova *Trichinella* i *Anisakis*, trakavice iz roda *Taenia* i *Echinococcus* te metilje iz roda *Opisthorchis*, *Clonorchis* i *Fasciola*. Velika raznolikost obilježje je njihovih životnih ciklusa, a strategije preživljavanja, prijenos, adaptacija na domaćina i razmnožavanje pridonose širenju parazita i otvaranju novih životnih ciklusa (Gajadhar, 2015).

Opasnost zaraze parazitima iz hrane i njihove posljedice po zdravlje čovjeka u medicinskoj struci je često podcijenjena zbog krive dijagnostike ili zbog netočnog mišljenja da su paraziti rijetki. Paraziti se mogu prenositi unosom svježe ili prerađene hrane koja je kontaminirana, ali također i kroz okoliš, npr. posredstvom životinja ili čovjeka uslijed neadekvatnog održavanja higijene ili neadekvatne termičke obrade pojedinih namirnica (FAO/WHO, 2014).

Tlo i voda mogu sadržavati embrionirana jajašca (npr. parazitski oblići) i ciste parazitskih praživotinja koji se mogu unijeti u tijelo oralnim putem. Tlo i voda mogu biti izvori i infektivnih

ličinki koje, nakon probijanja kože domadara, uđu u tijelo. Primjer je rudarska glista čije ličinke žive u zagađenom tlu te krvni metilji iz roda *Schizostoma* i cerkarije (infektivni stadij metilja) koji se mogu naći u zagađenoj vodi. Izvor infekcije parazitima predstavlja i hrana te u nekim slučajevima moguć je i prijenos infekcije putem krvi kao što je to u slučaju vrste *Toxoplasma gondii*, koja se prenosi s mačke na čovjeka, može biti opasna za dojenčad te imunokompromitirane osobe. Paraziti mogu biti prisutni u velikom broju namirnica, npr. toksoplazma u školjkama, oblići roda *Anisakis* u lignjama te kriptosporidije i ciklospore u sirovom voću i povrću (**Tablica 2**).

Tablica 2 Paraziti u hrani (Doyle, 2003)

Namirnica	Protozoa	Oblići	Trakavice	Metilji
Govedina			*Taenia saginata*	
Svinjetina	*Toxoplasma*	*Trichinella*	*Taenia solium*, *Taenia asiatica*	
Ostalo meso	*Toxoplasma*, *Cryptosporidium* (janjetina, ovčetina)	*Trichinella* (puma, morž, medvjed, konj, divlja svinja) *Gnathostoma* (žabe, zmije)		*Paragonimus* (divlja svinja, hrčak)
Mlijeko	*Cryptosporidium*			
Riba		*Anisakis, Gnathostoma*	*Diphyllobothrium*	*Clonorchis*
Rakovi, škampi		*Gnathostoma*		*Paragonimus*
Školjke, dagnje, kamenice	*Cryptosporidium*, *Toxoplasma*			
Puževi		*Angiostrongylus*		
Lignje		*Anisakis*		
Voće i povrće (sirovo)	*Cyclospora, Cryptosporidium, Giardia*	*Angiostrongylus, Ascaris*	*Taenia solium, Echinococcus*	*Fasciola, Fasciolopsis*
Voda	*Cyclospora, Cryptosporidium, Giardia, Toxoplasma*	*Ascaris, Gnathostoma*	*Echinococcus*	*Fasciola, Fasciolopsis*

2.4.1. Hrana kao izvor parazita

Hrana je čest izvor parazita, posebice parazitskih oblića i praživotinja koji se na taj način mogu prenositi na druge organizme koji konzumiraju zaraženu. Prema Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC), u SAD-u su najčešće praživotinje koje mogu biti potencijalno prisutne u hrani su rod *Cryptosporidium* sp., vrste *Giardia intestinalis*, *Cyclospora cayetanensis* i *Toxoplasma gondii.* Najučestalije infekcije hranom a čiji predstavnici dolaze iz skupine oblića i trakavice su vrste roda *Trichinella* sp., *Anisakis simplex*, *Diphyllobothrium latum* i *Taenia* sp.. Parazitoze su češće u zemljama u razvoju, posebno područja poput Središnje i Južne Amerike, Afrike i dijelu Azije nego u SAD-u, Kanadi, Europi, Australiji, Novom Zelandu, Japanu. Razlog ovomu je način specifična priprema hrane koja podrazumijeva korištenje sirove ribe, mekušaca i rakovica u jelovnicima a koji mogu sadržavati infektivne oblike parazita (CDC, 2015).

Meso i riba mogu sadržavati ličinke trakavica koje se mogu razviti u odrasle jedinke u probavnom traktu čovjeka. Najpoznatije su trakavice svinjska (*Taenia solium*) i goveđa (*Taenia saginata*). Ozbiljne probleme mogu izazvati i jajašca svinjske trakavice koje nakon razvoja u crijevima mogu dospjeti u druge dijelove tijela, uključujući mišiće i mozak. Ovo stanje nazivamo cisticerkoza, a prati ga nastajanje mjehurića (cisticerkusa) s invaginiranim skoleksom trakavice. Izvor zaraze također može biti sirovo voće i povrće, ako je kontaminirano vodom koja sadrži ljudski ili životinjski izmet. Voće i povrće se najčešće konzumira sirovo te iz tog razloga predstavlja rizik od zaraze. Jedan od razloga sve većeg broja parazitoza je i uvoz takvih namirnica iz zemalja koje još uvijek nemaju moderno razvijen inspekcijski i sanitarni sustav. Osim toga, u zadnje je vrijeme zbog očuvanja hranjivih sastojaka iz namirnice, sve više raširen trend konzumacije sirovog voća i povrća, mariniranog i dimljenog mesa (suhomesnati proizvodi) i ribe (sushi), što je posebno problematično. S obzirom na globalizaciju tržišta, preferencije potrošača, te dostupnost velikog broja novih proizvoda, na globalnoj se razini u idućih 20 godina očekuje porast potražnje mesa te namirnica koje se pripremaju sušenjem, kiseljenjem i dimljenjem te stoga ostaju sirove (Doyle, 2003; FAO/WHO, 2014).

2.4.2. Klimatske promjene i paraziti

Promjena klime mogla bi utjecati na evolucijski razvoj i opstanak gotovo svih živih bića na Zemlji što će direktno promijeniti bioraznolikost mnogih ekosustava, udio i kvalitetu vode, izvore hrane pa i naše zdravlje. S obzirom na kompleksnost i raznolikost parazita, učinak koji će izazvati klimatske promjene neće nužno za sve organizme biti isti, te će biti potrebna mnoga istraživanja kako bi predvidjeli koje će skupine parazita biti obuhvaćene.

Dosad je, generalno, uočeno kako sve veći porast temperature na globalnoj razini dovodi do povećanja infekcijskih bolesti te prijenosa njihovih uzročnika. Globalno zagrijavanje povećava potencijal za širenje tropskih parazitskih infekcija, osobito parazita roda *Plasmodium* sp., *Leishmania* sp. i *Trypanosoma* sp.. Primjer vektora, tj. prenositelja čiji se spektar proširuje, uključuje rodove komaraca *Anopheles*, *Aedes* i *Culex*, krpelja i stjenice iz roda *Triatoma*. Ako se globalno zatopljenje nastavi, temperature jezera će porasti, a zime ublažiti, te potencijalno stvoriti podlogu za unos parazita iz toplijih krajeva u područja koja nisu njihovo prirodno stanište (Doyle, 2003; Garcia, 2009).

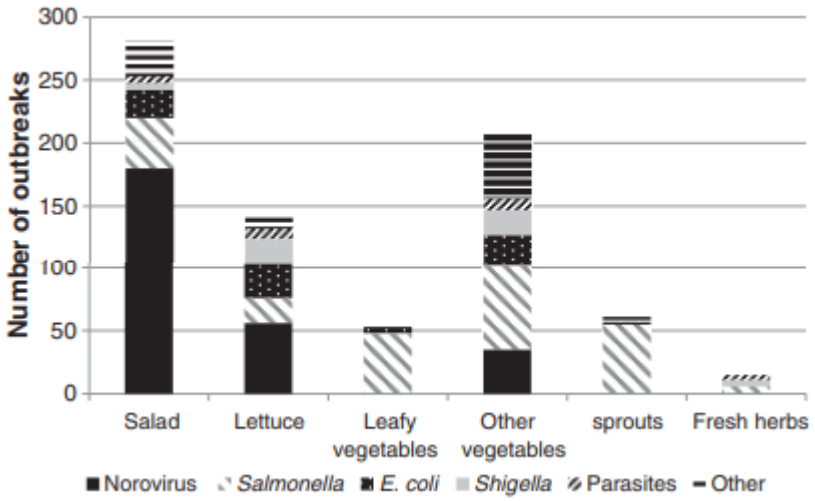
Porast temperature zraka te porast količine padalina, mogli bi značiti i lakše razmnožavanje za pojedine vrste (Utaaker i Robinson, 2014). Primjerice, istraživanje koje su proveli Lal i sur. (2013), ukazuje na pozitivnu korelaciju temperature i padalina te prijenosa cisti parazita iz roda *Giardia* sp. i oocisti roda *Cryptosporidium* sp.

2.4.3. Strategija smanjenja rizika – kontrola proizvodnje

Unatoč primjeni Dobre proizvođačke prakse (DPP) te HACCP plana, te su se mjere, u nekim slučajevima, pokazale nedostatne za potpunu eliminaciju opasnosti vezane uz uzročnike bolesti (WHO/FAO, 2014).

Tijekom obrade namirnica najveću opasnost predstavljaju bakterije *Listeria monocytogenes*, *Shigella, Escherichia coli* i *Salmonella,* ali veliku opasnost predstavljaju i virusi, paraziti, kvasci i plijesni (**Slika 3**). Treba naglasiti kako na mikrobiološku i parazitsku ispravnost gotovog proizvoda mogu utjecati i stvari kao što su mjere opreza prilikom branja, rukovanje namirnicama, kvaliteta vode i tla, kontaminirana oprema, metode procesiranja, ambalaža ili način transporta. Najbolja metoda je prevencija kontaminacije, no to nije uvijek moguće.

Prilikom prerade voća i povrća dolazi do oštećenja tkiva koje povećava rizik od kontaminacije namirnica. Postupci kojima se nastoji smanjiti kontaminacija mehanički procesuiranog voća i povrća uključuju isipranje hipokloritom, vodikovim peroksidom, organskim kiselinama, toplom vodom te ozonom za sanitaciju i dezinfekciju, zatim korištenje antimikrobnih jestivih filmova i prevlaka te skladištenje i pakiranje u kontroliranoj i modificiranoj atmosferi (Jideani i sur., 2017). Osim navedenoga, prirodni konzervans nizin koji proizvodi bakterija *Lactococcus lactis* može se koristiti kako bi se inhibirao rast uglavnom gram pozitivnih bakterija (Arevalos-Sánchez i sur., 2012).



Slika 2 Broj epidemija u ovisnosti o vrsti patogene i tipu namjernice (Ramos i sur., 2013)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog istraživanja bio je ispitati mikrobiološku i parazitsku ispravnost uzoraka gotovih salata („fresh-cut“ salata) iz trgovačkih lanaca na području grada Osijeka tijekom svibnja i srpnja 2020. godine. Svaki mjesec uključivao je 20 uzoraka različitih salata u kojima se određivao sastav mikrobne populacije, prisutnost patogenih mikroorganizama i parazitskih oblika. Sav istraživački rad provodio se u laboratorijima Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u Osijeku.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorci salata kupljeni su u trgovačkim centrima na području grada Osijeka. Ispitivanje je provedeno na ukupno 40 uzoraka „fresh-cut“ salata. Uzorci su uključivali matovilac, radič, rukolu, baby špinat, zelenu salatu, iceberg salatu, endiviju, mrkvu, korijen celera, crveni i bijeli kupus i ciklu.

3.2.2. Priprema uzoraka za mikrobiološke analize i pregled na parazite

Za mikrobiološku analizu i pregled na parazite odvagano je 60 g uzorka u sterilnu vrećicu za stomaher. Zatim je, u sterilnim uvjetima, uliveno 300 mL fiziološke otopine te homogeniziran svaki uzorak 60 sekundi (**Slika 4**). Nakon homogenizacije uzoraka napravljene su mikrobiološke analize, a potom su vrećice oblikovane u konusni položaj i ostavljene na sedimentaciji 24 sata na sobnoj temperaturi.



Slika 3 Homogenizacija uzoraka salate (fotografija autora)

Nakon 24 sata sedimentacije, dno vrećica probušeno je iglom, a 10 mL uzorka sakupljeno je u konusnu epruvetu. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3500-3700 rmp pri sobnoj temperaturi. Po završetku centrifugiranja otpipetiran je višak tekućine i ostavljeno oko 2-3 mL taloga koji je dalje upotrijebljen za mikrobiološko bojenje i pretragu na parazite.

Preparati za mikrobiološku analizu pripremljeni su „Kinyoun carbol fuchsin“ bojenjem (**Slika 5**) (www.dalynn.com, 2015). Za svaki uzorak rađena su dva ponavljanja.

Na središte čiste predmetnice otpipetirano je 10 µL uzorka i razmazano mikrobiološkom ušicom te ostavljeno da se osuši na zraku. Nakon sušenja uzorak je fiksiran unošenjem predmetnice u plamen špiritne lampe 10 puta i ostavljen da se ohladi.

Zatim je fiksirani razmaz prekriven Kinyuon carbol fuchsin bojom i ostavljen da djeluje 2 minute (www.dalynn.com, 2015). Nakon isteka vremena preparat je ispran vodom. Nakon ispiranja vodom, preparat je obezbojen zakiseljenim etanolom 3-5 sekundi, do nestanka crvene boje. Nakon ispiranja, preparat je obojen metilenskim plavilom 30 sekundi, ispran vodom, te ostavljen na sušenju na zraku. Na kraju su osušeni preparati mikroskopirani objektivom uljne imerzije.



Slika 4 „Kinyoun carbol fuchsin“ bojenje (fotografija autora)

3.2.3. Mikrobiološka analiza

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 nacjepljivanjem inokuluma bez preduzgoja u puferiranoj peptonskoj vodi. Na taj način se određuje 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 uzorka, 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, nacijepljene 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

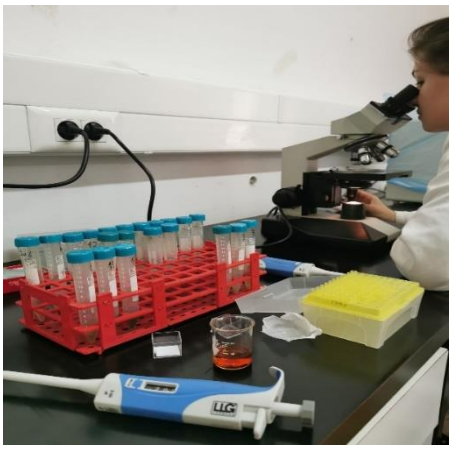
Početno pripremljeno razrjeđenje je pasterizirano pri 80°C tijekom 10 minuta u vodenoj kupelji. Nakon pasterizacije i hlađenja, 0,1 mL inokuluma je unesen do dna epruvete sa sterilnim SPS agarom (SPS agar, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija) i pažljivo ispuhan. Nakon skrutnjavanja podloge, epruvete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

Kvasci i plijesni

Broj kvasaca i plijesni, u analiziranim uzorcima svježe narezanih salata, je određen prenošenjem inokulma 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 pipetirano 30 µL uzorka. Nakon dodatka 20 µL lugola, uzorak je promiješan nastavkom pipete i pokriven pokrovnicom. Svaki uzorak analiziran je u dva ponavljanja u ukupnom povećanju 200×, a po potrebi na 400× (**Slika 6**) (El Said Said, 2012).



Slika 5 Pretraga na parazite (fotografija autora)

3.2.5. Obrada rezultata

Dobiveni rezultati obrađeni su u programu MS Office Excel.

4. REZULTATI I RASPRAVA

„Fresh-cut“ salate podvrgnute su minimalnom procesiranju što uključuje rezanje, pranje i pakiranje, a njihova nutritivna vrijednost leži u primarnim karakteristikama svježine što ih čini pogodnim za konzumaciju. Da bi se osigurao produženi vijek trajanja i očuvala svježina gotovih salata potrebno ih je proizvoditi u okviru Dobre poljoprivredne prakse, Dobre proizvođačke prakse i potrebnih sanitarnih uvjeta. Današnje tržište hrane je oživljeno novim proizvodima i trendovima koji se mijenjaju, a svježe rezano povrće ostaje pri vrhu popisa proizvoda koji zadovoljavaju potrebe današnjih užurbanih potrošača (Lamikanra, 2002). No, baš iz razloga minimalnog procesiranja ova hrana može biti izvor različitih bakterijskih, gljivičnih, parazitskih ili virusnih patogena koji mogu uzrokovati različite bolesti kod potrošača. U uzorcima salata nisu uočeni životni oblici parazita ali je zabilježena prisutnost artefakata različitog podrijetla. Artefakti biljnog podrijetla su pripadali polenovim zrncima i škrobu dok su dijelovi tijela kukaca, jajašca kukaca i fitoparazitski oblići pripadali životinjskim artefaktima. Također, uočena je prisutnost spora roda *Alternaria* sp. Spore roda *Alternaria* prenose se zrakom, a vremenski uvjeti poput visoke temperature i niske vlage tijekom ljeta doprinose manjoj količini spora, dok se u kišnoj sezoni koncentracija spora značajno povećava (Kakde, 2012). Do istih rezultata došli su Ahire i Sangale (2012) koji su utvrdili da umjerena temperatura, visoka relativna vlaga i blage kiše pogoduju širenju spora. Mnoge spore roda *Alternaria* u hrani mogu se razviti kao posljedica neadekvatnog skladištenja i transporta. Njihovu razvoju najbolje pogoduje temperatura od 22-28°C, no mogu rasti i na manjoj temperaturi ovisno o uvjetima i načinu skladištenja i transporta (Barkai-Golan, 2008). Za razliku od roda *Alternaria*, pronađeni oblići ne predstavljaju opasnost za čovjeka. Radi se o ektoparazitskim oblićima koji žive u tlu. Ovi oblići mogu najčešće napadaju korijenov sustav uzrokujući smanjenje površine i moć upijanja (Singh i sur., 2013). U tlu žive i oblići koji se hrane sjemenkama te oni koji žive na nadzemnim dijelovima biljke. Oblići u svježe voće i povrće mogu dospjeti za vrijeme uzgoja, berbe, transporta te nedovoljnim ispiranjem (Elahi i sur., 2018; Kozan i sur., 2005). Međutim, osim fitoparazitskih oblića, u svježim salatama moguće je pronaći i zooparazitske obliće koji u tlu sazrijevaju do pojave infektivnosti (Gullino i sur., 2019; Khademvatan, 2013). U **Tablici 3** prikazana je zastupljenost artefakata i spora roda *Alternaria* sp. s obzirom na sastav salate na svim lokacijama tijekom svibnja i srpnja 2020. Iz priloženih rezultata može se uočiti da je bilo obrađeno 44 uzoraka salate od toga 21 uzorak salate jedne vrste te 23 uzoraka miješanih.

U **Tablici 4** prikazana je zastupljenost artefakata i plijesni roda *Alternaria* prema načinu pakiranja salate na svim lokacijama tijekom svibnja i srpnja 2020. Bilo je obrađeno 19 uzoraka cjelovitih salata, od čega je najviše spora roda *Alternaria* pronađeno u uzorcima matovilca (8), a jedna spora u uzorku rukole. Salata od špinata imala je najviše artefakata (39 od ukupno 78). Od 25 uzoraka narezanih salata, rod *Alternaria* zabilježen je samo u mješavini salata (Mix-endivija, radič, matovilac, rukola, špinat). Na temelju rezultata prikazanih u **Tablici 3** i **4**, vidljivo je da je broj spora roda *Alternaria* sp. bio veći u jednoj vrsti salate (42,86%) te pakiranjima cjelovitih salata (47,37%) u odnosu na pakiranja koja su sadržavala različite vrste salata (8,70%) te narezane salate (8%). Veći broj spora vjerojatno je posljedica veće površine za razliku od narušene teksture narezanih i miješanih salata koja je nepovoljna za umnožavanje i rast plijesni. Također, cjelovite lisne plojke sadrže puno utora koji potječu od puči te lisnih žila što omogućuje zadržavanje spora (Robertson i Gjerde, 2001). Veći postotak kontaminacije parazitskim elementima u lisnatom i neoštećenom povrću uočen je i u drugim istraživanjima (Damen i sur., 2007; Marček i sur., 2018; Uga i sur., 2009). Potpuno neočekivano, cjelovite i salate načinjene od jedne vrste povrća imale su manji broj artefakata (24,36 i 26,58%) nego miješane i narezane salate (38,33 i 51,02%), što može biti razlog povećanog naseljavanja spora i zauzimanja životnog prostora.

Tablica 3 Zastupljenost artefakata i plijesni roda *Alternaria* prema sastavu salate na svim lokacijama trgovačkih lanaca tijekom svibnja i srpnja 2020.

Jedna vrsta				Miješana			
Vrsta salate	**N**	**N (*Alternaria*)**	**N (Artefakti)**	**Vrsta salate**	**N**	**N (*Alternaria*)**	**N (Artefakti)**
Rukola	8	1	15	Dijetna salata (mrkva, crveni i bijeli kupus)	1	0	0
				Mrkva i kupus	1	0	2
Baby špinat	1	0	3	Mrkva i jabuka	1	0	1
				Iceberg, radič, mrkva, špinat	2	0	12
Matovilac	8	8	21	Mix (endivija, radič, matovilac, rukola, špinat)	5	2	11
Špinat	2	0	39	Romana (iceberg, endivija, radič, mrkva)	1	0	0
				Rica salata (radič, matovilac)	4	0	7
Crveni kupus	1	0	0	Endivija i radič	1	0	2
				Iceber mix (radič, mrkva, endivija, špinat)	3	0	12
Celer korijen	1	0	1	Rukola, matovilac, zelena i crvena salatina, špinat, cikla	4	0	13
Ukupno	21	9	79	Ukupno	23	2	60
Artefakti (%)		26,58		Artefakti (%)		38,33	
Alternaria (%)		42,86		*Alternaria* (%)		8,70	

N- ukupan broj određene vrste salate

N (*Alternaria*)- broj spora plijesni roda *Alternaria* sp.

N (artefakt)- broj artefakata u uzorku

Tablica 4 Zastupljenost artefakata i plijesni roda *Alternaria* prema načinu pakiranja salate na svim lokacijama trgovačkih lanaca tijekom svibnja i srpnja 2020.

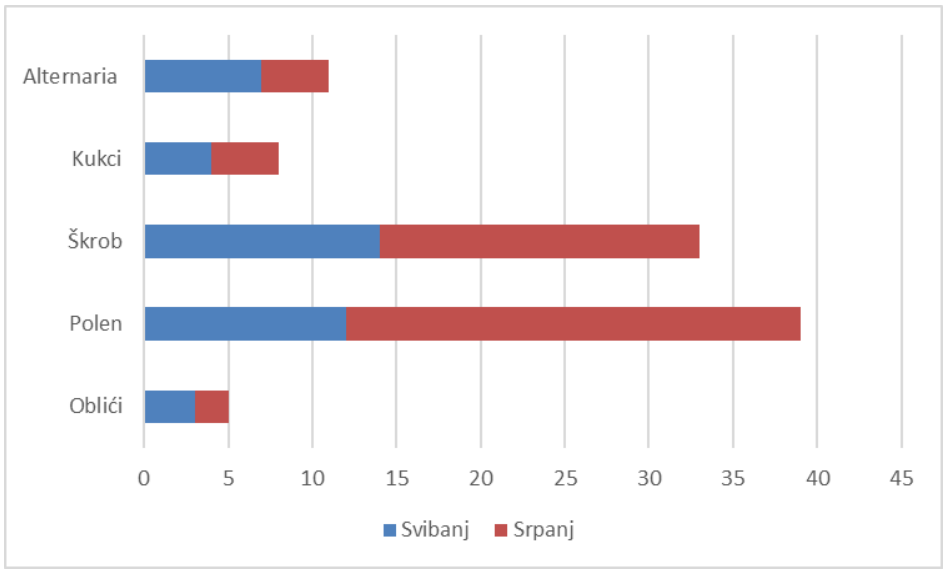
Cjelovite				Narezane			
Vrsta salate	**N**	**N (*Alternaria*)**	**N (Artefakti)**	**Vrsta salate**	**N**	**N (*Alternaria*)**	**N (Artefakti)**
Rukola	8	1	15	Dijetna salata (mrkva, crveni i bijeli kupus)	1	0	0
				Crveni kupus	1	0	0
				Mrkva i kupus	1	0	2
Matovilac	8	8	21	Celer korijen	1	0	1
				Mrkva i jabuka	1	0	1
				Iceberg, radič, mrkva, špinat	2	0	0
				Mix (endivija, radič, matovilac, rukola, špinat)	5	2	11
Baby špinat	1	0	3	Romana (iceberg, endivija, radič, mrkva)	1	0	0
				Rica salata (radič, matovilac)	4	0	7
				Endivija i radič	1	0	2
Špinat	2	0	39	Iceber mix (radič, mrkva, endivija, špinat)	3	0	12
				Rukola, matovilac, zelena i crvena salatina, špinat, cikla	4	0	13
Ukupno	19	9	78	Ukupno	25	2	49
Artefakti (%)		24,36		Artefakti (%)		51,02	
Alternaria(%)		47,37		*Alternaria* (%)		8,00	

N- broj uzoraka salate

N (*Alternaria*)- broj spora plijesni roda *Alternaria* sp.

N (artefakt)- broj artefakata u uzorku

Na **Slici 6** prikazana je zastupljenost artefakata u „ready to eat“ salatama prikupljenih u trgovačkim lancima u svibnju i srpnju 2020. U ispitivanom vremenskom periodu nije potvrđen niti jedan parazitski element. Uzorci iz srpnja imali su 40% više artefakata nego u svibnju iste godine. U srpnju je zabilježeno 35,7% više škrobnih te 125% više peludnih zrnaca u odnosu na svibanj. Ovo može biti posljedica intenzivnije cvatnje zeljastih biljaka koje se nalaze bliže tlu, čime pelud može lakše dospjeti do povrća. Također, povećanjem temperature zraka raste aktivnost i broj populacije kukaca oprašivača što povećava vjerojatnost povećane transmisije i broja zrnaca zbog čega je u srpnju veća koncentracija peludi u salatama nego u svibnju. Veći broj parazita i artefakata u gotovim salatama tijekom ljeta zabilježen je i u drugim istraživanjima (El Said Said, 2012).

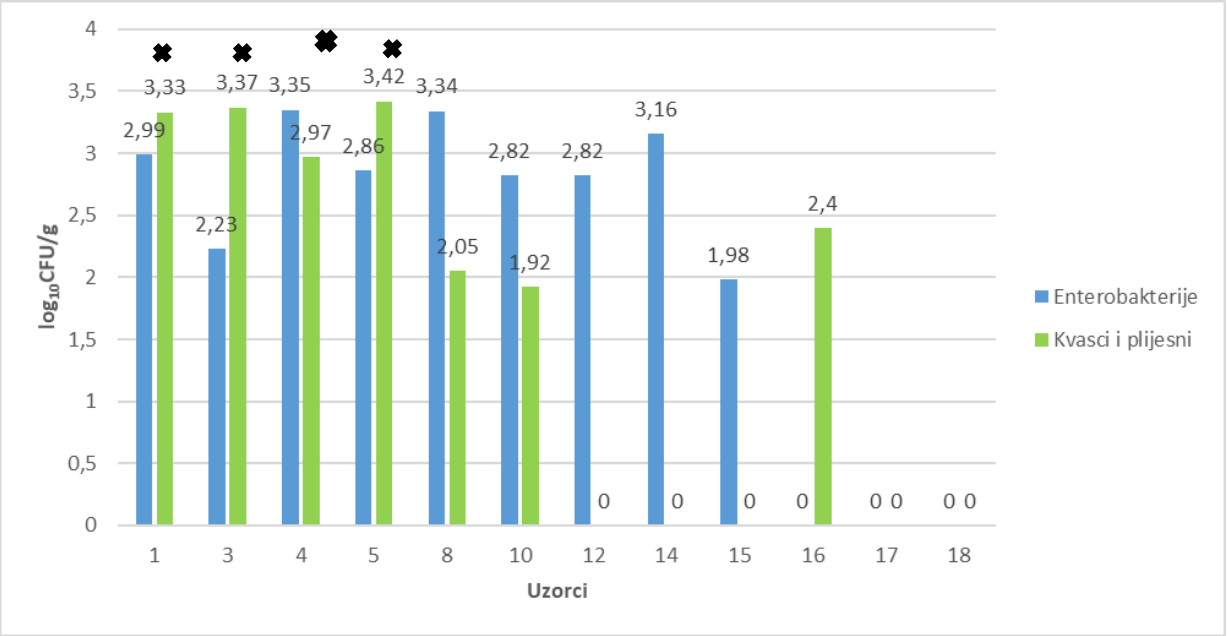


Slika 6 Prikaz artefakata zastupljenih u „ready to eat“ salatama prikupljenih u trgovačkim lancima za svibanj i srpanj 2020. godine

U Italiji je provedeno slično istraživanje u kojemu je bio cilj utvrditi postojanje parazitskih praživotinja u „ready to eat“ salatama na rasprodaji (Caradonna i sur., 2017). Od ukupno 648 pakiranja, u 4,2% uzoraka pronađena je barem jedna vrsta praživotinja, dok je 0,6% uzoraka bilo kontaminirano s dvije vrste praživotinja. Sezonska varijacija pokazala je najveću zastupljenost vrstu *Toxoplasma gondii* tijekom ljeta, tijekom jeseni najčešća vrsta bila je *Giardia duodenalis*, a tijekom proljeća i jeseni najrasprostranjenija vrsta je bila *Cyclospora cayetanensis.* Udio spora roda *Alternaria* u srpnju bio je za 43% manji nego u svibnju iz čega se može pretpostaviti da je porast temperature zraka inhibirao rast plijesni. Prema nekim autorima germinacija spora roda *Alternaria* opada s porastom temperature zraka (Barkai-Golan, 2008; Dagno i sur., 2010). Bez obzira što salate s područja grada Osijeka nisu bile pozitivne na parazite, one mogu biti potencijalno opasne jer su odmah spremne za jelo.

Na **Slici 7** prikazan je broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae* te broj kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u svibnju kojima nije prošao rok trajanja. Može se vidjeti da je 9 od 12 uzoraka kontaminirano enterobakterijama, a 7 od 12 kontaminirano kvascima i plijesnima. Broj enterobakterija kreće se od 1,98 $\log_{10}$ CFU/g pa sve do 3,35 $\log_{10}$ CFU/g, što je i najveći broj kolonija ovih bakterija pronađen u uzorcima za mjesec svibanj. Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu određena je granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim te za bakterije porodice *Enterobacteriaceae* ona iznosi

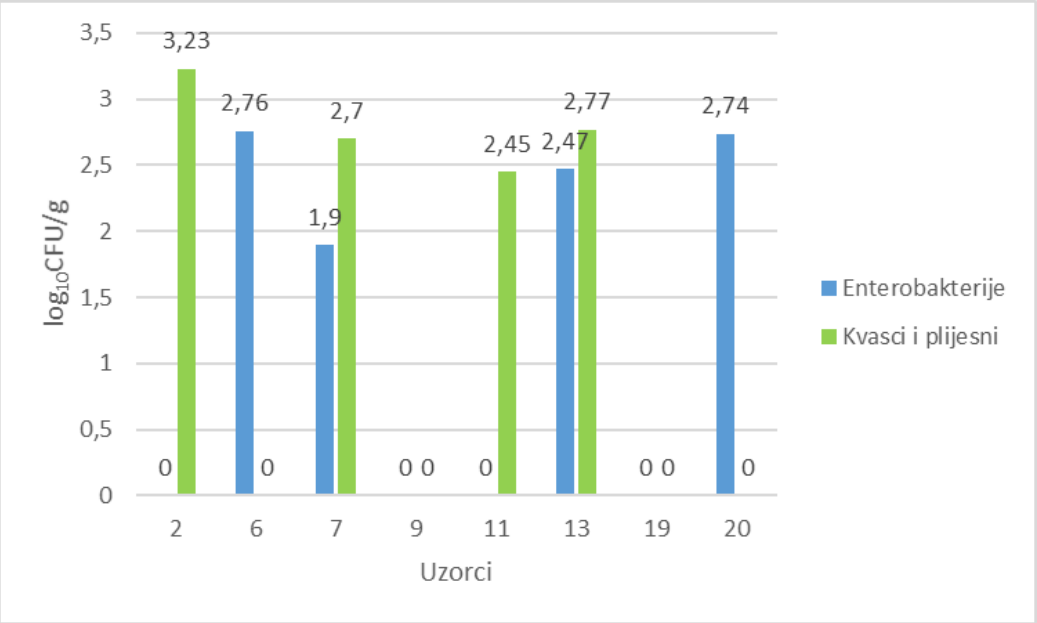
10^3 CFU/g, iz toga možemo zaključiti da 3 uzorka prelaze tu graničnu vrijednost stoga se oni smatraju mikrobiološki neispravnima. Što se tiče kvasaca i plijesni, njihov broj kreće se od 1,92 $\log_{10}$CFU/g do 3,42 $\log_{10}$ CFU/g u uzorcima za mjesec svibanj. Granična dopuštena vrijednost za kvasce i plijeni na povrću iznosi također 10^3 CFU/g, iz čega možemo vidjeti da 3 uzorka prelaze tu granicu i smatraju se nezadovoljavajućima prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu. U uzorcima analiziranim u svibnju nisu pronađene bakterije roda *Salmonella*, bakterije vrste *Staphylococcus aureus* niti sulfitoreducirajuće klostridije.



*- uzorci označeni zvjezdicom nemaju podatke o roku trajanja

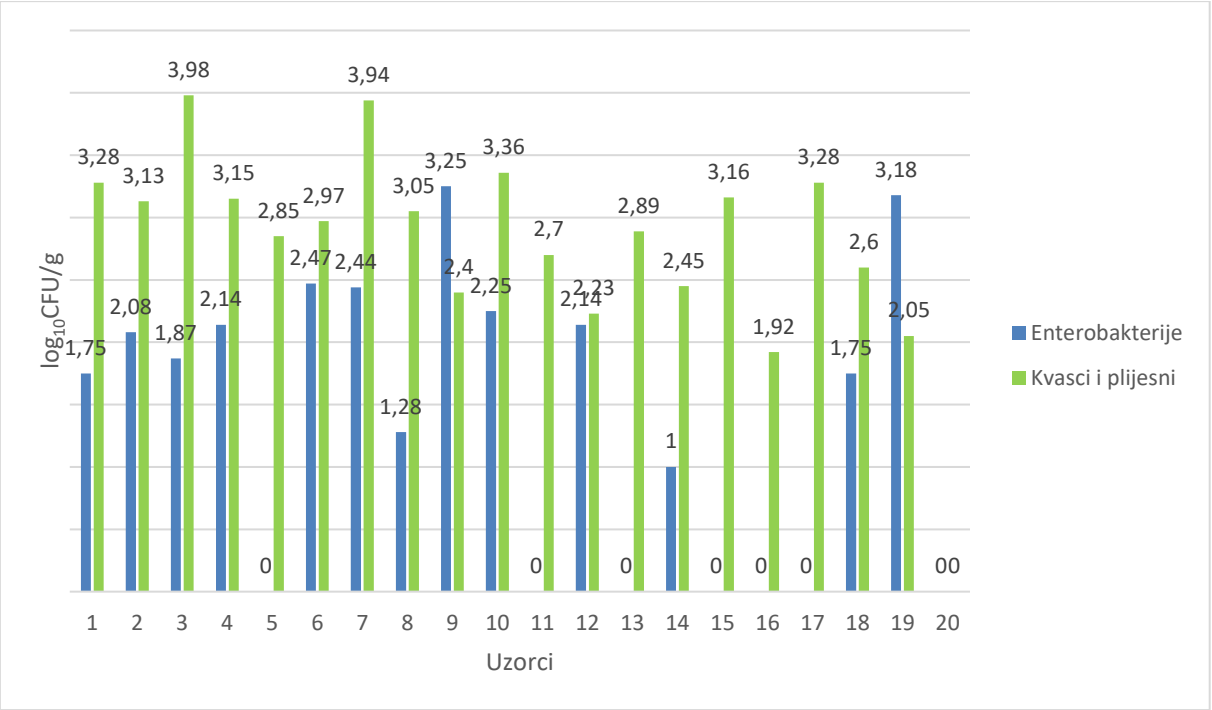
Slika 7 Broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u mjesecu svibnju 2020. godine kojima nije prošao rok trajanja

Na **Slici 8** prikazan je broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u mjesecu svibnju kojima je prošao rok trajanja. Broj enterobakterija kreće se od 1,9 $\log_{10}$ CFU/g do 2,76 $\log_{10}$ CFU/g, a broj kvasaca i plijesni kreće se od 2,45 $\log_{10}$ CFU/g do 3,23 $\log_{10}$ CFU/g. Prema prikazanim rezultatima vidljivo je da samo jedan uzorak prelazi graničnu dopuštenu vrijednost za kvasce i plijesni na povrću koja iznosi 10^3 CFU/g. S obzirom na rok trajanja gotovih salata iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je više zdravstveno neispravnih uzoraka upravo onih kojima nije prošao rok trajanja, što dovodi potrošače u opasnost.



Slika 8 Broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u mjesecu svibnju 2020. godine kojima je prošao rok trajanja

Slika 9 prikazuje broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae* i broj kvasaca i plijesni pronađenih u uzorcima analiziranim u mjesecu srpnju 2020. godine. Prema **Slici 9**, 13 od 20 uzoraka salata je kontaminirano enterobakterijama što je isto kao i u mjesecu svibnju, dok je 19 do 20 uzoraka kontaminirano plijesnima i kvascima te se iz toga može zaključiti da je došlo do porasta u odnosu na uzorke u mjesecu svibnju. Broj enterobakterija kreće se od 1,00 $\log_{10}$ CFU/g pa sve do 3,25 $\log_{10}$ CFU/g, što je i najveći broj kolonija ovih bakterija pronađen u uzorcima za mjesec srpanj. Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu određena je granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim, a za bakterije porodice *Enterobacteriaceae* ona iznosi 10^3 CFU/g, iz toga možemo zaključiti da 2 uzorka prelaze tu graničnu vrijednost stoga se oni smatraju mikrobiološki neispravnima. Broj kvasaca i plijesni u uzorcima iz srpnja kreće se između 1,92 $\log_{10}$ CFU/g do 3,98 $\log_{10}$ CFU/g, što je znatno povećanje u odnosu na mjesec svibanj. Skoro pola uzoraka 9/20 prelazi graničnu dopuštenu vrijednost broja kvasaca i plijesni na povrću koja iznosi 10^3 CFU/g, te se ti uzorci smatraju nezadovoljavajući prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu. U uzorcima analiziranim u srpnju nisu pronađene bakterije roda *Salmonella*, bakterije vrste *Staphylococcus aureus* niti sulfitoreducirajuće klostridije.



Slika 9 Broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u mjesecu srpnju 2020. godine (svi uzorci su ispravnog roka trajanja)

Slično istraživanje koje se također temelji na mikrobiološkoj analizi „fresh-cut" salata provedeno je u gradu Mashhad (Iran). Iz navedenog rada autora Habibi Najafi i Bahreini (2012) vidljivo je da su njihovi uzorci bili više kontaminirani u odnosu na uzorke uzete na području grada Osijeka. Broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae* u njihovim uzorcima kretao se između 3 $\log_{10}$ CFU/g do 8,3 $\log_{10}$ CFU/g , što je puno veći broj u odnosu na naše rezultate prikazane na **Slikama 7, 8** i **9** za enterobakterije. Broj kvasaca i plijesni u uzorcima uzetim u gradu Mashhad kretao se između 3,85 $\log_{10}$ CFU/g do 6,7 $\log_{10}$ CFU/g, a u uzorcima uzetim na području grada Osijeka najveći broj kvasaca i plijesni je bio 3,98 log CFU/g. Usporedbom ova dva rada daje se zaključiti da su uzorci „fresh-cut" salata iz Mashhada puno lošije mikrobiološke kvalitete nego uzorci uzeti na području grada Osijeka, što se vidi i iz toga što su svi njihovi uzorci bili kontaminirani enterobakterijama. Također, u njihovim uzorcima miješanih „fresh-cut" salata pronađene su bakterije *Staphylococcus aureus* koje su poznate kao patogen koji prenose ljudi koji rukuju hranom. Prisutnost ove bakterije indikator je loše higijenske prakse te je razina veća od 4 $\log_{10}$ CFU/g potencijalno opasna.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U ispitivanim salatama nije pronađen niti jedan parazitski element.
2. Cjelovite salate i salate načinjene od jedne vrste povrća, predstavljaju bolji supstrat za rast spora roda *Alternaria* sp. nego miješane i narezane.
3. Brojnost artefakata raste u narezanim salatama i salatama pripremljenim od nekoliko različitih vrsta povrća.
4. U uzorcima iz srpnja zabilježen je manji broj spora roda *Alternaria* sp. u odnosu na svibanj.
5. Salate uzorkovane u svibnju imale su manje artefakata nego salate analizirane u srpnju.
6. U uzorcima analiziranim u mjesecu svibnju pronađene su bakterije porodice *Enterobacteriaceae* te kvasci i plijesni.
7. Ukupno 7 uzoraka iz mjeseca svibnja nisu mikrobiološki ispravni te nisu pogodni za konzumaciju. Tri uzorka prelaze maksimalnu dopuštenu vrijednost za bakterije porodice *Enterobacteriaceae*, a četiri uzorka prelaze maksimalnu dopuštenu vrijednost za kvasce i plijesni.
8. Osam uzoraka analiziranih u mjesecu svibnju prošao je rok trajanja, od čega je samo jedan uzorak prelazio maksimalnu dopuštenu vrijednost za kvasce i plijesni.
9. Uzorci analizirani u mjesecu srpnju također su bili kontaminirani bakterijama porodice *Enterobacteriaceae* te kvascima i plijesnima.
10. Ukupno 11 uzoraka iz mjeseca srpnja nisu mikrobiološki ispravni te nisu pogodni za konzumaciju. Dva uzorka prelaze maksimalnu dopuštenu vrijednost za bakterije porodice *Enterobacteriaceae*, a devet uzoraka prelaze maksimalnu dopuštenu vrijednost za kvasce i plijesni.
11. U uzorcima analiziranim u svibnju i srpnju nisu pronađene bakterije roda *Salmonella*, bakterije vrste *Staphylococcus aureus* niti sulfitoreducirajuće klostridije.

6. LITERATURA

Ahire YR, Sangale MK: Survey of aeromycoflora present in vegetable and fruit market. *Elixir applied botany* 52:11381-11383, 2012.

Al-Kharousi Z, Guizani N, Al-Sadi AM, Al-Bulushi IM, Shaharoona B: Hiding in fresh fruits and vegetables: Opportunistic pathogens may cross geographical barriers. *International journal of microbiology* 2016:1-14, 2016.

Arevalos-Sánchez M, Regalado C, Martin SE, Domínguez-Domínguez J, García Almendárez BE: Effect of neutral electrolyzed water and nisin on *Listeria monocytogenes* biofilms, and on listeriolysin O activity. *Food control* 24:116-122, 2012.

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 [08. 02. 2021.]

Benedict K, Chiller TM, Mody RK: Invasive fungal infections acquired from contaminated food or nutritional supplements: A review of the literature. *Foodborne pathogens and disease* 13:343-349, 2016.

Beuchat LR: Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of food protection* 59:204-216, 1996.

Buck JW, Walcott RR, Beuchat LR: Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables*. Plant health progress* 4, 2003.

Cantwell M, Suslow T: *Fresh-cut fruits and vegetables*: Aspects of physiology, preparation and handling that affect quality. U *Postharvest technology horticultural crops*, str. 445-464. University of California Agriculture and Natural Resources, Davis, 2002.

Caradonna T, Marangi M, Del Chierico F, Ferrari N, Reddel S, Bracaglia G, Normanno G, Putignani L, Giangaspero A: Detection and prevalence of protozoan parasites in ready-to-eat packaged salads on sale in Italy. *Food microbiology* 67:67-75, 2017.

CDC, Center for Disease Control and Prevention: *Staphylococcus aureus in healthcare settings.* CDC, 2011. https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html [30.11.2020.]

CDC, Center for Disease Control and Prevention: *Parasites.* CDC, 2015. https://www.cdc.gov/parasites/food.html [02. 11. 2020.]

Dagno K, Lahlali R, Diourte´ M, Jijakli MH: Effect of temperature and water activity on spore germination and mycelial growth of three fungal biocontrol agents against water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of applied microbiology* 110:521-528, 2010.

D'Agostino M, Cook N: Foodborne pathogens. U *Encyclopedia of food and health,* str. 83-86. Academic press, London, 2016. https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/enterobacteriaceae [04. 11. 2020.]

Damen JG, Banwat EB, Egah DZ, Allanana JA: Parasitic contamination of vegetables in Jos, Nigeria. *Annals of African medicine* 6:115-118, 2007.

Dauthy ME: *Food and agriculture organization of the United Nations*. FAO Agricultural services bullet in no. 119, Rim, 1995.

Doyle ME: *Foodborne Parasites: A review of the scientific literature review*. FRI Briefings, University of Wisconsin-Madison, 2003. https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/parasites.pdf [4.1.2021.]

Elahi R, Kheirabadi YP, Ahmadi N, Gholamalizade M, Dehkodi HA: The effect of washing procedures on contamination of raw vegetables with nematodes larvae. *Asian journal of pharmaceutics* 12:498-502, 2018.

El Said Said D: Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria journal of medicine* 48:345-352, 2012.

FAO/WHO, Food and agriculture organization of the United Nations/World Health Organization: *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites*. FAO, WHO, Rim, 2014.

FDA, Food and Drug Administration: *Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook.* FDA, CFSAN, Giza, 2012.

FDA, U.S. Food and Drug Administration: *Outbreak investigation of cyclospora: Bagged salads*. FDA, 2020. https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-cyclospora-bagged-salads-june-2020 [30. 10. 2020.]

Gajadhar AA: Parasites transmitted by food. U *Foodborne parasites in the food supply web*, str. 4-6. Woodhead Publishing, Sawson, 2015.

Garcia LS: Practical guide to diagnostic parasitology. ASM Press, Washington, 2009.

Gullino ML, Gilardi G, Garibaldi A: Ready-to-eat salad crops: A plant pathogens heaven. U *Plant disease* 103:2153-2170, 2019.

Habibi Najafi MB, Bahreini M: Microbiological quality of mixed fresh-cut vegetable salads and mixed ready- to-eat fresh herbs in Mashhad, Iran. *International proceedings of chemical, biological and environmental engineering* 39:62-66, 2012.

IFPA, PMA, International fresh-cut produce association/The produce marketing association: *Handling guidelines for the fresh-cut produce industry.* IFPA, Alexandria, 1999.

Jideani AIO, Anyasi TA, Mchau GRA, Udoro EO, Onipe OO: Processing and preservation of fresh-cut fruit and vegetable products. U *Postharvest handling,* str. 48-63. InTech, London, 2017.

Kakde UB, Kakde HU: Incidence of post-harvest disease and airborne fungal spores in a vegetable market. *Acta botanica Croatica* 71:147:157, 2012.

Kalenić S, Bedenić B, Bošnjak Z: Enterobakterije. U *Medicinska mikrobiologija,* str. 182-200. Medicinska naklada, Zagreb, 2013.

Khademvatan S: Prevalence of intestinal parasites in vegetables consumed. *Journal of medical science* 13:488-492, 2013.

Klapec T, Šarkanj B, Marček T: *Opasnosti vezane uz hranu*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.

Koukkidis G, Freestone P: Salmonella contamination of fresh salad produce: prevalence, impact and reduction strategies. *Journal of horticultural science and crop research* 1:102, 2018.

Kozan E, Gonenc B, Sarimehmetoglu O, Aycicek H: Prevalence of helminth eggs on raw vegetables used for salads. *Food control* 16:239-242, 2005.

Lal A, Baker MG, Hales S, French NP: Potential effects of global environmental changes on cryptosporidiosis and giardiasis transmission. *Trends in parasitology* 29:83-90, 2013.

Lamikanra O: Fresh-cut produce: Tracks and trends. U *Fresh-cut fruits and vegetables. science, technology, and market*. CRC Press, Boca Raton, 2002. https://sceqa.files.wordpress.com/2012/05/frutas-y-vegetales-ciencia-y-tecnologia.pdf [04. 12. 2020.]

Lee SC, Billmyre RB, Li A, Carson S, Sykes SM, Huh EY, Mieczkowski P, Ko DC, Cuomo CA, Heitman J: Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *mBio*, 8;5:e0139-14, 2014.

Levinson W: Parasitology. U *Review of medical microbiology and immunology*, str. 915-1053. McGraw-Hill Education, New York City, 2014. https://lib-ebooks.com/review-of-medical-microbiology-and-immunology-13th-edition/ [7. 12. 2020.]

Marček T, Čorluka S, Gložinić M, Jažić E, Radman P, Sučić M, Ižaković M, Banjari I: A Comparative survey on the prevalance of parasite elements in fresh vegetables and ready-to-eat salads. *Food in health and disease* 7:26-30, 2018.

Marinculić A, Habrun B, Barbić Lj, Beck R: *Biološke opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek, 2009.

Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R, Oms-Oliu G: Fresh-Cut Fruits. U *Handbook of fruits and fruit processing*, str. 129-144. Blackwell Publishing, Ames, 2006.

Massaglia S, Merlino VM, Borra D, Bargetto A, Sottile F, Peano C: Consumer attitudes and preference exploration towards fresh-cut salads using best-worst scaling and latent class analysis. *Foods* 8:568, 2019.

Medveďová A, Valík L: Staphylococcus aureus: Characterisation and quantitative growth description in milk and artisanal raw milk cheese production. U *Structure and function of food engineering*, str. 71-102. IntechOpen, London, 2012. https://www.intechopen.com/books/structure-and-function-of-food-engineering/staphylococcus-aureus-characterisation-and-quantitative-growth-description-in-milk-and-artisanal-raw [30.11.2020.]

Mehlhorn H: *Human parasites: Diagnosis, treatment, prevention*. Springer Spektrum, Dusseldorf, 2016.

Olmez H: Foodborne pathogenic bacteria in fresh-cut vegetables and fruits. U *Food hygiene and toxicology in ready to eat foods*, str. 151-166. Academic press, London, 2016. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128019160000091 [4.12.2020.]

Osaili TM, Alaboudi AR, Al-Quran HN, Al-Nabulsi AA: Decontamination and survival of Enterobacteriaceae on shredded iceberg lettuce during storage. *Food microbiology* 73:129-136, 2018.

Ramos B, Miller FA, Brandão TRS, Teixeira P, Silva CLM: Fresh fruits and vegetables—An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative food science & emerging technologies* 20:1-15, 2013.

Robertson LJ, Gjerde B: Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of food protection* 64:1793-1798, 2001.

Slavin JL, Lloyd B: Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in nutrition* 3:506-516, 2012.

Singh SK, Hodda M, Ash GJ: Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *EPPO Bulletin* 43:334-374, 2013.

Uga S, Hoa NT, Noda S, Moji K, Cong L, Aoki Y, Rai SK, Fujimaki Y: Parasite egg contamination of vegetables from a suburban market in Hanoi, Vietnam. *Nepal Medical College Journal* 11:75-78, 2009.

Utaaker SK, 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, 2014.

Vlaemynck G: Značaj patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku. *Mljekarstvo* 46:216-231, 1996.

Watada AE, Qi L: Quality of fresh-cut produce. *Postharvest biology and technology* 15:201-205, 1999.

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.

Yousuf B, Deshi V,Ozturk B, Siddiqui MW: Quality issues and safety concerns. U *Fresh-cut fruits and vegetables*, str. 1-15. Academic press, London, 2020.

ZZJZD, Zavod za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije: *Enterobacteriaceae (enterobakterije)*, 2020. https://www.zzjzdnz.hr/hr/o-nama/rjecnik-pojmova/962 [29.11.2020.]

https://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/SK50.pdf?fbclid=IwAR1KkBNNrb-J1ssvFhCP98QxxD5YbVHDG3yi1yrX9hehrpjPrnuQc9U_f6c [10.12.2020.]

POPIS SLIKA

Slika 1 Klasifikacija parazita (prilagođeno iz Levinson, 2014) 15

Slika 2 Broj epidemija u ovisnosti o vrsti patogene i tipu namjernice (Ramos i sur., 2013) 19

Slika 3 Homogenizacija uzoraka salate (fotografija autora) 22

Slika 4 „Kinyoun carbol fuchsin“ bojenje (fotografija autora) 23

Slika 5 Pretraga na parazite (fotografija autora) 25

Slika 6 Prikaz artefakata zastupljenih u „ready to eat“ salatama prikupljenih u trgovačkim lancima za svibanj i srpanj 2020. godine 32

Slika 7 Broj bakterija porodice *Enterobacteriaceae*, kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u mjesecu svibnju 2020. godine kojima nije prošao rok trajanja 33

Slika 8 Broj bakterija porodice Enterobacteriaceae, kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u mjesecu svibnju 2020. godine kojima je prošao rok trajanja 34

Slika 9 Broj bakterija porodice Enterobacteriaceae, kvasaca i plijesni u uzorcima analiziranim u mjesecu srpnju 2020. godine (svi uzorci su ispravnog roka trajanja) 35

POPIS TABLICA

Tablica 1 Globalne epidemije povezane s povrćem kontaminiranim Salmonellom (Koukkidis i **Freestone**, 2018) 11

Tablica 2 Paraziti u hrani (Doyle, 2003)..... 16

Tablica 3 Zastupljenost artefakata i plijesni roda *Alternaria* prema sastavu salate na svim lokacijama trgovačkih lanaca tijekom svibnja i srpnja 2020. 30

Tablica 4 Zastupljenost artefakata i plijesni roda *Alternaria* prema načinu pakiranja salate na svim lokacijama trgovačkih lanaca tijekom svibnja i srpnja 2020. 31