

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Gašper SVETELJ

ADHEZIJA BAKTERIJ VRST
Listeria monocytogenes* IN *Escherichia coli
NA ZELENOLISTO (*Lactuca sativa* L.)

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Gašper SVETELJ

ADHEZIJA BAKTERIJ VRST
Listeria monocytogenes* IN *Escherichia coli
NA ZELENO SOLATO (*Lactuca sativa* L.)

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

ADHESION OF
Listeria monocytogenes* AND *Escherichia coli
ON GREEN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil ter Katedri za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Barbko Jeršek, za somentorja prof. dr. Rajka Vidriha in za recenzentko prof. dr. Nino Kacjan Maršič.

Mentorica: prof. dr. Barbka Jeršek

Somentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Recenzentka: prof. dr. Nina Kacjan Maršič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Gašper Svetelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.67:635.52:614.31(043)=163.6
KG	patogene bakterije/ <i>Listeria monocytogenes</i> / <i>Escherichia coli</i> /adhezija bakterij/mikrobiota/zelena solata / <i>Lactuca sativa</i> L./kemijske analize/inokulacija/kontaminacija površin/izpiranje
AV	SVETELJ, Gašper, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
SA	JERŠEK, Barbka (mentorica)/VIDRIH, Rajko (somentor)/KACJAN MARŠIČ, Nina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2017
IN	ADHEZIJA BAKTERIJ VRST <i>Listeria monocytogenes</i> IN <i>Escherichia coli</i> NA ZELENOLATO (<i>Lactuca sativa</i> L.)
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
OP	XI, 95 str., 16 pregl., 28 sl., 116 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen dela je bil oceniti adhezijo bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> na liste zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.). Bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> so po kontaminaciji solatnih listov na njih dobro rastle in se adherirale pri 12 °C ($4,3 \pm 0,1$ log cfu/g po 1 dnevu, $5,3 \pm 0,2$ log cfu/g po 9 dneh). Podoben trend adhezije smo zaznali pri bakterijah vrste <i>E. coli</i> ($5,1 \pm 0,1$ log cfu/g po 1 dnevu, $6,4 \pm 0,2$ log cfu/g po 9 dneh). V nadaljnjih preiskavah so se bakterije vrste <i>E. coli</i> bolje adherirale na neoprane, kot na oprane solatne liste. Glede na dobljene rezultate, smo predvidevali, da ima površina solate dovolj ustreznih hranilnih snovi, ki omogočajo bakterijam vrste <i>E. coli</i> adhezijo in rast na solatnem listu. Dobro rast bakterij smo potrdili v vodnem izpirku solatne površine, saj so bakterije vrste <i>E. coli</i> iz začetnega števila $5,35 \pm 0,02$ log cfu/ml v 2 dneh dosegle koncentracijo $7,15 \pm 0,03$ log cfu/ml. Kemijske analize sladkorjev (glukoza, fruktoza, saharoza) sveže solate in solate med skladiščenjem pri 12 °C so pokazale, da se vsebnosti le-teh zmanjšujejo. Sladkorje smo določili tudi na sami površini solatnih listov, to je v vodnem izpirku solatne površine (glukoza $0,215 \pm 0,131$ mg/100 ± 5 cm²; fruktoza $0,121 \pm 0,086$ mg/100 ± 5 cm²; saharoza: $0,430 \pm 0,130$ mg/100 ± 5 cm²). Na površini solatnih listov smo določili tudi za bakterije izkoristljive vire dušika (nitrati dušik: $0,019$ mg/100 ± 5 cm² in amonijev dušik: $0,003$ mg/100 ± 5 cm²). Rezultati naših raziskav kažejo, da so solatni listi ugodno okolje za adhezijo, kolonizacijo in rast bakterij vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i>. Pranje solatnih listov v vodi vpliva na zmanjšanje hranilnih snovi, potrebnih za bakterijsko rast in tako na zmanjšanje njihove adhezije in rasti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 579.67:635.52:614.31(043)=163.6
- CX pathogens/*Listeria* *monocytogenes*/*Escherichia* *coli*/bacterial
adhesion/microbiota/green lettuce/*Lactuca* *sativa* L./chemical
analysis/inoculation/surface contamination/washing
- AU SVETELJ, Gašper
- AA JERŠEK, Barbka (supervisor)/VIDRIH, Rajko (co-advisor)/KACJAN MARŠIČ, Nina (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2017
- TY ADHESION OF *Listeria monocytogenes* AND *Escherichia coli* ON GREEN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
- NO XI, 95 p., 16 tab., 28 fig., 116 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The purpose of this research was to assess the adhesion of *L. monocytogenes* and *E. coli* on lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). After artificial inoculation of salad leaves with *L. monocytogenes* these bacteria have adhered well and grown at 12°C (4.3 ± 0.1 log cfu/g, 5.3 ± 0.2 log cfu/g after 1 and 9 days, respectively). Similar adhesion trend was observed for *E. coli* (5.1 ± 0.1 log cfu/g, 6.5 ± 0.1 log cfu/g after 1 and 9 days, respectively). Further experiments with *E. coli* indicated that these bacteria adhered better on unwashed lettuce leaves than on washed one. That indicates that the surface of salad leaves have enough nutrients to allow adhesion and growth of *E. coli*. Therefore, we have checked the growth of *E. coli* in lettuce washing solution. The results revealed that *E. coli* grew well in lettuce washing solution as from initial concentration of 5.35 ± 0.02 log cfu/ml they reached 7.15 ± 0.03 log cfu/ml in 2 days. Chemical analysis of fresh lettuce leaves and lettuce leaves during storage showed that they contained fructose 0.71 ± 0.08 g/100g (2 days), 0.36 ± 0.15 g/100g (9 days), glucose 0.55 ± 0.10 g/100g (2 days) in 0.27 ± 0.10 g/100g (9 days) and sucrose 0.19 ± 0.04 g/100g (2 days), 0.08 ± 0.06 g/100g (9 days). All three sugars were also detected on the surface of fresh lettuce leaves (in lettuce leaves washing solution) and average amounts were: fructose 0.121 ± 0.086 mg/100 ± 5 cm², glucose 0.215 ± 0.131 mg/100 ± 5 cm², and sucrose 0.430 ± 0.130 mg/100 ± 5 cm². Nitrogen compounds present on surface of lettuce leaves were determined as nitrate 0.019 mg/100 ± 5 cm² and ammonium 0.003 mg/100 ± 5 cm². Our results indicate that lettuce leaves represent favourable environment for adhesion, colonisation and growth of *E. coli* and *L. monocytogenes*. Washing of lettuce reduces nutrients for bacterial growth and consequently diminish the adhesion and growth of *E. coli*.

KAZALO VSEBINE

KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZELENA SOLATA	3
2.1.1 Sestava zelene solate	4
2.1.1.1 Površina zelene solate in preživetje bakterij na površini	4
2.1.1.2 Sladkorji zelene solate	6
2.1.1.3 Dušikove spojine zelene solate	9
2.1.2 Naravno prisotni mikroorganizmi na zeleni solati	10
2.2 BAKTERIJE RODOV <i>Listeria</i> IN <i>Escherichia</i>	11
2.2.1 Bakterije vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.2.1.1 Razmere za rast	11
2.2.1.2 Bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> na solati	12
2.2.2 Bakterije vrste <i>Escherichia coli</i>	12
2.2.2.1 Razmere za rast	13
2.2.2.2 Bakterije vrste <i>E. coli</i> na zeleni solati	13
2.3 ADHEZIJA BAKTERIJ NA ZELENO SOLATO	14
2.3.1 Dejavniki, ki vplivajo na mikrobno adhezijo	15
2.3.2 Reverzibila in ireverzibilna adhezija bakterij na rastlinsko tkivo	16
2.3.3 Bakterijski biofilmi	16
2.3.4 Adhezija bakterij vrste <i>E. coli</i> na zeleno solato	17
2.3.4.1 Mehanizmi adhezije bakterij vrste <i>E. coli</i>	18
2.3.5 Adhezija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na zeleno solato	20
2.3.5.1 Mehanizmi adhezije bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	21
2.4 PREPREČEVANJE ADHEZIJE BAKTERIJ NA ZELENO SOLATO	22
2.4.1 Pranje zelene solate in vpliv na redukcijo bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	23
3 MATERIAL IN METODE	25

3.1	MATERIAL	25
3.1.1	Bakterijski sevi	25
3.1.2	Mikrobiološka gojišča	25
3.1.3	Naprave in laboratorijska oprema	27
3.1.4	Vzorci zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.)	28
3.2	METODE	30
3.2.1	Shema dela	30
3.2.2	Vzorčenje solate	31
3.2.3	Priprava bakterijskih kultur	31
3.2.4	Priprava solate za inokulacijo z bakterijami	32
3.2.5	Pranje solatnih listov pred kontaminacijo	32
3.2.6	Točkovna inokulacija bakterij na solatne liste	32
3.2.7	Spiranje solatnih listov po inkubaciji	33
3.2.8	Priprava matične raztopine	34
3.2.9	Kvantifikacija mikroorganizmov na solati	34
3.2.9.1	Določitev skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO)	34
3.2.9.2	Določitev skupnega števila plesni in kvasovk (SŠPK)	35
3.2.10	Ugotavljanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> na solati	35
3.2.11	Določanje rasti bakterij vrste <i>E. coli</i> v različnih tekočih gojiščih	37
3.2.12	Določitev bakterijske adhezije	38
3.2.12.1	Adhezija naravno prisotnih aerobnih mezofilnih bakterij na solati	38
3.2.12.2	Adhezija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na solati	39
3.2.12.3	Adhezija bakterij vrste <i>E. coli</i> na solati	41
3.2.12.4	Adhezije bakterij vrste <i>E. coli</i> v mikrotitrski ploščici	42
3.2.13	Določitev vsebnosti v vodi topnih sladkorjev v solati	46
3.2.14	Določitev v vodi topnih sladkorjev na površini solate	48
3.2.15	Določitev nitratnega in amonijevega dušika na površini solate	50
3.2.16	Vpliv dodatka sladkorjev na solato na rast bakterij vrste <i>E. coli</i>	50
3.2.17	Statistična analiza	50
3.2.17.1	Statistična značilnost rezultatov	51
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	52
4.1	MIKROBIOLOŠKA SLIKA ZELENE SOLATE (<i>Lactuca sativa</i> L.)	52
4.1.1	Število aerobnih mezofilnih bakterij	52
4.1.2	Število plesni in kvasovk	55
4.1.3	Naravna prisotnost bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> na solati	57
4.2	ADHEZIJA BAKTERIJ	59
4.2.1	Vpliv spiranja zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) na kvantifikacijo bakterij	59

4.2.2	Adhezija aerobnih mezofilnih bakterij na zeleno solato (<i>Lactuca sativa</i> L.)	61
4.2.3	Adhezija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na zeleno solato (<i>Lactuca sativa</i> L.)	63
4.2.4	Adhezija bakterij vrste <i>E. coli</i>	65
4.2.4.1	Adhezija bakterij vrste <i>E. coli</i> na zeleno solato (<i>Lactuca sativa</i> L.)	65
4.2.4.2	Adhezija bakterij vrste <i>E. coli</i> na polistiren v modelnih gojiščih	69
4.2.4.3	Vpliv pranja zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) na adhezijo bakterij vrste <i>E. coli</i>	71
4.2.4.4	Adhezija bakterij vrste <i>E. coli</i> na zeleno solato (<i>Lactuca sativa</i> L.) z dodanimi nizkimi vsebnostmi glukoze in laktoze	73
4.3	RAST BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i>	75
4.3.1	Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v modelnih gojiščih	75
4.3.2	Sočasna rast bakterij vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i>	78
4.4	OGLJIKOVE IN DUŠIKOVE SPOJINE ZELENE SOLATE (<i>Lactuca sativa</i> L.)	79
4.4.1	Vsebnosti enostavnih sladkorjev v zeleni solati med skladiščenjem	79
4.4.2	Vsebnosti enostavnih sladkorjev na površini zelene solate	81
4.4.3	Nitratni dušik in amonijev dušik na površini zelene solate	83
5	SKLEPI	84
6	POVZETEK	85
7	VIRI	87
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost hranilnih snovi in vode v zeleni solati (<i>Lactuca sativa</i> L.) (Rumeza in sod., 2006).....	4
Preglednica 2: Enostavni sladkorji v romanski solati (ang. Romaine lettuce) (Lopez in sod., 2013)	7
Preglednica 3: Adhezija različnih sevov bakterij vrste <i>E. coli</i> O157:H7 na intaktno in rezano površino solate ledenke (Patel in sod., 2011)	18
Preglednica 4: Redukcija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po spiranju solatnih listov s tekočo vodo in po potapljanju kontaminiranih solatnih listov v vodo z različnimi koncentracijami natrijevega hipoklorida (n = 4) (Domenech in sod., 2013)	24
Preglednica 5: Komercialna mikrobiološka gojišča.....	26
Preglednica 6: Kemikalije uporabljene za kemijske analize.....	27
Preglednica 7: Naprave in laboratorijska oprema pri eksperimentalnem delu	27
Preglednica 8: Oznake vzorcev zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) in opravljene preiskave ter analize.....	29
Preglednica 9: Podatki o sistemu HPLC za analizo glukoze, fruktoze in saharoze	47
Preglednica 10: Standardne raztopine sladkorjev za izdelavo umeritvene krivulje za določanje sladkorjev v solati	47
Preglednica 11: Podatki o sistemu GC za analizo glukoze, fruktoze in saharoze	48
Preglednica 12: Standardne raztopine sladkorjev za izdelavo umeritvene krivulje za določanje sladkorjev na površini solate	49
Preglednica 13: Vpliv spiranja solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) na povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij in bakterij vrste <i>E. coli</i>	59
Preglednica 14: Sočasna rast bakterij vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i> v gojišču TSB	78
Preglednica 15: Vsebnost enostavnih sladkorjev v vzorcih zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) INT1	80
Preglednica 16: Vsebnosti enostavnih sladkorjev na površini vzorcev zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) INT3 in KON4	82

KAZALO SLIK

Slika 1: Zelena solata kristalka (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	3
Slika 2: Spremembe v količini glukoze, celotnih sladkorjev in bakterijske populacije na površini listov fižola ob različnih časih po inokulaciji z bakterijami vrste <i>Pseudomonas fluorescens</i> A506 (Mercier in Lindow, 2000).....	8
Slika 3: Adhezija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ($N_0 = 10^8$ cfu/ml) in tvorba biofilmov na površini solate po 48-urnem skladiščenju pri 10 °C (Olmez in Temur, 2010)	20
Slika 4: Osnovna shema mikrobioloških preiskav zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) pri eksperimentalnem delu.....	30
Slika 5: Osnovna shema kemijskih analiz zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) pri eksperimentalnem delu.....	31
Slika 6: Točkovna inokulacija dela sredinskega solatnega lista z bakterijami vrste <i>L. monocytogenes</i> ali <i>E. coli</i>	33
Slika 7: Shema ugotavljanja bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> v vzorcih zelene solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) iz različnih trgovin.....	36
Slika 8: Shema ugotavljanja rasti bakterij vrste <i>E. coli</i> v izpirku solate in gojiščih TSB, MOD1, MOD2	37
Slika 9: Shema določitve števila adheriranih naravno prisotnih aerobnih mezofilnih bakterij na solati (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	39
Slika 10: Shema določitve števila adheriranih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na solati (<i>Lactuca sativa</i> L.)	40
Slika 11: Shema določitve števila adheriranih bakterij vrste <i>E. coli</i> na solati (<i>Lactuca sativa</i> L.).....	42
Slika 12: Shema določanja stopnje adhezije bakterij vrste <i>E. coli</i> na polistiren.....	44
Slika 13: Načrt izvedbe mikrotiterskih ploščic za določitev stopnje adhezije bakterij vrste <i>E. coli</i> z metodo barvanja z barvilom kristal violet; (A) gojišči izpirek solate in MOD1; (B): gojišči MOD2 in TSB.....	45
Slika 14: Določitev vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v solati (<i>Lactuca sativa</i> L.) s HPLC.....	46
Slika 15: Določitev vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoza na površini solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) z GC	49
Slika 16: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščene 21 dni (1 °C).....	53
Slika 17: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščene 7 dni (12 °C).....	54
Slika 18: Povprečno število plesni in kvasovk v vzorcih solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščene 21 dni (1 °C).....	56

Slika 19: Povprečno število adheriranih aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih solate KON2 (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščenih pri 12 °C	61
Slika 20: Povprečno število adheriranih aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih solate INT1 (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščenih pri 12 °C	62
Slika 21: Povprečno število adheriranih baterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na vzorcih zelene solate KON1 in KON3 (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščenih pri 12 °C	63
Slika 22: Povprečno število adheriranih bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na vzorcih zelene solate INT1 (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščene pri 12 °C	64
Slika 23: Povprečno število adheriranih baterij vrste <i>E. coli</i> na vzorcih zelene solate KON2 (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščenih 7 dni pri 12 °C	65
Slika 24: Povprečno število adheriranih baterij vrste <i>E. coli</i> na vzorcih zelene solate INT1 (<i>Lactuca sativa</i> L.) skladiščenih 12 dni pri 12 °C	66
Slika 25: Povprečna stopnja adhezije bakterij vrste <i>E. coli</i> na polistiren v modelnih gojiščih	70
Slika 26: Vpliv pranja solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) INT2 na adhezijo bakterij vrste <i>E. coli</i> pri 7 dnevnem skladiščenju pri 12 °C	72
Slika 27: Vpliv različnih načinov priprave površine solate (<i>Lactuca sativa</i> L.) INT2 na adhezijo bakterij vrste <i>E. coli</i> pri 7 dnevnem skladiščenju pri 12 °C	74
Slika 28: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v gojišču TSB, modelnem gojišču 1, modelnem gojišču 2 in izpirku zelene solate <i>Lactuca sativa</i> L. INT3	77

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\Delta \bar{A}$	razlika povprečnih absorbanc
A	absorbanca
$\bar{A}$	povprečna absorbanca
ALOA	gojišče ALOA agar (ang. Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti)
BZLŽB	gojišče briljantno zeleni žolčni bujon (ang. Brilliant Green Bile Broth)
cal	kalorija
cfu	kolonijaska enota (ang. Colony Forming Unit)
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DRBC	gojišče Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar
EPS	ekstracelularne polimerne substance
eDNA	zunajcelična DNA
FR	fiziološka raztopina
GC	plinska kromatografija (ang. Gas Chromatography)
H ₀	ničelna domneva
H ₁	alternativna domneva
HF	gojišče Half Fraser
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
LLO	listeriolizin O
LPS	lipopolisaharidi
<i>lpc</i>	gensko kodirajoč listerijski celulozni povezovalni protein
KV	barvilo kristal violet
MOD1	modelno gojišče 1
MOD2	modelno gojišče 2
MR	matična raztopina
MTP	mikrotitrna ploščica
N	število mikroorganizmov
N ₀	začetno število mikroorganizmov
PCA	gojišče Plate Count Agar
SD	standardna deviacija
SŠMO	skupno število aerobnih mezofilnih bakterij
SŠPK	skupno število plesni in kvasovk
TBX	gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X

1 UVOD

Izbruhi obolenj oz. bolezni, ki so povezani z uživanjem sveže zelenjave, so v zadnjih letih vse pogostejši (Berger in sod., 2010). Znatno povečanje števila izbruhov različnih obolenj, katerih vzrok so bila z bakterijami kontaminirana sveža živila rastlinskega izvora, kot so ohrovt, melone, paradižnik, špinača in solata, je v zadnjih 30 letih spodbudilo mnoge raziskovalce k študiju interakcij med za človeka patogenimi bakterijami in rastlinami. Rast patogenih bakterij na sveži zelenjavi pomeni povečano tveganje okužb ljudi preko sveže zelenjave in je ena izmed glavnih skrbi, ko govorimo o varnosti živil. Patogene bakterije, ki predstavljajo največja tveganja, so bakterije vrste *Listeria monocytogenes*, patogene bakterije vrste *Escherichia coli* in bakterije rodu *Salmonella* (Botticella in Russo, 2013). Večino izbruhov na svežih živilih povzročajo bakterije vrst *Salmonella enterica* in *Escherichia coli*. Ti dve bakterijski vrsti sta se sposobni adherirati in tvoriti biofilme na površini svežih živil, kar vodi k povečanju odpornosti teh bakterij proti različnim načinom razkuževanja. Posledično povzročajo večje število okužb ljudi. Bakterije vrste *E. coli* so se sposobne adherirati in tvoriti biofilme na rastlinskem tkivu, kar poleg odpornosti tudi oteži samo odstranjevanje bakterij (Yaron in Römling, 2014; Doyle in Erickson, 2008; Yaron, 2014). Sveža zelenjava se lahko kontaminira s patogenimi bakterijami pri pridelavi z nepravilno predelanim kompostom, onesnaženo vodo za namakanje, prisotnostjo divjih in domačih živali, nečisto opremo pri pridelavi itd. (Oliveira in sod. 2011). Da bi preprečili kontaminacijo sveže zelenjave s za človeka patogenimi bakterijami, moramo poleg dobre kmetijske oz. proizvodnje prakse biti pozorni tudi na okoljske razmere med distribucijo, skladiščenjem in predelavo same zelenjave. Ustrezne okoljske razmere definira tudi primerna temperatura, čas skladiščenja, prisotnost vode in svetlobe.

V skupini sveže zelenjave je bilo veliko bakterijskih okužb zelene solate. Sveže odrezana, netretirana solata ima kratko življenjsko dobo. Neugodne razmere tekom skladiščenja vplivajo na slabšanje kakovosti solate, saj se poslabša senzorična in prehranska kakovost, vprašljiva pa postane tudi mikrobiološka varnost. Mikroba kontaminacija s patogenimi ali kvarljivimi mikroorganizmi skozi proizvodno-prehransko verigo pa predstavlja tveganje na zdravje ljudi. Ko pridejo bakterije v stik s površino solate, tam običajno prevladujejo ugodne razmere za njihovo rast, adhezijo in nenazadnje kolonizacijo. V magistrski nalogi se bomo osredotočili na določanje stopnje adhezije dveh za človeka patogenih vrst bakterij – *L. monocytogenes* in *E. coli*, saj adhezija kot začetek tvorbe biofilma bakterij predstavlja resno grožnjo za varnost sveže solate. Omenjeni bakterijski vrsti uspešno rasteta tudi na zeleni solati, in preko katere se ob zaužitju le-te preneseta tudi v prebavila ljudi, kjer lahko povzročata različna obolenja.

1.1 NAMEN DELA

Namen dela je bil določiti mikrobno kontaminacijo (skupno število bakterij, število kvasovk in plesni, bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*) zelene solate (*Lactuca sativa* L.) in vpliv skladiščenja (temperatura, čas) na mikrobno populacijo na solati. Poleg tega je bil namen tudi preveriti stopnjo adhezije in rast bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* v različnih okoljskih razmerah skladiščenja zelene solate ter določiti, katera hranila v sami solati in na površini solate vplivajo na adhezijo in rast bakterij na solatnem listu.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo pri vzorcih zelene solate (*Lactuca sativa* L.) določili, da:

- se bo skupno število bakterij na solati tekom 12-dnevnega skladiščenja povečalo in da bo skladiščenje solate pri višji temperaturi (12 °C) vplivalo na večjo adhezijo bakterij na površino zelene solate, kot skladiščenje pri nižji temperaturi (1 °C) (**hipoteza 1**),
- bo spiranje solate z vodo zmanjšalo skupno število mikroorganizmov, ker na solatnem listu ostanejo le adherirani mikroorganizmi (**hipoteza 2**),
- se bo vsebnost enostavnih sladkorjev (glukoze, saharoze in fruktoze) v solati tekom skladiščenja v temi zmanjševala, ter da so na površini solatnega lista prisotni enostavni sladkorji in dušikove spojine, ki omogočajo rast in adhezijo bakterij (**hipoteza 3**).

Predvidevamo, da bomo po umetni kontaminaciji solatnih listov (*Lactuca sativa* L.) z bakterijami vrst *E. coli* in/ali *L. monocytogenes* določili, da:

- ne bo naravno prisotnih bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* in da bo stopnja adhezije bakterij vrste *E. coli* večja, kot stopnja adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* ter da bo stopnja adhezije bakterij vrste *E. coli* pri višjem začetnem številu večja, kot pri nižjem začetnem številu (**hipoteza 4**),
- bo pranje solate vplivalo na zmanjšanje števila adheriranih bakterij na solati (**hipoteza 5**),
- hranila na površini solatnega lista omogočajo rast in adhezijo bakterij (**hipoteza 6**).

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZELENA SOLATA

Sveže sadje in zelenjava sta pomembni komponenti zdrave in uravnotežene prehrane. Uživanje vzpodbujajo številne zdravstvene organizacije z namenom zaščite pred številnimi boleznimi, kot so kardiovaskularne bolezni in različne vrste raka. Sadje in zelenjava, predvsem pa listnata zelenjava, se uživata pretežno surova. Uživanje surove listnate zelenjave je lahko povezano s prenosom patogenih bakterij (Berger in sod., 2010). Med listnato zelenjavo spada tudi zelena solata. Zeleno solato se redko termično obdeluje, saj se skoraj izključno uporablja v solatah, kjer se jo zauživa svežo.

Zelena solata (*Lactuca sativa* L.) (Slika 1) iz družine Asteraceae, podskupine (ang. subfamily) Liguliflorae, je izvorno mediteranska rastlina in najpomembnejša v skupini listnate zelenjave. Komercialno se po svetu prideluje v številnih državah, veliko pa se jo pridelava tudi na domačih vrtovih. Na Kitajskem proizvedejo več kot 50 % vse zelene solate na svetu, sledita ZDA (okrog 20 %) in Indija (okrog 5 %). Med večje proizvajalke solate spadajo še Španija, Iran, Italija in Japonska (Kristkova in sod., 2008).



Slika 1: Zelena solata kristalka (*Lactuca sativa* L.)

2.1.1 Sestava zelene solate

Solata (*Lactuca sativa* L.) podobno kot ostala zelenjava vsebuje največ vode, in sicer kar $93,8 \pm 0,20$ g/100 g živila, kar nekaj ima tudi ogljikovih hidratov, in sicer $3,0 \pm 0,10$ g/100 g živila, po količini sledijo beljakovine, in nato maščobe (Preglednica 1) (Rumeza in sod., 2006). Solata je dober vir prehranske vlaknine, vitaminov (predvsem B, A, C in K). Spada med nizkokalorična živila in predstavlja dober vir koristnih pigmentov (klorofili, karotenoidi). Vsebuje tudi makromineralne (kalij 238 mg/100 g; kalcij 35 mg/100 g; fosfor 33 mg/100 g; magnezij 13 mg/100 g; natrij 5,5 mg/100 g) in elemente v sledovih (železo 1,30 mg/100 g; cink 0,20 mg/100 g; mangan 0,18 mg/100 g; baker 0,02 mg/100 g; selen 0,6 µg/100 g), ki so esencialni za delovanje biokemijskih procesov v človeškem telesu, kjer imajo strukturne funkcije ali pa služijo kot elektroliti (Kawashima in Soares, 2003; Konstantopoulou in sod., 2010; Mou, 2012).

Preglednica 1: Vsebnost hranilnih snovi in vode v zeleni solati (*Lactuca sativa* L.) (Rumeza in sod., 2006)

Sestava zelene solate (g/100 g solate) ± SD						Energijska vrednost (cal/100 g solate) ± SD
Voda	Beljakovine	Maščobe	Ogljikovi hidrati	Prehranska vlaknina	Pepel	
$93,8 \pm 0,20$	$1,2 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,03$	$3,0 \pm 0,10$	$0,7 \pm 0,20$	$0,8 \pm 0,01$	$17 \pm 0,10$

2.1.1.1 Površina zelene solate in preživetje bakterij na površini

Površino rastlin lahko opišemo s hidrofobnostjo, lastnostmi sestave oz. konstitucije in topografijo. Solato se lahko goji konvencionalno, hidroponsko ali v ekoloških sistemih, ki vplivajo tako na mikrobioto, kot tudi na fizikalno-kemijske lastnosti površin listov. Na površini solate je pomembna tudi količina in sestava voskov, hrapavost, morfologija in površinski naboj (Lima in sod., 2013).

Hranilnih snovi je na površini listov malo. Nekaj jih na površino listov verjetno izhaja iz notranjega dela rastline (mezofila) in celic povrhnjice. Prav tako hranilne snovi lahko izhajajo iz ran in poškodovanih trihom (laski, izrastki). Porazdelitev hranil na listih je zelo heterogena. Še več, filmska je podvržena večjim in hitrejšim nihanjem temperature, sončnemu sevanju in razpoložljivosti vode. Značilno je prisotnih 10^3 do 10^7 bakterij/gram listov (Hallmann in sod., 2001). Za potrošnika pa je najbolj zaskrbljujoč pojav večjega števila patogenih bakterij, ki lahko povzročajo okužbe.

Dotok kontaminirane namakalne vode v notranjost solatne glave (rozete) na polju pri ugodnih temperaturah, nižjem številu naravno prisotnih bakterij ter prisotnost ustreznih hranilnih snovi predstavlja ugoden scenarij za kontaminacijo solate s patogenimi bakterijami (Brandl in Amundson, 2008).

Da bi razumeli, kakšna usoda čaka patogene enterobakterije na rastlinah, je pomembno, da poznamo tudi razmere v rastlinskem okolju. Odvisno od načina prenosa (voda, gnojevka, nepravilno rokovanje in ostali ukrepi) se bakterija locira na rizosfero (del fitosfere, ki obdaja koreninski sistem rastline) ali filosfero (celotno okolje okrog nadzemnega dela rastline). Foliarne bakterije (bakterije na listih) lahko sledijo dvema strategijama rasti in preživetja na površini rastline. Strategija tolerance, ki zahteva sposobnost kljubovanja okoljskim stresom na listni površini. Pri strategiji izogibanja pa bakterije iščejo mesta, ki jim omogočajo zaščito pred stresnimi okoljskimi dejavniki (Beattie in Lindow, 1999). Na teh dveh strategijah so razvili tudi glavni model kolonizacije listne površine. Glede na ta model bakterije pridejo na listno površino in se naključno porazdelijo. Nekatere bakterije vstopijo tudi v notranjost listov preko odprtih, kot so listne reže. Tiste, ki ostanejo na površini, oblikujejo svoje lokalno okolje. Bakterije se pritrdijo na površino in začno se razmnoževati. Kasneje se začno tvoriti agregati oz. skupki bakterij oz. mikrokolonije, kar lahko vodi v razvoj bakterijskih biofilmov. Kot rečeno bakterije lahko vdrejo v notranjost listov, kjer spremenijo habitat. Poleg tega v večini primerov črevesne patogene bakterije preživijo v listih brez izrazitih sprememb habitata in zato brez vidnih znakov na sami rastlini. Take bakterije redko spremenijo rastlinsko strukturo, se pa adherirajo in pokaže se težnja po tvorbi biofilmov (Yaron in Römmling, 2014).

Večina zračnih rastlinskih površin je pokritih s kutikulo, hidrofobnim materialom, ki je primarno sestavljen iz maščobnih kislin, voskov in polisaharidov. Kutikula privlači hidrofobne molekule, razpoke v kutikuli pa lahko povzročijo izhajanje hidrofilnih struktur (Patel in Sharma, 2010). V tem primeru so bakterije izpostavljene rastlinskimi celicam, ki so v osnovi pokrite z glikoproteini in polisaharidi kot sta celuloza in pektin. Številne od teh molekul so hidrofilne in v nekaterih primerih imajo negativni naboj (Torres in sod., 2005). Naboj na površini rastlinskega tkiva je v korelaciji z močjo adhezije (Ukuku in Fett, 2002), toda točni receptorji in vezavna mesta še niso bili identificirani. Preiskava adhezije bakterij vrste *S. Typhimurium* na narezanem krompirju je pokazala, da bakterije napadejo stike med celičnimi stenami. Natančneje bakterije napadejo pektinsko plast na stikih in zato Saggers in sod. (2008) domnevajo, da je lahko pektin snov na katero se bakterije adherirajo. V nasprotju s tem pa so Tan in sod. (2013) dokazali, da je pektin v primerjavi s celulozo veliko bolj neugoden medij za adhezijo bakterij rodu *Salmonella*.

Topografija in arhitektura površine rastlin sta tudi zelo pomembna dejavnika za mikrobno adhezijo. Hrapavost oz. grobost ni pomembna samo za adhezijo ampak tudi za preživetje bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na listih različnih kultivarjev špinače (Macarisin in sod., 2013). Hrapavost listov pri rastlini je odvisna od narave rastline in

njene starosti. Dejansko je bila sposobnost adhezije bakterij rodu *Salmonella* večja na staro, kakor na mlado solato. Večje število bakterij je bilo ob pecljih (ang. petiole), kjer so bakterije pokazale višjo afiniteto do vezave na spodnji strani listov, kakor na zgornji strani listov (Kroupitski in sod., 2011).

Na mikrobioto listov vpliva sestava rastlinskih tkiv, saj so nekatera tkiva zaščitena proti stresu, nekatera so bogata s hranili, nekatera pa bogata z vodo. Dodatni rastlinski deli, kot so izločevalne luknjice (ang. secretory cavities) in kanali (ang. ducts) lahko izločajo rastlinske metabolite, ki jih bakterije lahko izkoristijo. Glandularne trihome (ang. glandular trichomes) so epidermalni izrastki, ki služijo kot sekrecijska in akumulacijska mesta za različne snovi kot so Ca^{2+} , Na^+ , Mn^{2+} in Pb^{2+} , obrambni proteini, sekundarni metaboliti kot so eterična olja, monoterpenoidi in fenilpropanoidi. Večje število bakterij so našli tudi na zgornjih in spodnjih delih površin listov. Ta pojav pripisujejo nižjemu sevanju, višjemu številu listnih rež in tanjši kutikuli (Karamanoli in sod., 2012). Listne reže lahko predstavljajo vir hranil. S konfokalnim mikroskopom so ugotovili, da se bakterije vrste *E. coli* pritrdijo v večjem številu okrog trihom in listnih rež (Seo in Frank, 1999).

Površina zelenjave ima bistven pomen tudi pri samem čiščenju zelenjave. Študije kažejo, da ima lahko enako sredstvo za čiščenje zelenjave, ki je enakih koncentracij, drugačen vpliv na zmanjšanje bakterijske populacije, kadar je uporabljeno na različnih površinah zelenjave. Največkrat čistimo površino zelenjave s pranjem oz. spiranjem z vodo. Zmanjšanje mikrobne populacije je odvisno od razmer na površini zelenjave (Wang in sod., 2009).

2.1.1.2 Sladkorji zelene solate

Lopez in sod. (2014) so v solati (romanska solata; lat.: *Lactuca sativa* L. var. *longifolia*) določili glukozo, fruktozo in saharozo. Saharoze je bilo 2 do 3-krat manj kot glukoze. Vsebnost saharoze je bila odvisna od vzorca solate in se je gibala med 1,9 in 2,6 mg/g solate (v povprečju 2,2 mg/g). Vsebnost glukoze je variirala med 3,6 in 5,3 mg/g (v povprečju 4,6 mg/g), največ pa je bilo fruktoze in sicer med 4,5 in 6,5 mg/g solate (v povprečju 5,7mg/g) (Preglednica 2). Brandl in Amundson (2008) sta v posušenih sredinskih solatnih listih določila 92 mg/ g celokupnih sladkorjev.

Preglednica 2: Enostavni sladkorji v romanski solati (ang. Romaine lettuce) (Lopez in sod., 2013)

Vzorec solate (kultivar)	Vsebnost enostavnih sladkorjev (mg/g) ± SD		
	saharoza	glukoza	fruktoza
Carrascoy	1,9 ± 0,2	3,6 ± 0,2	4,5 ± 0,2
Espuna	2,0 ± 0,2	4,7 ± 0,1	6,1 ± 0,2
Aitana	2,4 ± 0,2	4,7 ± 0,3	6,2 ± 0,6
Collado	1,9 ± 0,1	4,0 ± 0,4	5,1 ± 0,5
Alhama	2,6 ± 0,2	5,3 ± 0,4	6,5 ± 0,3
ISasa	1,9 ± 0,3	4,6 ± 0,5	5,3 ± 0,4
AR-29213	2,3 ± 0,1	5,1 ± 0,4	6,1 ± 0,4
Povprečna vrednost	2,2*	4,6*	5,7*

Legenda: *Med povprečnimi vrednostmi kultivarjev solate so bile statistično značilne razlike ($P < 0,05$). Vrednosti so povprečne z upoštevanjem standardne deviacije SD ($n = 4$).

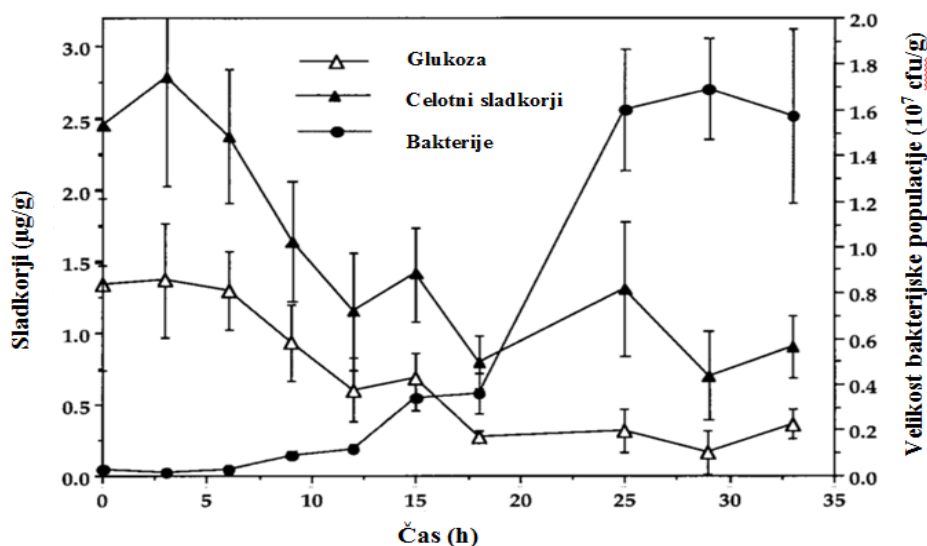
2.1.1.2.1 Sladkorji na površini solate

Površine listov so za črevesne patogene bakterije v splošnem revne s hranilnimi snovmi v primerjavi s prebavili živali, kjer so hranila v izobilju (Lindow in Brandl, 2003; Mercier in Lindow, 2000; Leveau in Lindow, 2001; Tukey, 1970). V študijah so ugotovili, da sta saharoza in fruktoza po listni površini razporejena heterogeno. Na nekaterih mikrolokacijah so zaznali večje vsebnosti sladkorjev (Leveau in Lindow, 2001; Miller in sod., 2001; Delaquis in sod., 2007). Predvideva se, da prav zaradi heterogene porazdelitve hranil po listnih površinah, so tudi bakterije po listnih površinah razporejene heterogeno (Brandl in Amundson, 2008).

Mercier in Lindow (2000) sta določila vsebnost sladkorjev na površini listov fižola. V študiji so ocenjevali kvantitativna razmerja med hranili na površini listov fižola ter kolonizacijo površine listov z bakterijami vrste *Pseudomonas fluorescens*. Podatki pridobljeni v študiji kažejo, da je velikost populacije epifitskih bakterij na rastlini omejena z viri ogljika na površini listov. Večja razpoložljivost virov ogljika, kot so sladkorji na površini listov, vpliva na večjo številčnost populacije epifitskih bakterij. Sladkorji na površini listov so se zmanjšali med bakterijsko kolonizacijo. Vseeno je na obsežno koloniziranih listih ($1,7 \times 10^7$ cfu/g) ostalo še približno 20 % lahko izkoristljivih sladkorjev, npr. glukoze. V raziskavi so na površini listov fižola določili okoli 2,5 µg/g skupnih sladkorjev in okoli 1,4 µg/g glukoze (Slika 2). Prevladujoči sladkorji na listih so bili glukoza, fruktoza in saharoza. Določili so tudi manjše količine drugih sladkorjev, kot so galaktoza in neznan sladkor z retencijskim časom 15 minut (Mercier in Lindow, 2000).

Liste so poškropili s suspenzijo bakterij vrste *P. flourescens* A506, koncentracije 10^6 cfu/ml, nato pa jih shranili v plastične vrečke, kjer se je ohranjala vlaga. Po 20-urni inkubaciji listov v vlažnih razmerah se je količina sladkorjev na površini

zmanjšala na približno 0,25 µg/g, populacija bakterij pa je dosegla koncentracijo $1,7 \times 10^7$ cfu/g (Slika 2) (Mercier in Lindow, 2000).



Slika 2: Spremembe v količini glukoze, celotnih sladkorjev in bakterijske populacije na površini listov fižola ob različnih časih po inokulaciji z bakterijami vrste *Pseudomonas fluorescens* A506 (Mercier in Lindow, 2000)

V enem izmed poskusov so bakterije inkubirali na listih še dodatne 4 dni. Količina glukoze se je zmanjšala iz približno 1,4 µg/g na 0,2 µg/g listov. Takšno znatno zmanjšanje hranil lahko naredi list neugoden za nadaljnjo kolonizacijo in razmnoževanje mikroorganizmov. Ugotovili so, da so bakterije vrste *P. fluorescens* izčrpale več kot 80 % hranilnih snovi na listnih površinah (Mercier in Lindow, 2000).

Brandl in Amundson (2008) pa sta določala celokupno vsebnost sladkorjev na površini različno starih solatnih listov. Sladkorje sta s solatne površine odstranila z vodo in nadalje v izpirku določila celokupno vsebnost sladkorjev. Največ sladkorjev so na površini vsebovali notranji (mlajši) listi, najmanj pa zunanji (starejši) listi. Sredinski listi so na površini vsebovali 61 µg sladkorjev/g lista. Dokazala sta, da je na površini notranjih listov večja vsebnost celokupnih sladkorjev in sicer v povprečju 89 µg/g lista, na zunanjih listih pa le 30 µg/g lista.

2.1.1.2.2 Kvantifikacija sladkorjev na listni površini

Za določitev sladkorjev na listni površini sta Mercier in Lindow (2000) liste na rastlini najprej sprala s čisto vodo (50–300 µl vode na list). Liste so nato odstranili z rastline in vsak list posebej prenesli v petrijeve plošče, kamor so dodali 0,7 do 1,5 ml

vode, odvisno od velikosti listov. S Pasteurjevo pipeto so z nežnim tokom vode večkrat sprali obe strani lista. Izpirke so nato sterilizirali s filtracijo skozi 0,22 µm filtrirni papir, ter posušili do suhega v vakuumu pri 20 °C. Suhe vzorce so nato shranili v zmrzovalniku pri -10 °C. Sladkorje v vzorcih so analizirali s HPLC s analitično kolono Carbo Pac PA1, povezano na pulzni amperometrični detektor ED40 (Dionex Corporation, Sunnyvale, Kalifornija). Koncentracijski gradient NaOH (30–90 mM) je bil uporabljen kot eluent, s pretokom 1,0 ml/min in časom 22 minut. Taki pogoji so omogočili ločbo monosaharidov in saharoze. Količino sladkorjev so določili z integriranjem površine vrhov in predhodnim merjenjem znanih koncentracij sladkorjev. Vsebnost sladkorjev je bila izražena kot glukozni ekvivalent (Mercier in Lindow, 2000).

Brandl in Amundson (2008) sta kvantificirala celokupno vsebnost ogljika (C) na površini solatnih listov. Različno stare solatne liste (notranje, sredinske in zunanje) sta poskropila z ddH₂O. Vodo, ki je odtekla sta zbrala v večjih petrijevih ploščah. Za vsako preiskovano skupino sta zbrala 100 ml izpirka iz 10–20 listov. Izpirke sta skoncentrirala z liofilizacijo. Celokupno vsebnost C sta določila z Carlo-Erba-analizatorjem elementov (CE Instruments, 1500 elemental analyzer).

2.1.1.3 Dušikove spojine zelene solate

Dušik je najpomembnejši element v prehrani rastlin. Rastline sprejemajo dušik v obliki nitratnega (NO₃⁻) ali amonijevega iona (NH₄⁺). Zaradi intenzivne nitrifikacije v tleh, ob prisotnosti bakterij, je nitrat (NO₃⁻) prevladujoča oblika dušika, ki jo sprejme rastlina. Nizka vsebnost nitrata je v užitem delu rastline pomembna zaradi potencialnega negativnega vpliva nitrata na zdravje ljudi. Prekomerna raba gnojil lahko privede tudi do kopičenja nitrata v kmetijskih pridelkih. Nitrati (NO₃⁻) se v človeškem organizmu pod vplivom mikrobioloških procesov spremenijo v nitrite (NO₂⁻), ki so bolj škodljivi kot nitrati. Toksičnost nitritov je dokazana pri reakciji s hemoglobinom v krvi, kjer nastane methemoglobin, ki ni zmožen prenosa kisika po organizmu. Poleg omenjenega, lahko nitriti v organizmu reagirajo z organskimi (sekundarnimi) amini in povzročijo nastanek rakotvornih nitrozaminov, ki povečujejo tveganje za raka prebavil (Hord in sod., 2009; Kmecl, 2017). Nizka vsebnost nitrata je pomembna tudi zato, ker se nitrati lahko transformirajo v nitrite, ki so veliko bolj dovzetni za interakcije s hemoglobinom in vplivajo na prenos kisika v krvi (Kmecl, 2017). Zelenjava, še posebej listnata, predstavlja glavni prehranski vir zaužitega nitrata (Santamaria, 2006). Med kultivarji istega tipa solate so Lopez in sod. (2014) zaznali večje variabilnosti v vsebnosti nitrata. Vzrok za to je lahko tudi, da se akumulacija nitrata v listih poveča, kadar so solatne glave bolj izpostavljene senčnim predelom in kjer je zmanjšano sončno sevanje. V študiji Lopeza in sod. (2014), se je vrednost nitrata v različnih kultivarjih solate gibala med 19,0 in

221,4 mmol/kg. Hord in sod. (2009) navajajo, da solata spada v zelenjavo z zelo visoko vsebnostjo nitratov, tudi nad 250 mg/100 g sveže solate, v povprečju 82,1 mg/100 g. Raziskav, v katerih bi določili vsebnosti nitratov na površini solate nismo zasledili, sta pa Brandl in Amundson (2008) kvantificirala celokupno vsebnost dušika (N) na površini solatnih listov. Različno stare solatne liste (notranje, sredinske in zunanje) sta poškropila z ddH₂O. Vodo, ki je odtekla sta zbrala v večjih petrijevih ploščah. Za vsako preiskovano skupino sta zbrala 100 ml izpirka iz 10–20 listov. Izpirke sta skoncentrirala z liofilizacijo. Celokupno vsebnost N sta določila z Carlo-Erba-analizatorjem elementov (CE Instruments, 1500 elemental analyzer).

2.1.2 Naravno prisotni mikroorganizmi na zeleni solati

Wei in sod. (2006) so pokazali, da je naravno prisotna mikrobiota na zeleni solati, ki jo sestavljajo pretežno mlečno-kislinske bakterije, sposobna nadzorovati pretirano rast patogenih bakterij na površini solate. Naravno prisotna mikrobiota na površini solate med seboj in z drugimi mikroorganizmi tekmuje za prostor in hranila. Naravno prisotne bakterije lahko tudi proizvajajo snovi, ki negativno (antagonistično) vplivajo na preživetje patogenih bakterij (Liao in Fett, 2001). Rastlinska mikrobiota ni homogeno razporejena po površini listov. Dokazali so, da se bakterije raje naselijo na specifična mesta na listih, kot so začetki trihom (listnih laskov), listne reže, epidermalne celice s stiki, vdolbine oz. stanjšanja okrog žil ter poškodovane dele listov (Beattie in Lindow, 1999).

Sveža zelena solata ima lahko na površini večje koncentracije mikroorganizmov, naravno mikrobioto pa običajno sestavljajo bakterije iz družin Enterobacteriaceae in Pseudomonadaceae, mlečno-kislinske bakterije, kvasovke in plesni (Sagoo in sod., 2003). V raziskavi 106 vzorcev romanske solate gojene na polju v Kaliforniji in Arizoni (2009, 2010) so Rastogi in sod. (2012) ugotovili da prevladujejo bakterije iz debel Proteobacteria, Firmicutes, Bacterioidetes in Actinobacteria. Na nivoju rodov pa so največkrat prisotne bakterije rodov *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Massilia*, *Arthrobacter* in *Pantoea*. Celotna bakterijska populacija je štela 10⁵–10⁶ celic na gram solatnega tkiva (solatni list).

Patogene bakterije kot so *Salmonella enterica*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium* spp., so pogostejše povezane z uživanjem sveže zelenjave in z okužbami pri ljudeh (Doyle in Erickson, 2008; Yaron, 2014; Yaron in Römling, 2014). Zaradi pogostosti pojavljanja okužb ljudi s patogenimi bakterijami preko sveže zelenjave, smo se odločili, da se bomo v naši nalogi osredotočili na pogosto prisotni patogeni bakteriji vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*.

2.2 BAKTERIJE RODOV *Listeria* IN *Escherichia*

2.2.1 Bakterije vrste *Listeria monocytogenes*

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so za človeka in živali patogene. Pri okužbah z njimi je poznana velika smrtnost. Nekaj primerov obolenj so povzročile tudi bakterije vrst *L. seeligeri*, *L. welshimeri* in *L. ivanovii*. Hrana je glavni medij prenosa bakterij vrste *L. monocytogenes* (Adams, 2016). Obolenje, povzročeno z listerijami se imenuje listerioza, katera se lahko pojavi v različnih oblikah. Je oportunistična okužba, ki ogroža predvsem rizične skupine, kamor prištevamo tudi nosečnice. Smrtnost zaradi listerioze je najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano, na srečo pa je incidenca nizka (Adamič in sod., 2003). V letu 2015 je 28 držav članic EU zabeležilo in potrdilo 2206 primerov listerioze. Smrtnost je bila najvišja po letu 2008 in sicer 17,7 % (270 smrtnih žrtev). Primeri listerioze so bili pogosti pri populaciji ljudi starejših od 64 let, najpogostejši pa pri skupini ljudi starejših od 84 let (EFSA in ECDC, 2016).

Med virulenčne dejavnike bakterij vrste *L. monocytogenes* štejemo internalin – površinski protein sestavljen iz 800 aminokislin, ki je kodiran z kromosomskim genom *inlA*. Bakterije vrste *L. monocytogenes* proizvajajo tudi listeriolizin O (LLO). To je 58 kDa velik hemolizin, ki ustvari pore v lipidni dvoplasti fagolizosomalne membrane in omogoča, da bakterija pobegne iz kislega gostiteljevega fagolizosoma v citosol, kjer se lahko razmnožuje. Sledi okužba sosednjih celic z listerijami (Adams, 2016).

2.2.1.1 Razmere za rast

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so fakultativne intracelične bakterije, ki se lahko razmnožujejo v celicah monocitno-makrofagnega sistema. *L. monocytogenes* je grampozitivna, psihrotrofna, fakultativno anaerobna, katalaza-pozitivna, oksidaza-negativna nesporogena bakterija. Je kokoidno-paličaste oblike. Raste lahko na običajni temperaturi hladilnika (približno 4 °C), tako da s shranjevanjem kontaminirane solate na nižji temperaturi ne zaustavimo njene rasti (Botticella in Russo, 2013). Bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko rastejo na narezanem zelju in zelenjavi kot je zelena solata tudi pri temperaturah okrog 5 °C, prav tako pa uporaba modificirane atmosfere pri skladiščenju nima večjega vpliva na rast teh bakterij. Bakterije vrste *L. monocytogenes* rastejo pri temperaturah med 0 in 42 °C, optimalno pa med 30 in 35 °C. Pod 5 °C je rast ekstremno počasna. Rast je inhibirana pri pH nižjem od 5,5 (Adams, 2016).

2.2.1.2 Bakterije vrste *L. monocytogenes* na solati

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so zmožne rasti na vseh ne-kislih živilih, preko katerih lahko vstopijo v prehrabeno verigo, kjer se lahko razmnožujejo. Večina zelenjave ima višje vrednosti pH, kot sadje, kar ustreza rastnim razmeram bakterij vrste *L. monocytogenes* (Adams, 2016). Pri zeleni solati se pH vrednosti gibljejo med 6 in 7. V študiji Carrasco in sod. (2008) zatrjujejo, da kadar so bakterije vrste *L. monocytogenes* prisotne, so sposobne tudi rasti na sveži "Ready-to-Eat" solati ledenki. Pakirana in narezana solata predstavlja ugoden medij za rast bakterij. Po 14 dneh skladiščenja pri 5 °C se je število bakterij povečalo za 3,66 log cfu/g, pri skladiščenju pri 13 °C pa je bilo povečanje števila bakterij za kar 4,85 log cfu/g. Modificirana atmosfera je upočasnila rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v primerjavi z navadno atmosfero (Carrasco in sod., 2008), medtem ko Adams (2016) zatrjuje, da modificirana atmosfera nima večjega vpliva na rast.

Sevi bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko rastejo na sveži narezani solati pri temperaturah okrog 5 °C. V večini držav je incidenca listerij pod 10 %, za vrsto *L. monocytogenes* pa je incidenca še manjša. V večini primerov, ko so bakterije vrste *L. monocytogenes* prisotne, je njihovo število majhno, ponavadi pod EU kriteriji za varnost zelene solate (pod 100 cfu/g solate). Na primer v regionalni raziskavi v Angliji so leta 2010 preverili 286 vzorcev pakirane sveže narezane solate na koncu njihovega roka uporabnosti. V 7,7 % so bile prisotne bakterije rodu *Listeria*, v 1,7 % pa so detektirali bakterije vrste *L. monocytogenes* (Adams, 2016).

2.2.2 Bakterije vrste *Escherichia coli*

Bakterije vrste *E. coli* sodijo v družino Enterobacteriaceae. So katalaza-pozitivne, oksidaza-negativne, fermentativne, gramnegativne, paličaste oblike (Adams, 2016).

Pri bakterijah vrste *E. coli* lahko nekateri serološki sevi povzročajo hude alimentarne toksiko-infekcije, prav tako pa lahko povzročajo kvar živil (Adamič in sod., 2003). *E. coli* je skoraj univerzalni prebivalec v človeških prebavilih in prebavilih toplokrvnih živali, kjer je predominantno fakultativni anaerob. Običajno so bakterije te vrste nepatogene, lahko pa so oportunistični patogeni, ki lahko povzročajo številne okužbe, npr. pljučnice in gastroenteritise pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom. Pri novorojenčkih lahko povzročajo meningitis. Pogosto se pojavljajo v blatu in so indikator fekalne kontaminacije in prisotnosti enteričnih patogenov, kot je *S. Typhi* v vodi. Preko okuženih živil se lahko prenašajo na ljudi (Adams, 2016).

Patogene seve bakterij vrste *E. coli*, ki povzročajo diarejo v osnovi razdelimo v 3 tipe: enteropatogene *E. coli* (EPEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) in enterotoksigene *E. coli* (ETEC). Po letu 1982 pa z identifikacijo serotipa O157:H7 poznamo še enterohemoragične *E. coli* (EHEC), sodobna tipa ki povzročata diarejo predvsem pri otrocih pa sta enteroagregativne *E. coli* (EaggEC) in površinsko/difuzno adherentne *E. coli* (DAEC). Poznamo tudi verotoksigene *E.coli* VTEC, kamor spada tudi novejši odkriti sev bakterije vrste *E. coli* O104:H4. Sev so detektirali pri izbruhi leta 2011, ko je bilo z njim okuženih 4321 ljudi (54 smrti) v 14 državah Evropske unije, v ZDA ter v Kanadi (Adams, 2016). V letu 2015 je bilo v EU potrjenih 5901 primerov okužb z STEC (ang. Shiga toxin-producing *E. coli*), od tega se jih je 8 končalo s smrtnim izidom. Podobno kot v prejšnjih letih je tudi v letu 2015 prevladovala okužba z seroskupino (ang. serogroup) O157 (41,7 %). STEC so detektirali v 2,9 % vzorcih testiranih živil. Največ je bilo okužb mesa prežvekovalcev (ovce, koze), sledile so okužbe surovega mleka in mlečnih izdelkov, zanimivo pa je bilo število pozitivnih vzorcev sadja in zelenjave zelo nizko (EFSA in ECDC, 2016).

2.2.2.1 Razmere za rast

Bakterije vrste *E. coli* spadajo med tipične mezofilne bakterije, saj rastejo pri temperaturah od 7–10 °C do 50 °C, optimalno pri 37 °C. Nekateri ETEC sevi rastejo tudi pri temperaturah okoli 4 °C. Za rast je ugoden nevtralen pH, rast pa je možna tudi pri nižjih pH (pod 4,4). Minimalna a_w za rast je 0,95 (Adams, 2016).

2.2.2.2 Bakterije vrste *E. coli* na zeleni solati

Izbruhi povzročeni z EHEC (enterohemoragične *E. coli*) so bili večkrat povezani z uživanjem zelene solate (Adams, 2016). Študija Asora-Finau in sod. (2015) je pokazala, da bakterije vrste *E. coli* predstavljajo glavno skrb tako s higienskega, kot tudi zdravstvenega tveganja za ljudi, kadar uživamo listnato zelenjavo. Prav tako pa Brandl (2006) navaja, da je bil sev bakterije vrste *E. coli* O157:H7 najpogosteje detektiran vir bakterijskih okužb ljudi preko sveže listnate zelenjave. Brandl in Amundson (2008), sta tudi dokazala sposobnost rasti bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na solati na polju in na že pobrani solati. Opazila sta, da je inkubacija pri višjih temperaturah, prisotnosti proste vode in ustreznih hranilih na listih, ugodna za rast bakterij. Takšne razmere se zlahka ustvarijo na polju, ko so prisotne višje temperature, rosa, dež in namakanje solate po pobiranju. Prav tako sta ugotovila, da ima starost listov bistveno vlogo za razmnoževanje bakterij. Na notranjih (mlajših) listih so se bakterije razmnoževale bolje, kot na starejših, zunanjih listih.

V študiji, kjer so preiskovali vpliv temperature na rast bakterij *E. coli* O158:H23 na zeleni solati v različnih časovnih obdobjih, so odkrili, da te bakterije lahko rastejo pri temperaturi višji kot 8 °C celo pri nižjem začetnem številu bakterij kot je 2,5 log cfu/g. Rezultati kažejo tudi to, da ta sev EPEC dobro raste tudi pri temperaturah višjih kot 16 °C. Večje povečanje bakterijske populacije je bilo zaznati že po 6-urnem skladiščenju solate pri 24 °C. Tu je bilo povečanje rasti za 0,9 log cfu/g ($N_0 = 2,5 \log \text{cfu/g}$) in za 1,5 log cfu/g ($N_0 = 3,5 \log \text{cfu/g}$) (Rodríguez-Caturla in sod., 2012). Iz rezultatov vidimo, da je višje začetno število bakterij na solati vplivalo na višje število bakterij po skladiščenju.

2.3 ADHEZIJA BAKTERIJ NA ZELENOLATO

V zadnjih desetletjih je vse več raziskav svežega sadja in zelenjave, te raziskave pa kažejo večjo pogostost prisotnih patogenov ki se prenašajo s hrano, kot smo mislili pred pojavom množičnih raziskav (Doyle in Erickson, 2008). Brandl in Mandrell (2002) sta poročala, da patogene bakterije tvorijo agregate in biofilme na površini svežih živil rastlinskega izvora.

Ena izmed najbolj zanimivih strategij rasti bakterij je tvorba biofilma na rastlini. Mikrobi biofilme lahko tvorijo na listih, na koreninah in celo v medceličnih prostorih rastlinskega tkiva. Prednost rasti v biofilmih je zaščita bakterij pred izsušitvijo, UV – sevanjem in drugimi okoljskimi stresnimi dejavniki. Zaščiteni so tudi pred naravno prisotno mikrobioto na površini, pred protimikrobnimi snovmi ki jih proizvaja sama rastlina ter pred kemijskimi postopki, ki so uporabljeni med samo predelavo živil (Lapidot in sod., 2006).

Mikrobna adhezija predstavlja prve stopnje tvorbe biofilma. Sama adhezija je lahko reverzibilna ali pa ireverzibilna. V prvi fazi adhezije se planktonske (nepritrjene) celice transportirajo na površino in se reverzibilno vežejo. Adhezijo omogočijo šibke fizikalne sile kot so van der Waalsove sile, elektrostatične sile in hidrofobne interakcije. K adheziji pa pripomore tudi Brownovo gibanje, gibanje bakterij s pomočjo raznih izrastkov kot so flagele, fimbrije in/ali pili. Pri ireverzibilni adheziji bakterijske celice ostanejo imobilizirane in trdneje vezane na kontaktno površino. Med bakterijskimi celicami in površino pritrditve poteka nepovratna kemijska reakcija (Dunne, 2002). Na molekularnem nivoju so v študijah predvsem raziskovali vloge specifičnih bakterijskih faktorjev adhezije na rastline. Tu je le malo genetskih elementov, ki so bili detektirani kot esencialni za adhezijo in rast človeških patogenov na rastlinah. Specifične bakterijske faktorje so identificirali z različnimi analizami in pristopi in največkrat ugotovili, da več dejavnikov vpliva na samo adhezijo (Yaron in Römling, 2014).

Solata je pogosto povezana z izbruhi patogenih bakterij, za razliko od zelja, kjer so izbruhi redki. Bakterije rodu *Salmonella* so se na solato pritrdile 2- do 3-krat bolje kot na zelje (Patel in Sharma, 2010).

2.3.1 Dejavniki, ki vplivajo na mikrobno adhezijo

Na proces mikrobne adhezije vpliva mnogo dejavnikov, ki jih razdelimo v 3 skupine: okoljske lastnosti, lastnosti površine medija in lastnosti mikroorganizma.

Okoljske lastnosti, ki večinoma vplivajo na adhezijo so: prisotnost protimikrobnih snovi, pH, temperatura, hitrost pretoka (hidrodinamika), čas izpostavljenosti, koncentracija mikroorganizmov, površinska napetost in ionska moč (jakost). Fizikalno-kemijske in morfološke lastnosti površine tudi vplivajo na učinkovitost mikrobne adhezije. Na primer, razširjenost privlačnih van der Waalsovih ali elektrostatskih sil je močno odvisna od površinskega naboja ali hidrofobnosti (Kokare in sod., 2009). Pomembna je tudi površinska prosta energija substrata (Stopar, 2007). Kemijska sestava, poroznost in hrapavost površine determinirajo višjo ali manjšo afiniteto mikroorganizmov do površine. Prav tako pa so za proces adhezije pomembni tudi površina in fizikalno-kemijske lastnosti mikroorganizmov (Watnick in Kolter, 2000). Stopar (2007) navaja da ima na adsorpcijo vpliv tudi sama površina mikrobov (npr. kapsula, LPS, EPS, proteini). Watnick in Kolter (2000) pa trdita, da med pomembne dejavnike adsorpcije štejemo tudi sposobnost mikroorganizmov za produkcijo EPS in prisotnost izvenceličnih izrastkov.

Na proces bakterijske adhezije vpliva več dejavnikov: vrsta bakterij, sestava površine za pritrdjanje, dejavniki okolja in esencialni geni produktov. Poenostavljeno velja, da adhezija med bakterijami in neživimi površinami običajno poteka z nespecifičnimi interakcijami (npr. hidrofobnimi), medtem ko adhezija med bakterijami in živimi ali devitaliziranimi tkivi zgodi s pomočjo posebnih molekularnih spojin mehanizmov (Carpentier in Cerf, 1993). Poleg začetnega števila bakterij in časa izpostavljenosti, vpliva na adhezijo tudi gostiteljevo tkivo in lastnosti različnih bakterij. Črevesni patogeni kot so bakterije vrste *E. coli* in bakterije rodov *Listeria* in *Salmonella* se bolje adherirajo na breskve kot na slive, saj je pri breskvah povečana površina zaradi prisotnih trihom (laskov) (Berger in sod., 2009; Shaw in sod., 2011).

Okoljski dejavniki so tudi pomembni pri sami adheziji bakterij. Adhezija patogenov na kumare v pralni vodi je odvisna od temperature, saj je pri nižji temperaturi adhezija manj obsežna. Adhezija bakterij na voskasto površino sadja je odvisna od vrste bakterij, saj je adhezija bakterij rodu *Listeria* večja na sadju brez voskov, kot na voskastem sadju. Ravno obratno pa je pri bakterijah seva *S. Typhimurium* in vrste *Staph. aureus* (Reina in sod., 2002).

2.3.2 Reverzibila in ireverzibilna adhezija bakterij na rastlinsko tkivo

Ključnega pomena za tvorbo biofilma je stik in adhezija bakterij na rastlinsko površino. Analize rastlinskih patogenov in simbiotov, kot so bakterije rodov *Rhizobium* in *Agrobacterium* na površine listov oz. korenin, so pokazale, da se bakterijski stik s površino rastlinskega tkiva zgodi v dveh fazah. V prvih nekaj sekundah je začetna adhezija šibka in reverzibilna. Gre za nespecifično vezavo, ki je ponavadi odvisna od hidrofobnih in elektrostatskih interakcij. V drugi fazi vezave pride do čvrste ireverzibilne pritrditve (Dunne, 2002). Pri ireverzibilni adheziji bakterij ne odstranimo več zlahka. Pri veliko simbiotih druga faza pritrditve vključuje bakterijske fibrile, ki omogočajo močnejšo pritrditev na ciljno površino (Laus in sod., 2005). Pride tudi so produkcije ekstracelularnega materiala, katerega masa lahko za 100-krat presega maso bakterij. Ekstracelularni biopolimeri oz. ekstracelularne polimerne substance (EPS) so predvsem zgrajene iz polisaharidov in vode (približno 90 %), osnovna enota pa je običajno zgrajena iz dveh ali treh sladkorjev. Med polisaharidi dvovalentni kationi lahko tvorijo elektrostatske mostove med karboksilnimi in sulfatnimi skupinami, kar stabilizira biofilm (Stopar, 2007). Adhezija je ireverzibilna takrat, ko pritrjenih bakterij ne moremo odstraniti z enostavnim pranjem z vodo (Yaron in Römling, 2014).

Študije adhezije enterobakterij kažejo, da se le-te hitro pritrdijo na različna rastlinska tkiva (liste, plodove, korenine). Samo adhezijo je najbolje ocenjevati v prvih 4 urah po kontaminaciji, saj bakterije po 4 urah že lahko začno rasti ali pa odmirati, kar onemogoča razločiti samo adhezijo od ostalih procesov, kot sta rast in preživetje bakterij na rastlinskem tkivu. Shema adhezije je podobna tako na rastočih, kot tudi že odrezanih delih rastlin (Yaron in Römling, 2014).

2.3.3 Bakterijski biofilmi

Biofilmi so kompleksne skupnosti mikroorganizmov, kjer se celice pritrdijo na površino in med seboj ter proizvajajo ekstracelularne polimerne substance (EPS). Glavna komponenta biofilmov je voda (do 97 %), bakterijske celice pa predstavljajo do 35 % suhe mase. Žive in nežive bakterije, raznolikost izločenih komponent kot so polisaharidi, proteini, lipopolisaharidi (LPS), DNA in lipidi prispevajo k suhi masi biofilma (Costerton in sod., 1999).

Razvoj bakterijskih biofilmov na površinah je tipično večstopenjski. Verjetno gre za tak razvoj tudi na površinah rastlinskega tkiva. Začetne stopnje tvorbe biofilma so odvisne od bakterijske gibljivosti, ki omogoča prosto gibajočim bakterijam, da dosežejo primerno površino. Posledično imajo flagele vlogo organela za gibljivost in omogočajo, da bakterije prispejo na željen habitat, kjer se lahko adherirajo na

površino. Stroga regulacija rotacije in funkcionalnosti flagel je pozneje ključnega pomena za optimalno tvorbo biofilma. Nato se bakterije ireverzibilno adherirajo na površino. Tvoriti se začne mikrokolonije in izločati se začne EPS, ki je nujen za interakcijo celic s ciljno površino in površino ostalih celic, s katerimi skupaj tvorijo kompleksno obliko biofilma. Proteini imajo biofilmskem matriksu tako strukturne, kot tudi fiziološke funkcije. EPS zagotavljajo mehanično stabilnost in imajo vlogo zadrževanja vode in razpoložljivosti hranil. V kasnejših fazah razvoja biofilmov se mikrokolonije razvijejo v zrele biofilme kompleksnih tridimenzionalnih struktur. Bakterije se lahko pasivno ali aktivno odstranijo iz biofilma - individualno ali v skupinah in tako se lahko razširijo v novo okolje. Glavne komponente regulacije različnih stopenj razvoja biofilmov so okoljski signali, zaznavanje celične gostote (ang. quorum sensing) in ciklični dimer guanozin monofosfat (di-GMP) kot sekundarni prenašalec sporočil (Blair in sod., 2008). Zunajcelična DNA (eDNA) tudi predstavlja pomembno komponento biofilmov. V biofilmski kompleks preide zaradi avtolize nekaterih bakterijskih celic ali programirane celične smrti. Npr. pri bakterijah vrste *Pseudomonas aeruginosa* se eDNA sprosti z lizo bakterijske subpopulacije ob nadzoru zaznavanja celične gostote. eDNA predstavlja pomemben mehanizem horizontalnega prenosa genov v bakterijah. Kadar pa je eDNA prisotna na površini bakterijske celice pa le-ta vpliva na večjo stopnjo adhezije in površinsko agregacijo, zaradi domnevno ugodnih kislinsko-bazičnih interakcij. eDNA vzpodbuja tudi termodinamsko ugodne pogoje za bakterijsko adhezijo na hidrofobne površine. Bakterije se ob prisotnosti eDNA adherirajo tudi hitreje (Montanaro, 2011; Das in sod., 2010).

2.3.4 Adhezija bakterij vrste *E. coli* na zeleno solato

Več raziskovalcev je preiskovalo vpliv celičnega naboja na površini, prisotnost divalentnih kationov, hidrofobnost in produkcijo kapsule pri pasivnem ali aktivnem procesu adhezije bakterij vrste *E. coli* na tkivo solate (Hassan in Frank, 2003). Če povzamemo študije kažejo le malo korelacij med prisotnostjo celičnih izrastkov na površini, nabojem ali hidrofobnostjo ter sposobnostjo bakterij za adhezijo solatnega tkiva (Yaron in Römling, 2014). Tretiranje s hidrofobnim surfaktantom Span85 je odstranilo le 80 % vseh adheriranih bakterij vrste *E. coli* O157:H7 iz intaktnih listov solate. Surfactant ni bil učinkovit pri odstranjevanju bakterij na narezanih solatnih listih (Hassan in Frank, 2003).

V eni od študij so dokazali, da bakterije seva *E. coli* O157:H7 tkivo zelene solate kupljene v trgovini naselijo in kolonizirajo v relativno kratkem času. Težavo predstavlja odstranjevanje bakterij, saj jih ne moremo v celoti odstraniti s preprostim spiranjem ali tretiranjem s klorom (Solomon in sod., 2006). Po adheziji bakterij na površino solate pride tudi do tvorbe biofilma. Patel in sod. (2011), so raziskovali čas

adhezije in rast bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na sveži solati ledenki in romanski solati. Ugotovili so, da se preiskovane bakterije adherirajo že po 5 minutah. Prisotnost hidrofobne voskaste kulikule na površini intaktnih solatnih listov olajša adhezijo hidrofobnih *E. coli* O157:H7. Preiskovali so tudi adhezijo bakterij na narezane in na intaktne solatne liste, kjer so dognali, da je adhezija bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na narezane površine večja kot na intaktne liste (Preglednica 3). To pripisujejo večji površini za kolonizacijo in koagregaciji bakterij. Po drugi strani pa Ukuku in Fett (2002) nista zaznala statistično značilnih razlik med sevoma bakterije vrste *E. coli* O157:H7 v povezavi z hidrofobnostjo celične površine in stopnjo ter močjo adhezije.

Preglednica 3: Adhezija različnih sevov bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na intaktno in rezano površino solate ledenke (Patel in sod., 2011)

Oznaka seva <i>E. coli</i> O157:H7	Površina solate	Število bakterij (log cfu/cm ²) ± SD			
		0 h	1 h	4 h	24 h
1918	Intaktna	4,59 ± 0,84 ax	3,71 ± 0,22 bx	4,44 ± 0,14 ax	5,09 ± 0,72 axy
5279		3,77 ± 0,15 by	3,97 ± 0,16 ax	4,23 ± 0,05 ax	5,64 ± 0,55 ax
4407		4,04 ± 0,09 axy	3,92 ± 0,09 ax	4,09 ± 0,25 ax	5,73 ± 0,56 ax
4688		4,06 ± 0,11 axy	4,00 ± 0,21 bx	4,54 ± 0,56 ax	5,51 ± 0,29 ax
4406		3,92 ± 0,07 ay	3,90 ± 0,23 ax	4,24 ± 0,28 ax	4,79 ± 0,26 ay
1918	Narezana	4,74 ± 0,06 bx	4,80 ± 0,15 bx	5,18 ± 0,06 bx	6,76 ± 0,34 ax
5279		4,39 ± 0,12 bx	5,06 ± 0,35 bx	4,92 ± 0,13 bx	6,57 ± 0,25 ax
4407		4,73 ± 0,16 bx	5,05 ± 0,32 bx	4,96 ± 0,27 bx	6,79 ± 0,57 ax
4688		4,61 ± 0,04 bx	4,78 ± 0,24 bx	4,89 ± 0,06 bx	6,48 ± 0,14 ax
4406		4,64 ± 0,11 bx	5,06 ± 0,32 bx	5,11 ± 0,08 bx	6,73 ± 0,49 ax

Legenda: Rezultati so izraženi s povprečnimi vrednostmi števila bakterij (log cfu/cm²), tri ponovitve eksperimenta; a, b, c: povprečne vrednosti, ki sledijo različnim črkam znotraj vrstice so statistično značilno različne ($P < 0,05$); x, y: povprečne vrednosti, ki sledijo različnim črkam v koloni so statistično značilno različne ($P < 0,05$)

2.3.4.1 Mehanizmi adhezije bakterij vrste *E. coli*

Mehanizmi, ki jih uporabljajo bakterije vrste *E. coli* za adhezijo in obstojnost na abiotiskih površinah in površinah celic sesalcev so delno podobni kot mehanizmi rastlinskih patogenov in simbiotov (Yaron in Römling, 2014). Sevi bakterij vrste *E. coli* imajo lahko številne pile, fimbrije ali nefibrilarna adhezivna sredstva, ki imajo funkcijo pritrjanja bakterij. Pili in fimbrije so laskom podobne strukture na površini

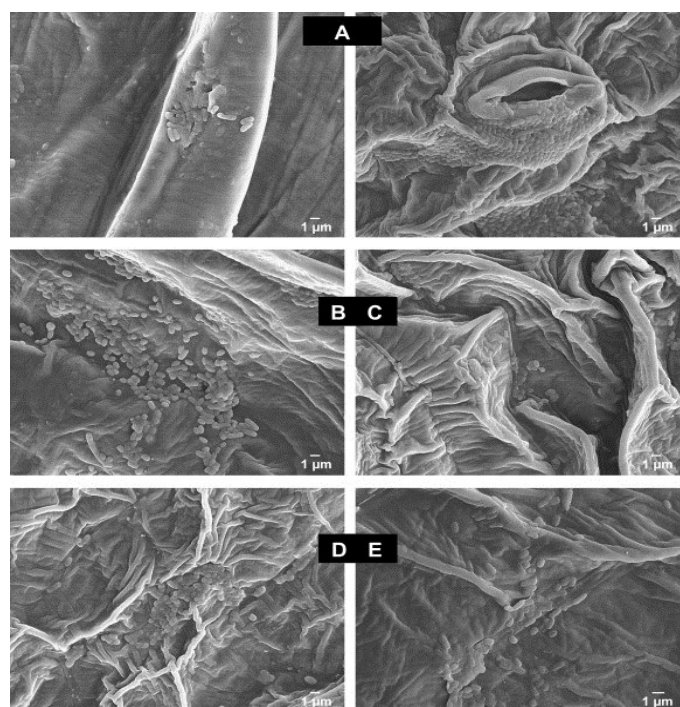
bakterijskih celic, ki pogosto na svojih konicah vsebujejo adhezivne snovi z afiniteto do različnih ogljikovih hidratov. Pri bakterijah vrste *E. coli* so znani primeri fimbrij tipa 1, P, S in F1C. Raziskali so številne adhezine in fimbrije bakterij vrste *E. coli*, med katerimi so največkrat raziskane navite amiloidne fimbrije (ang. amyloid curli fimbriae). V raziskavah so gene za te fimbrije izbrisali, kljub temu pa je bil efekt zmanjšanja adhezije majhen. To kaže na kompleksnost adhezije patogenov na rastlinska tkiva. Na primer tudi mutacija gena *csgA* (prekurzor za tvorbo navitih fimbrij) je imela le majhen vpliv na spremembo adhezije bakterij vrste *E. coli* na kalčke (Torres in sod., 2005). Tudi celuloza kot glavni eksopolisaharid biofilmskega matriksa je adherentni faktor ne samo bakterij vrste *E. coli*, ampak tudi drugih simbiotov in patogenov (Yaron in Römling, 2014).

Shaw in sod. (2008) so preučili mehanizme adhezije bakterij vrste *E. coli* O157:H7 (EHEC) na liste rukole (*Eruca vesicaria*). Rezultati so pokazali, da je za adhezijo bakterij na filosfero potrebno izražanje T3SS genov. Gre za sistem izločanja tipa III (ang. filamentous type III secretion system), ki je sestavljen iz filamentov EspA (Knutton, 1995), zato so preučili vlogo filamentov EspA pri bakterijski adheziji na listno površino. EspA je protein, ki ga izločajo EHEC ter EPEC in je udeležen pri indukciji signalov v epitelnih celicah. V preiskavi so z mutacijo ustvarili sev EHEC brez EspA, za kontrolo pa so uporabili dva seva, ki sta vsebovala filamente EspA. Kjer so liste rukole inokulirali z mutiranim sevom EHEC brez EspA se je adhezija bakterij bistveno zmanjšala. Z imunofluorescenco in SEM so pokazali, da filamenti EspA posredujejo adhezijo EHEC tudi na solatne in špinadne liste. Mehanizmi adhezije na liste rastlin pa so podobni, kot pri adheziji v črevesju sesalcev. Bakterije vrste *E. coli* T3SS so zasnovane tako, da translocirajo efektorske proteine v celicah sesalcev; proteinska translokacija pa je posredovana z ATPazami EscN (encimi, ki katalizirajo pretvorbo ATP v ADP) (Garmendia in sod., 2005). Z delecijo EscN ali EspA pa se izgubi adhezivna aktivnost bakterij na površino listov. V nasprotju s kolonizacijo črevesja sesalcev je adhezija EHEC na liste neodvisna od translokacije efektorskih proteinov. V študiji ugotavljajo tudi, da imajo flagele, pili in drugi adhezini minimalno (ali pa je nimajo) vlogo pri adheziji EHEC na filosfero. Po drugi strani pa so Xicohtencatl-Cortes in sod. (2009) pokazali, da flagele igrajo vlogo pri adheziji bakterij vrste *E. coli* serotipa O157 na liste. Izvedli so delecijo *fliC* kodirajočega flagelina, kar je vplivalo za zmanjšanje adhezije. Shaw in sod. (2011) so kasneje v eni izmed svojih preiskav ugotovili, da imajo flagele glavno vlogo pri adheziji ETEC na epidermis svežih solatnih listov. Glede na omenjena dognanja raziskav se zdi, da so bakterije vrste *E. coli* dobro prilagojene na filosfero in da uporabljajo številne mehanizme za kolonizacijo rastlin.

2.3.5 Adhezija bakterij vrste *L. monocytogenes* na zeleno solato

Biofilmi na sveži zelenjavi, ki jih tvorijo bakterije vrste *L. monocytogenes*, predstavljajo resno grožnjo varnosti uživanja sveže zelenjave (Slika 3). Problem predstavljajo predvsem, ko so bakterije vrste *L. monocytogenes* dlje časa prisotne v procesnem okolju, kjer so lahko vir ponavljajočih se okužb, saj jih je v celoti težko odstraniti (Botticella in Russo, 2013).

Botticella in Russo (2013) so obravnavali mikrobiološko varnost svežih živil. Med drugim so pregledali tudi strukturo in fiziologijo biofilmov bakterij vrste *L. monocytogenes*. Biofilm, ki ga tvorijo bakterije, je v obliki tridimenzionalne gobe in vsebuje z vodo napolnjene kanale, pore ter več preprostih struktur, kot so monosloji. Sam proces tvorbe biofilma je odvisen od več okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, pH, osmolarnost, izpostavljenost žolčnim solem, statično/dinamični pogoji rasti in narava koloniziranih površin. V okoljih procesiranja hrane lahko biotski faktorji povzročijo nastanek biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* (Botticella in Russo, 2013).



Slika 3: Adhezija bakterij vrste *L. monocytogenes* ($N_0 = 10^8$ cfu/ml) in tvorba biofilmov na površini solate po 48-urnem skladiščenju pri 10 °C (Olmez in Temur, 2010)

Legenda: A-netretirana solata; B-solata tretirana z vodo (namakanje solate v 200 ml vode, 2 min, 10 °C); C-solata tretirana z ozonom (namakanje solate v 200 ml raztopine koncentracije 2 mg/l, 2 min, 10 °C); D-solata tretirana s klorom (namakanje solate v 200 ml raztopine koncentracije 100 mg/l, 2 min, 10 °C); E-solata tretirana z organskimi kislinami (namakanje solate v 200 ml raztopine koncentracije 0,25 g/100 g citronske kisline + 0,50 g/100 g askorbinske kisline; 2 min; 10 °C)

2.3.5.1 Mehanizmi adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes*

Naravno prisotni mikroorganizmi imajo lahko pozitivne ali negativne vplive na tvorbo biofilmov z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Zaviranje nastanka biofilmov lahko temelji na izločanju protimikrobnih snovi ali na kompeticiji bakterij za pomembne hranilne snovi. Nasprotno prisotnost nekaterih bakterijskih vrst, vključno z bakterijami vrst *Pseudomonas fragi* in *Staph. aureus*, lahko poveča možnosti za tvorbo biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes*. Ti mehanizmi še niso bili natančneje raziskani, vendar naj bi bila osnova v vključitvi majhnih sekrecijskih peptidov (Botticella in Russo, 2013).

Bae in sod. (2013) so raziskovali potencialne virulenčne dejavnike bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki pripomorejo k pritrjanju bakterij na sveža živila. Preučevali so adhezijo *L. monocytogenes* F2365, serotipa 4b, na sadje in zelenjavo. Pregledali so 32 genov, ki kodirajo površinske proteine in lipaze, da bi našli močno izražene gene na solatnih listih. Z analizo *in silico* so pokazali, da gen LMOF2365_0859 vsebuje domnevno celulozno vezavno domeno, zato so postavili hipotezo, da je ta gen vključen pri adheziji bakterij na zelenjavo. Gen so poimenovali *lcp* (gen, ki kodira listerijski povezovalni protein na celulozo). S homologno rekombinacijo so ustvarili LCP neg. mutant – to je sev, ki ima mutiran gen *lcp* in LCP komplementarni sev. Nato so ovrednotili zmožnost pritrjanja sevov: LCP neg. mutant, LCP komplement in divji sev (ang: wild type) na solatne liste. Pritrjanje LCP neg. mutanta na solatni list je bilo bistveno slabše, kakor LCP komplementnega seva in divjega seva (WT). Te ugotovitve so potrdili še s fluorescenčno mikroskopijo in FE-SEM (ang. field emission scanning electron microscopy), kar kaže na to da ima gen *lcp* pomembno vlogo pri pritrjanju bakterij vrste *L. monocytogenes* na zeleno solato (Bae in sod., 2013).

Več molekulskih determinant je povezanih z nastankom biofilma v različnih fazah. Pomembno vlogo pri tvorbi biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* imajo flagele, sistemi medcelične komunikacije (ang. quorum sensing) in ekstracelularna DNA. Flagele so zelo pomembne pri tvorbi biofilmov pri več bakterijskih vrstah. Mutanti bakterij vrste *L. monocytogenes* s flagelami so bolj gibljivi, kot tisti brez flagel, kar ima pomembno vlogo pri tvorbi biofilma. *PrfA* je pomemben virulenčni dejavnik in regulator biosinteze flagel. Je posredno vključen v regulacijo tvorbe biofilmov. Sistemi medcelične komunikacije tudi sodelujejo pri tvorbi biofilma. Vsebujejo sistem *LuxS* in peptidni sistem *agr*, čigar komponente so kodirane z operonom *agr*. Mutanti brez gena *LuxS* slabše tvorijo biofilme. Izvencelični matriks (EPS) biofilma je zelo kompleksna zmes več snovi, ki običajno vključujejo tudi zunajcelično DNA (eDNA). eDNA ima pomembno vlogo pri tvorbi biofilma bakterij vrste *L. monocytogenes* (Botticella in Russo, 2013).

2.4 PREPREČEVANJE ADHEZIJE BAKTERIJ NA ZELENO SOLATO

V literaturi avtorji navajajo različne metode, ki bolj ali manj vplivajo na zmanjšanje adhezije patogenih bakterij na zeleno solato (*Lactuca sativa* L.). V zadnjem času je povdarek na naravnih, neagresivnih sredstvih in postopkih za zmanjšanje adhezije na površino solate. V to skupino spadajo pranja ali namakanja z vodo, uporaba eteričnih olj, organskih kislin, bakteriofagov, bakteriocinov in različnih modificiranih atmosfer skladiščenja. Raziskuje se tudi fizikalne metode zmanjševanja adhezije, kot so uporaba ozona, ultrazvoka, UV-sevanja. Nekateri pa še vedno preizkušajo uporabnost in varnost kemijskih snovi, kot je npr. uporaba H_2O_2 . Pri vseh postopkih je pomembno, da metoda, s katero vplivamo na manjšo adhezijo bakterij, nima prevelikega negativnega vpliva na senzorične lastnosti in varnost živil.

Nedavne analize izbruhov obolenj, ki so jih povzročile patogene bakterije in pri katerih so identificirali vir okužbe, kažejo, da se najmanj 20 % živil kontaminira na kmetiji, preostale kontaminacije živil pa se pojavijo zaradi nepravilnega rokovanja z živili v nadaljevanju živilsko-predelovalne verige (Yaron, 2014). Patogeni mikroorganizmi navadno preživijo zelo dolgo na svežih živilih. Bakterije vrste *E. coli* O157:H7 preživijo na peteršilju 177 dni (Islam in sod., 2004). Enterobakterije ne samo da preživijo, ampak se tudi zaradi ugodnih razmer razmnožujejo na rastlini vse dokler rastline ne zaužije drug gostitelj. Zaradi tega je smiselno raziskati intimne interakcije med bakterijami in rastlinami (Shirron in Yaron, 2011).

Kadar pridejo bakterije vrste *L. monocytogenes* v stik s solatno površino, tam ostanejo in se razmnožujejo. Carrasco in sod. (2008) so ugotovili, da skladiščenje solate ledenke v modificirani atmosferi (4,65–6,2 % CO_2 ; 1,2–4,3 % O_2 in ravnovesje N_2) upočasni rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v primerjavi z navadno atmosfero pri 14-dnevnem skladiščenju solate pri 5 °C za 1,8-krat in pri 13 °C za 4-krat.

ListShield™ je komercialni koktajl bakteriofagov specifičnih za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Tretiranje umetno kontaminirane solate (z bakterijami vrste *L. monocytogenes*) s komercialnim koktajlom ListShield™ je prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* zmanjšalo za 91 % ($P < 0,05$) oz. za 1,1 logaritemsko stopnjo. Uporaba koktajla ni vplivala na poslabšanje senzoričnih lastnosti, saj ni bilo zaznanih razlik v barvi, okusu in izgledu. Biološki nadzor bakterij vrste *L. monocytogenes* z litičnimi bakteriofagnimi pripravki, kot je ListShield™, lahko ponudi okolju prijazen način za zmanjšanje tveganja pojava listerioze zaradi uživanja sveže solate (Perera in sod., 2015).

Litičnim encimom (lizini) pripisujejo vse večjo uporabnost. Kot protimikrobna sredstva so lahko učinkoviti proti grampozitivnim kvarljivcem in patogenim bakterijam. Uporabni so predvsem kot alternativa, zaradi razvoja odpornosti sevov na

antibiotike in terapije z bakteriofagi. Takšni lizini veliko obljublajo v boju z bakterijami vrste *L. monocytogenes* (Van Tassell in sod., 2016).

Sagong in sod. (2001) so izvedli študijo z namenom primerjave uspešnosti posameznih tretiranj z ultrazvokom in organskimi kislinami ter njihovimi kombinacijami na zmanjšanje okužb sveže solate s patogenimi mikroorganizmi. Solatne liste so inokulirali z bakterijami vrst *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium in *L. monocytogenes*. Tretiranje je potekalo z ultrazvokom (40 kHz), z organskimi kislinami (0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0 %) ali pa s kombinacijo ultrazvoka in organskih kislin. Kombinirano tretiranje z ultrazvokom in organskimi kislinami je bilo najuspešnejše, saj je povzročilo dodatno zmanjšanje koncentracije bakterij patogenih bakterij za 0,8 do 1,0 log cfu/g. Najvišje zmanjšanje števila bakterij vrste *L. monocytogenes* je bilo opaziti pri tretiranju z ultrazvokom in 2 % organsko kislino (5 minut), in sicer je znašalo 2,87 log cfu/g.

V študiji so Barbosa in sod. (2016) samostojno ali v kombinaciji ocenili učinek eteričnih olj iz origana (OVEO) in rožmarina (ROEO) na listnati zelenjavi proti patogenim bakterijam vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *S. Enteritidis*. Vključitev OVEO in ROEO različnih koncentracij v zelenjavno brozgo je povzročilo zmanjšanja bakterijskih celic vseh testnih sevov v 24 urah. Zmanjšala se je tudi nativna fluora (mezofilne bakterije, enterobakterije in glive). Te ugotovitve krepijo racionalnost uporabe OVEO in ROEO v kombinaciji z namenom zagotavljanja varnosti in daljšanja življenjske dobe sveže zelenjave.

V raziskavi so Back in sod. (2014) preiskovali vpliv vodikovega peroksida na zmanjšanje števila bakterij vrst *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 in *L. monocytogenes* na solati. Solato so inokulirali s sevi patogenih bakterij, nato pa je sledilo tretiranje s pršenjem z H_2O_2 za 0, 2, 4, 6, 8 in 10 minut. Koncentracije H_2O_2 pa so bile 0, 1, 3, 5 in 10 %. S podaljšanjem časa in z večanjem koncentracije je bila dokazana večja redukcija bakterij v primerjavi s kontrolo. Najbolj učinkovita kombinacija je bila tretiranje z 10 % H_2O_2 za 10 minut, saj je število bakterij *L. monocytogenes* zmanjšalo za 2,95 log cfu/ml.

2.4.1 Pranje zelene solate in vpliv na redukcijo bakterij vrste *L. monocytogenes*

Cilj raziskave Domenech in sod. (2013) je bil ugotoviti vlogo potrošnika v fazi pranja solate doma v povezavi z verjetnostjo pojava okužb zaradi prisotnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* na solati. V preiskavi so proučevali krivulje rasti oz. prisotnost bakterij po pranju z vodo (potapljanje z dodatkom belilnega sredstva in pranje pod tekočo vodo).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so inokulirali, tako da so 2,5 g dele listov potopili v inokulacijsko tekočino (sterilna deionizirana voda, $N_0 = 10$ cfu/ml) za 10 minut ob stalnem mešanju. Po inkubaciji bakterij na solatnih listih so 25 g kose solate potapljali v vodo (koncentracija klora v vodi je znašala 0,7 ppm) in različne koncentracije raztopine klora (4, 8, 40 ppm) za 5, 15 in 30 minut (Preglednica 4). Del vzorcev pa so spirali pod tekočo vodo (0,7 ppm) 10, 20, 30, 45 s, pretok je znašal 2 l/min (Preglednica 5). Število mikroorganizmov so določili v skladu z UNE-EN/ISO 11290-2 metodo štetja in izrazili kot log cfu/g solate.

Preglednica 4: Redukcija bakterij vrste *L. monocytogenes* po spiranju solatnih listov s tekočo vodo in po potapljanju kontaminiranih solatnih listov v vodo z različnimi koncentracijami natrijevega hipoklorida (n = 4) (Domenech in sod., 2013)

Čas (min)	Redukcija števila bakterij $\pm$ SD (log cfu/g)				
	Tekoča voda	Potapljanje v raztopine natrijevega hipoklorida			
	0,7 ppm	0,7 ppm	4 ppm	8 ppm	40 ppm
1	1,10 $\pm$ 0,04	/	/	/	/
5	/	1,05 $\pm$ 0,05	1,57 $\pm$ 0,09	1,68 $\pm$ 0,06	1,72 $\pm$ 0,14
15	/	1,13 $\pm$ 0,12	1,31 $\pm$ 0,10	1,72 $\pm$ 0,17	1,87 $\pm$ 0,20
30	/	1,11 $\pm$ 0,07	1,91 $\pm$ 0,08	2,04 $\pm$ 0,20	1,97 $\pm$ 0,10

Legenda: SD: standardna deviacija, ppm: število delcev na milijon (ang. parts per million)

Rezultati potapljanja kontaminiranih listov v različne raztopine natrijevega hipoklorida kažejo, da se s potapljanjem zmanjša število adheriranih bakterij za 1-2 log cfu/g, odvisno od koncentracije raztopine in časa zadrževanja (Preglednica 4). Pri uporabi vode za odstranjevanje bakterij daljši čas namakanja (15 min., 30 min.) ni imel večjega vpliva na zmanjšanje števila bakterij *L. monocytogenes*. Pri 5 minutnem namakanju v vodi se je koncentracija bakterij zmanjšala za 1,05 $\pm$ 0,05 log cfu/g, pri 30 minutnem namakanju pa za 1,11 $\pm$ 0,07 log cfu/g (Preglednica 4). Pri spiranju listov s tekočo vodo se po 10 sekundah število bakterij zmanjša za 0,63 $\pm$ 0,06 log cfu/g, po 60 sekundah pa za 1,10 $\pm$ 0,04 log cfu/g. Rezultati redukcije števila bakterij vrste *L. monocytogenes* kažejo, da se potrošniki lahko soočijo le z manjšimi koncentracijami bakterij vrste *L. monocytogenes*. Ko je začetna koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* v inokulacijski raztopini približno 10^6 log cfu/ml ali več nobeno izmed preiskovanih tretiranj bistveno ne zmanjša števila bakterij (Domenech in sod., 2013). Iz tega sklepamo, da se preostale dodane bakterije, katere s spiranjem in namakanjem ne odstranimo, adherirajo na solatni list in jih je težje odstraniti.

Li-Cohen in Bruhn (2002) sta ugotovila, da 4 % ljudi ne pere zelenjave, 11 % ljudi postavi zelenjavo v posodo z vodo, 84 % ljudi pa pere zelenjavo pod tekočo vodo, le 1 % ljudi pa v posodo z vodo dodaja klor ali druge komercialne pripravke. Iz raziskave Domenech in sod. (2013) razberemo, da med uporabo 30 minutnega namakanja v vodi v primerjavi z uporabo 30 s spiranja solate pod tekočo vodo ni bistvenih razlik v zmanjšanju števila bakterij. Na podlagi te ugotovitve sklepamo, da je v enakem času za zmanjšanje bakterij uspešnejše spiranje solate pod tekočo vodo.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali bakterije vrst *Escherichia coli* ŽM513 (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, VF 3584, izolat iz tatarskega bifitka) in *Listeria monocytogenes* ŽM509 (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, brez oznake (/), živilski izolat).

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Za mikrobiološke preiskave smo uporabljali sledeča gojišča:

Izpirek solate: V 100 ml bidestilirane vode (ddH₂O) smo namočili nepoškodovan solatni list s površino približno 200 cm² (1 minuta). Izpirek smo nato prefiltrirali preko filter papirja (velikost por 0,22 µm) ter ga uporabili kot gojišče za rast bakterij vrste *E. coli*. Preverili smo tudi adhezijo v izpirku solate namnoženih bakterij vrste *E. coli* na polistiren v mikrotitrski ploščici.

Modelno gojišče 1 (MOD1): sterilizirana ddH₂O z 1 g/l pepton (Biolife, 4122592, Milano, Italija); 0,5 g/l NaCl (Merck, 7647-14-5, Darmstadt, Nemčija)) z dodatkom glukoze (0,5 mg/l) (Sigma-Aldrich, 16325, Steinheim, Nemčija) in fruktoze (0,5 mg/l) (Merck KGaA, 1.04007.0250, Darmstadt, Nemčija)

Modelno gojišče 2 (MOD2): sterilizirana ddH₂O z (1 g/l pepton; 0,5 g/l NaCl) z dodatkom glukoze (0,5 mg/l) in fruktoze (0,5 mg/l) in galaktoze (1 g/l) (Kemika, /, Zagreb, Hrvaška)

Uporabljali smo tudi komercialna mikrobiološka gojišča (Preglednica 5), ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalcev.

Preglednica 5: Komercialna mikrobiološka gojišča

Gojišče	Oznaka in proizvajalec
Gojišče agarozni kazeinsko peptonski glukozno kvasni ekstrakt	PCA, ang. Plate Count Agar, Merck, 1.05463.0500, Darmstadt, Nemčija
Gojišče triptični sojin agar	TSA, ang. Tryptone Soy Agar, Biolife, 4021502, Milano, Italija
Gojišče triptični sojin bujon	TSB, ang. Tryptone Soy Broth, Biolife, 4021552, Milano, Italija
Gojišče ALOA z dodatki: • Selektivni dodatek (ALOA Enrichment Selective Supplement Biolife, 423501, Milano, Italija) • Sterilna destilirana voda (destilirana in sterilizirana pri temperaturi 121 °C, tlaku 1,2 bar in času 20 minut) • Etanol (Merck, 1.00983.1000, Darmstadt, Nemčija)	ALOA, ang. Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti, Biolife, 4016052, Milano, Italija
Gojišče TBX (tripton žolčni agar z glukuronidom X)	TBX (ang. Tryptone Bile X – Glucuronide Agar), Merck, 1.16122.0500, Darmstadt, Nemčija
Gojišče DRBC (/)	DRBC (ang. Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar), Oxoid LTD., CM0727, Hampshire, Anglija
Gojišče BZLŽB (briljantno zeleni žolčni bujon)	BZLŽB (ang. Brilliant Green Bile Broth), 2 %, Biolife, 4012652, Milano, Italija
Gojišče Fraser z dodatki: • Selektivni dodatek (ang. Fraser supplement, Merck, 1.000.930.010, Darmstadt, Nemčija) • Amonijev železov (III) citrat, 100093	Fraser (ang. Fraser Listeria selective enrichment broth (base)), Merck, 1.10398.0500, Darmstadt, Nemčija
Gojišče Half Fraser z dodatki: • Selektivni dodatek (ang. Fraser supplement, Merck, 1.000.930.010, Darmstadt, Nemčija) • Amonijev železov (III) citrat, 100093	Fraser (ang. Fraser Listeria selective enrichment broth (base)), Merck, 1.10398.0500, Darmstadt, Nemčija
Fiziološka raztopina • Kalijev dihidrogen fosfat- KH_2PO_4	Merck, 1.04873.0250, Darmstadt, Nemčija

Kot barvilo za obarvanje na polistiren v MTP vezanih bakterijskih celic smo uporabili 1 % kristal violet (Merck, 101408.0100, Darmstadt, Nemčija).

Pri kemijskih analizah solatnega lista in solatnega izpirka smo uporabljali kemikalije navedene v Preglednici 6.

Preglednica 6: Kemikalije uporabljene za kemijske analize

Kemikalija	Oznaka in proizvajalec
Hidroksilamin	Sigma-Aldrich, LOT 57H0391, Steinheim, Nemčija
Piridin	Sigma-Aldrich (Chemie), LOT STBC4248V, Steinheim, Nemčija
Heksametildisilazan (HMDS)	Sigma-Aldrich (Chemie), LOT BCBF8773V, Steinheim, Nemčija
Trifluoroocetna kislina (TFS)	Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich), LOT 63450, Steinheim, Nemčija
Bidestilirana voda (ddH ₂ O)	Millipore
Glukoza	Sigma-Aldrich, 16325, Steinheim, Nemčija
Fruktoza	Merck KGaA, 1.04007.0250, Darmstadt, Nemčija
Saharoza	Sigma-Aldrich, 90825, Steinheim, Nemčija

3.1.3 Naprave in laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali različno laboratorijsko opremo in naprave (Preglednica 7).

Preglednica 7: Naprave in laboratorijska oprema pri eksperimentalnem delu

Laboratorijska oprema in naprave	Oznaka in proizvajalec
Naprava za proizvodnjo bidestilirane vode	Millipore
Avtoklav	Sutjeska, serija 1-61-17, Srbija
Avtoklav	Sutjeska, tip 500 × 700, Srbija
Digestorij	tip 382
Hladilna omara	LTH, Slovenija
Inkubator	Kambič, tip I-105 CK, Slovenija
Inkubator	Kambič, tip I-45-4M, Slovenija
Brezprašna mikrobiološka komora	Iskra PIO, SMBC 122 AV, Slovenija
Tehtnica	Mettler Toledo, AB204-S, Švica
Tehtnica	Mettler Toledo, PB1502-S/A, Švica
Namizno mešalo	Yellowline, TTS 2, TIP T, Nemčija
Pipete in nastavki za pipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Plastične petrijevke	Golias Labortehnika, Slovenija
Mikrotitrerske ploščice	Thermo Scientific, ZDA
Sušilnik	Philips SalonDry Compact

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje Preglednice 7: Naprave in laboratorijska oprema pri eksperimentalnem delu

Laboratorijska oprema in naprave	Oznaka in proizvajalec
Gnetilnik	Seward, Stomacher 400, tip BA 7021, Anglija
Vrečke za gnetilnik	Golias Labortechnika, Slovenija
Plastični lončki 100 ml	Golias Labortechnika, Slovenija
Sekljalnik	Ultra Turrax T25 Janke & Kunkel, Nr. 533355
Ultrazvočna kopel	Omnilab 950, BL Pharma 425 000001268
Naprava za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)	Agilent Technologies 1260 Infinity ELSD
Naprava za plinsko kromatografijo (GC)	Agilent Technologies, 6890N, Network GC System
Liofilizator	SP Scientific, Model Advantage PRO, ZDA
Vakuumska centrifuga	HT-4 series II, Genevac Technologies LTD, model 5114, serijska številka 5557, Ipswich, Anglija
Evaporacijska naprava za segrevanje	VLM EC1, serijska številka 0412009, tip V.649.062.620
Centrifuga	Avanti JXN-26 Series, Beckman Coulter, Indianapolis
Čitalec mikrotiterskih ploščic	Thermo Scientific, Varioskan LUX, Finska
Stresalnik	Thermo Scientific, Compact Digital Mini Rotator, Koreja
Zamrzovalna skrinja	Sanyo Electric, MDF-U55V, Japonska
Naprava za določanje nitratov	Technicon Autoanalyser II

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali še naslednjo laboratorijsko opremo: gorilnik, cepilne zanke, špatule (lopatica, drigalski), sterilne epruvete, sterilne mikrocentrifugirke, sterilne 50 ml centrifugirke, pinceta, skalpel, škarje, stojalo za epruvete, steklenice za pripravo gojišč, sterilne steklene čaše, steklene bučke, sterilne merilne valje, brizge, 0,22 µl filtre za brizge, papirnate brisače, prozorne vrečke za zamrzovanje živil (4 litre) iz polietilena nizke gostote (LDPE; ang. low density polyethylene), parafilm, avtoklavirni trak, etanol (70 in 96 vol %), bidestilirana voda, zaščitna oprema (laboratorijska halja, zaščitne rokavice iz lateksa, zaščitna očala), viala za HPLC analizo.

3.1.4 Vzorci zelene solate (*Lactuca sativa* L.)

Uporabljali smo zeleno solato kristalko (*Lactuca sativa* L.) iz štirih različnih trgovin (A, B, C, D) ter solato iz Oddeleka za agronomijo (BF). Solata je bila pridelana na konvencionalni ali integriran način (Preglednica 8).

Preglednica 8: Oznake vzorcev zelene solate (*Lactuca sativa* L.) in opravljene preiskave ter analize

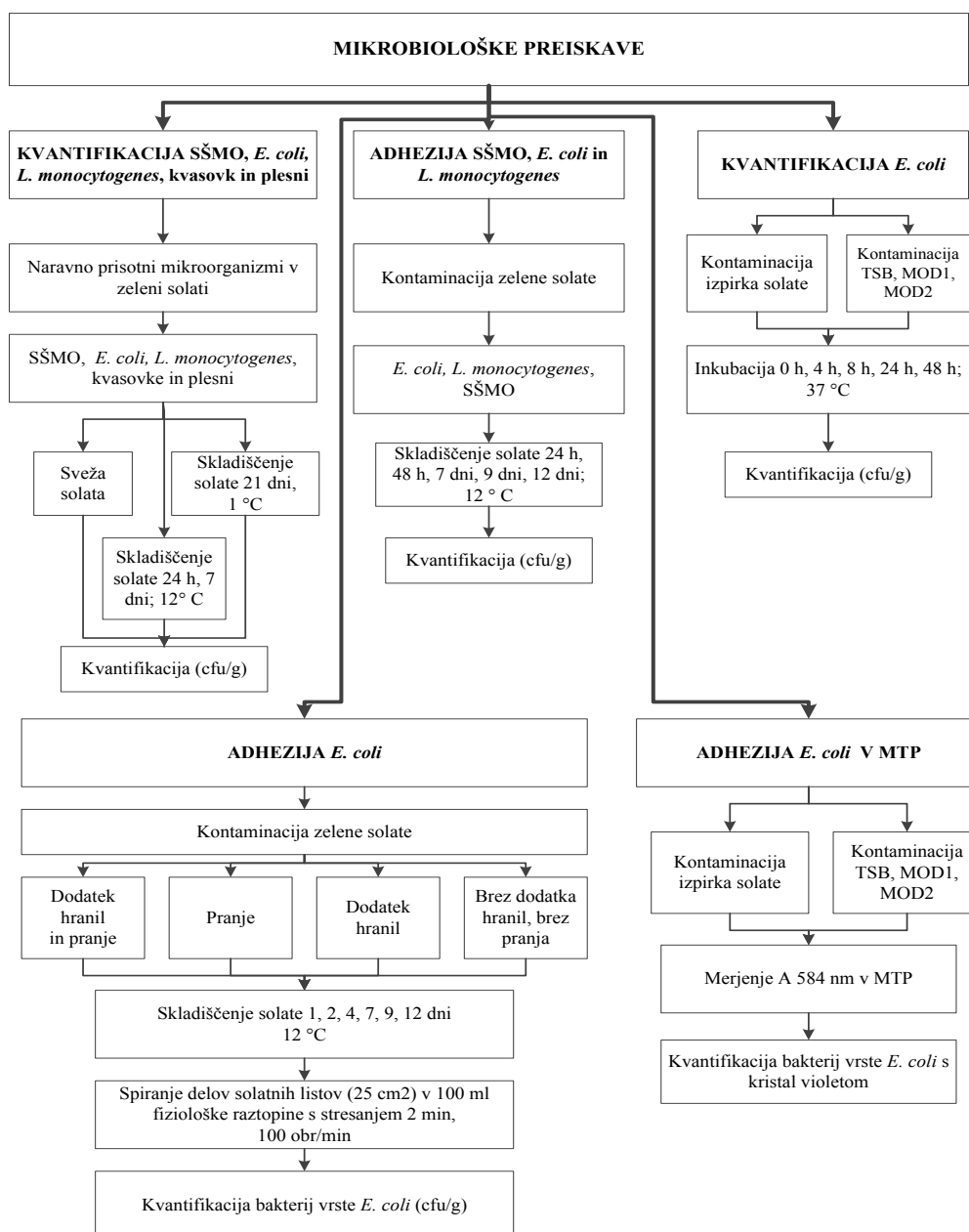
Oznaka solate	Proizvajalec oz. trgovina	Število vzorcev	Način pridelave	Preiskave in analize
TR1	Trgovina A	6	Konvencionalni	Določanje SŠMO, SŠPK v sveži solati in 21 dni skladiščeni solati pri 1,0 °C
TR2	Trgovina B	6	Konvencionalni	
TR3	Trgovina C	6	Konvencionalni	
TR4	Trgovina D	6	Konvencionalni	
KON1	Trgovina D	6	Konvencionalni	Določanje rasti in stopnje adhezije bakterij s klasičnimi gojitvenimi metodami - SŠMO in bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>
KON2	Trgovina D	6	Konvencionalni	Določanje rasti in stopnje adhezije bakterij s klasičnimi gojitvenimi metodami - SŠMO in bakterije vrste <i>E. coli</i>
KON3	Trgovina D	6	Konvencionalni	Določanje rasti in stopnje adhezije bakterij s klasičnimi gojitvenimi metodami - SŠMO in bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>
INT1	BF- Oddelek za agronomijo	8	Integriran	Določanje stopnje adhezije bakterij s klasičnimi gojitvenimi metodami - SŠMO in bakterije vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> , ter določanje sladkorjev v solati s HPLC
INT2	BF- Oddelek za agronomijo	8	Integriran	Določanje stopnje adhezije bakterij pri različnih pripravkih solate - oprani (namočeni) solati in solati z dodanimi sladkorji v sledovih. Uporaba klasičnih gojitvenih metod za bakterije vrste <i>E. coli</i>
INT3	BF- Oddelek za agronomijo	3	Integriran	Določanje enostavnih sladkorjev na površini solate z uporabo derivatizacije in GC in določanje rasti v izpirku solate
KON4	Trgovina C	3	Konvencionalni	Določanje enostavnih sladkorjev na površini solate z uporabo derivatizacije in GC, ter določitev nitratnega dušika in amonijevega dušika

Legenda: SŠMO: skupno število aerobnih mezofilnih bakterij; SŠPK: skupno število plesni in kvasovk; HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti; GC: plinska kromatografija

3.2 METODE

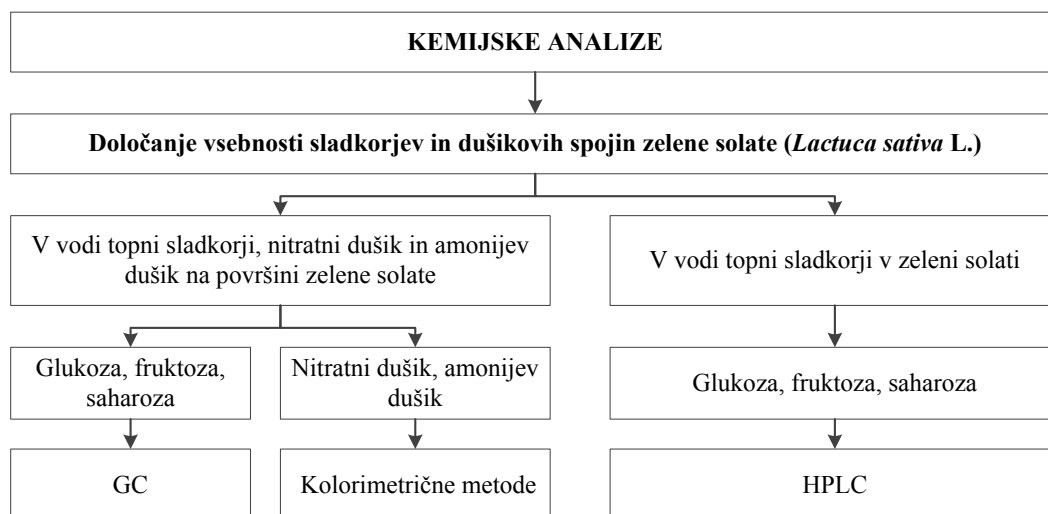
3.2.1 Shema dela

Zaradi boljše preglednosti smo shemo eksperimentalnega dela razdelili na mikrobiološki (Slika 4) in kemijski del (Slika 5).



Slika 4: Osnovna shema mikrobioloških preiskav zelene solate (*Lactuca sativa* L.) pri eksperimentalnem delu

Legenda: SŠMO: skupno število mikroorganizmov; TSB: gojišče triptični sojin bujon; MOD1: modelno gojišče 1 - ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze; MOD2: modelno gojišče 2 - ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 1g/l galaktoze, 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze; MTP: mikrotitrna ploščica



Slika 5: Osnovna shema kemijskih analiz zelene solate (*Lactuca sativa* L.) pri eksperimentalnem delu
Legenda: GC: plinska kromatografija; HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

3.2.2 Vzorčenje solate

Vzorčili smo zdrave glave solate, ki niso imele vizualno vidnih poškodb ali drugih vidnih okužb (plesni, gniloba). Za analize smo uporabljali svežo solato kristalko (*Lactuca sativa* L.). Solatne glave so bile približno enake velikosti. Za analizo smo uporabljali vizualno zdrave sredinske liste solatnih glav.

Zaradi ugotavljanja ponovljivosti rezultatov, smo vsak vzorec solate vzorčili v 3 paralelakah.

3.2.3 Priprava bakterijskih kultur

Bakterijski kulturi *L. monocytogenes* ŽM509 in *E. coli* ŽM513 smo vzeli iz krio-epruvet shranjenih pri -20 °C in ju revitalizirali v 4 ml gojišča TSB (triptični sojin bujon). Sledila je 24 h inkubacija pri 37 °C na stresalniku 100 obratov/minuto (obr/min).

Po inkubaciji smo epruvete premešali z namiznim mešalom ter vsebino s cepilno zanko prenesli na ustrezna gojišča. Revitalizirano kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes* smo prenesli na gojišči ALOA in TSA, revitalizirano kulturo bakterij vrste *E. coli* pa na gojišči TBX in TSA. Sledila je 24 h inkubacija pri 37 °C.

Po inkubaciji smo iz gojišča TSA (eno kolonijo bakterij vrste *E. coli*, eno kolonijo bakterij vrste *L. monocytogenes*) s cepilno zanko prenesli v 4 ml tekočega gojišča TSB. Sledila je ponovna 24 h inkubacija pri 37 °C, s stresanjem na stresalniku z 100 obr./min. V prekonočni suspenziji smo dobili koncentracijo bakterij približno 10^8 cfu/ml, katero smo s fiziološko raztopino redčili do koncentracije 10^4 ali 10^6 cfu/ml.

3.2.4 Priprava solate za inokulacijo z bakterijami

Svežo zeleno solato kristalko (*Lactuca sativa* L.) smo prinesli iz lokalne trgovine ali pa odrezali svežo z njive (Oddelek za agronomijo, BF). Za samo inokulacijo smo izbrali sredinske solatne liste. Na sredini listov smo označili površino 5 cm × 5 cm (25 cm²) (Slika 6). Olmez in Temur (2010), sta za raziskavo adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* z nožem narezala 5 cm kose solate (približno 10 g/kos), katere sta naknadno kontaminirala. Mi smo označili dele listov (5 × 5 cm), saj tako na listih nismo povzročali dodatnih poškodb, ki bi lahko privedle do nepravilnih rezultatov mikrobiološki preiskav in kemijskih analiz.

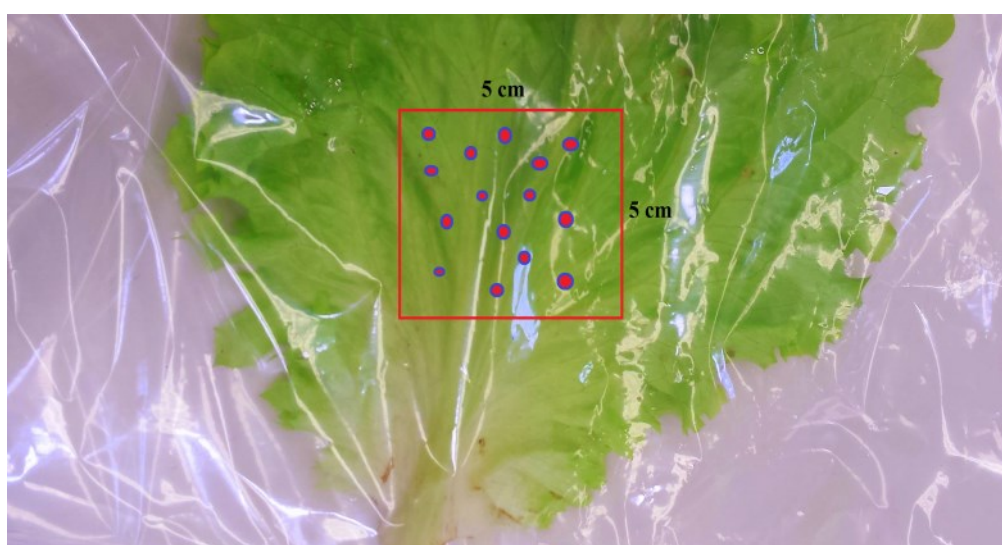
3.2.5 Pranje solatnih listov pred kontaminacijo

Pred kontaminacijo z bakterijami vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* smo solatne liste 10 minut namakali v 5 litrih vode. Liste smo namakali cele in sicer po 6 listov naenkrat.

3.2.6 Točkovna inokulacija bakterij na solatne liste

Po navajanjih Beuchat in sod. (2001) je točkovna inokulacija (ang. spot inoculation) bolj dosledna in daje bolj ponovljive rezultate pri inokulaciji znanega števila patogenih bakterij na površino solate, v primerjavi z namakanjem solate v inokulacijski medij (ang. dipping inoculation method). Sangong in sod. (2011) so intaktne notranje liste odstranili in razrezali na 10 × 10 cm, dodali so 0,1 ml pripravljene bakterijske kulture, katero so aplicirali na 15 označenih mest na listu. Nato so tako inokulirano solato sušili 2 uri in uporabili za nadaljnje analize. Podobno so se inokulacije bakterij na solatne liste lotili Back in sod. (2014) kjer so 0,1 ml pripravljene kulture z mikropipetorjem prenesli na 15 naključno izbranih lokacij. Sledilo je sušenje 3 ure s tokom zraka pri 22 ± 2 °C. Tudi Rodriguez-Caturla in sod. (2012) so solatne liste inokulirali s 100 µl inokuluma bakterij, ki so ga naključno porazporedili po solatnem listu.

V našem poskusu smo na označen del lista (5 cm × 5 cm) skupno nanesti 100 µl bakterijske kulture s koncentracijo 10^4 ali 10^6 cfu/ml. Suspenzijo smo nanesti na 15 naključno izbranih mest znotraj označenega dela na solatnem listu. Nanašali smo po 6,6 µl na vsako naključno izbrano mesto (Slika 6). Za inokulacijo bakterij smo izbrali notranje in sredinske nepoškodovane solatne liste. Inokulirane liste smo nato dali v sterilne plastične (LDPE) vrečke prostornine 4 litre in jih zaprli s sponkami. Predvidevali smo, da je v vrečkah dovolj kisika, za ohranitev aerobnih razmer tekom skladiščenja. Relativne vlage nismo določali. Sledila je različno dolga inkubacija pri različnih temperaturah. Po inkubaciji smo vzorce analizirali.



Slika 6: Točkovna inokulacija dela sredinskega solatnega lista z bakterijami vrste *L. monocytogenes* ali *E. coli*

3.2.7 Spiranje solatnih listov po inkubaciji

Po končani inkubaciji smo iz plastičnih vrečk vzeli solatne liste. Delo je potekalo v aseptičnih razmerah ob gorilniku v brezprašni mikrobiološki komori. Z razkuženimi škarjami smo odrezali označene kontaminirane dele solatnih listov, katere smo prenesli v 200 ml sterilne lončke, v katere smo dodali 100 ml sterilne fiziološke raztopine in jih pokrili s pokrovom. Sledilo je 2-minutno mešanje lončkov na stresalniku pri hitrosti 100 obr./min. Supernatant je vseboval nevezane bakterije, adherirane bakterije pa so ostale pritrjene na solatnem listu.

3.2.8 Priprava matične raztopine

Matično raztopino smo pripravili tako, da smo aseptično prenesli posamezen del lista namenjenega za analizo (5 cm × 5 cm) v sterilne vrečke s filtrom. Masa analiziranih delov listov je bila $2,8 \pm 0,4$ g, odvisno od nagubanosti, oblike in morfologije lista. Glede na maso analiziranih delov listov smo dodali 9-kratno količino (maso) sterilne fiziološke raztopine. Sledila je 2-minutna homogenizacija v gnetilniku pri srednji hitrosti (ISO 6887-1, 1999). Homogenizacija je omogočila ločitev adheriranih bakterij s površine solatnih listov v fiziološko raztopino.

3.2.9 Kvantifikacija mikroorganizmov na solati

Kvantifikacijo mikroorganizmov smo izvedli z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču in enačbo (1) (ISO 4833, 2002).

$$N = \frac{\sum C}{n_1 + 0,1 \times n_2 \times d} \left[\frac{CFU}{g} \right] \quad \dots (1)$$

N ... povprečna koncentracija celic

$\sum c$... vsota kolonij na vseh števnihih ploščah

n_1 ... število plošč prve upoštevane razredčitve

n_2 ... število plošč druge upoštevane razredčitve

d ... razredčitveni faktor prve upoštevane razredčitve

3.2.9.1 Določitev skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO)

Skupno število aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO) smo določali z metodo štetja bakterijskih kolonij (ISO 4833, 2002). Vzorce pridobljene v postopku 3.2.8 smo ustrezno razredčili po Kochu, tako da smo eni enoti (mase) vzorca, dodali 9 enot (mase) sterilne fiziološke raztopine. Posamezne redčitve smo nanesti na za bakterije neselektivno trdno gojišče PCA v 3 ponovitvah. Na trdno gojišče PCA smo nanesti 100 µl vzorca. Vzorec smo razmazali z drigalsko spatulo. Sledila je 24-urna inkubacija pri 30 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije na števnihih ploščah (plošče s 15–300 kolonij) in izračunali koncentracijo skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij z enačbo (1).

3.2.9.2 Določitev skupnega števila plesni in kvasovk (SŠPK)

Skupno število plesni in kvasovk (SŠPK) smo določali z metodo štetja kolonij (ISO 7954, 1987) na trdnih gojiščih DRBC po 3–5 dnevnih inkubaciji pri 25 °C. Vzorce pridobljene v postopku 3.2.8 smo ustrezno razredčili po Kochu, tako da smo eni enoti (mase) vzorca, dodali 9 enot (mase) sterilne fiziološke raztopine. Posamezne redčitve smo nanесли na trdno gojišče DRBC v 3 ponovitvah. Na trdno gojišče DRBC smo nanесли 100 µl vzorca. Vzorec smo razmazali z drigalsko spatulo. Sledila je 3–5 dnevna inkubacija pri 25 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije na števnihi ploščah (plošče s 15–150 kolonij) izračunali koncentracijo skupnega števila plesni in kvasovk z enačbo (1).

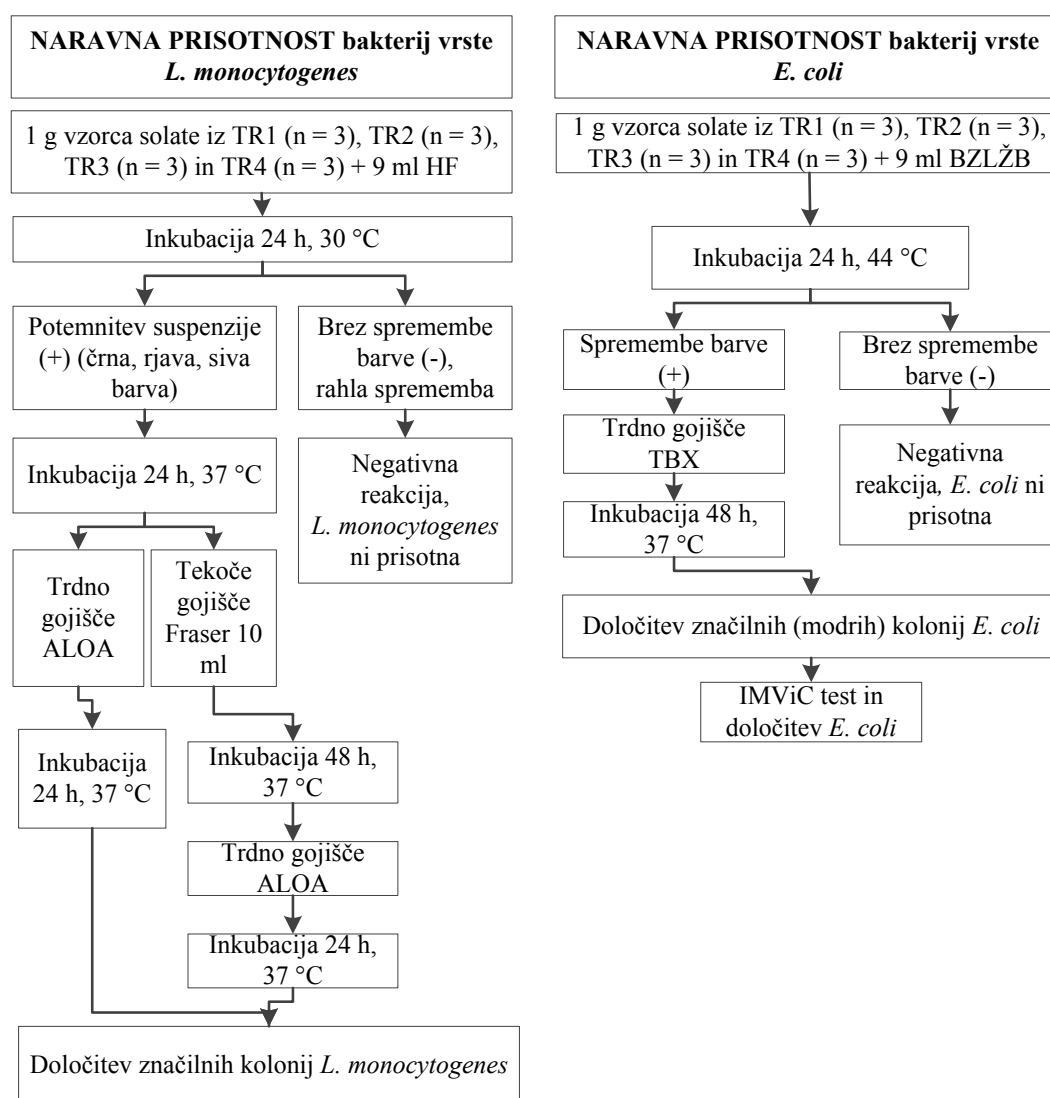
3.2.10 Ugotavljanje bakterij vrste *L. monocytogenes* in *E. coli* na solati

Zanimalo nas je, ali so v vzorcihi solate (1 g) iz 4 različnih trgovin (TRGOVINA A (TR1), TRGOVINA B (TR2), TRGOVINA C (TR3) in TRGOVINA D (TR4)) naravno prisotne bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*.

Naravno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* smo ugotavljali tako, da smo 1 g reprezentativnega vzorca lista solate TR1 (n = 3), TR2 (n = 3), TR3 (n = 3), TR4 (n = 3) prenesli v 12 sterilnih steklenih epruvet (Slika 7). Dodali smo 9 ml tekočega gojišča Half fraser (HF) (ISO 11290-1,1996). Sledila je 24-urna inkubacija pri 30 °C in nato pregled epruvet. Svetel vzorec, brez očitno vidne spremembe barve smo označili kot negativen in preiskavo zaključili z rezultatom, da bakterij vrste *L. monocytogenes* v vzorcu solate (1 g) ni. Kakršna koli potemnitev vzorca (pojav črne, rjave ali sive barve) je zahtevala nadaljnjo analizo, saj sprememba barve gojišča HF kaže na možno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*. Ponovno smo 24 ur inkubirali epruvete pri 30 °C, po inkubaciji pa smo z ezo naredili razmaz suspenzije po trdnem gojišču ALOA, hkrati pa smo 100 µl suspenzije prenesli v 9 ml gojišča Fraser. Trdno gojišče ALOA smo 24 h inkubirali pri 37 °C, po tem pa smo določali značilne kolonije bakterij vrste *L. monocytogenes*. Tekoče gojišče Fraser smo 48 ur inkubirali pri 37 °C, potem smo naredili izolacijo na trdnem gojišču ALOA, sledila je ponovna 24 urna inkubacija pri 37 °C (Slika 7). Tudi tu smo določali značilne kolonije bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki so na gojišču ALOA modre barve s prosojno cono.

Potencialne naravno prisotne bakterije vrste *E. coli* smo določali tako, da smo v sterilno stekleno epruveto zatehtali po 1 g vzorca solate iz trgovin TR1 (n = 3), TR2 (n = 3), TR3 (n = 3), TR4 (n = 3). Vzorcui smo dodali 9 ml tekočega gojišča BZLŽB. Sledila je 24-urna inkubacija epruvet pri 44 °C. Po inkubaciji v epruvetah, kjer ni bilo spremembe barve smo zaključili, da bakterije vrste *E. coli* niso prisotne. Sprememba

barve gojišča BZLŽB je pomenila pozitivno reakcijo in potencialno možno prisotnost bakterij vrste *E. coli*. V tem primeru smo naredili izolacijo z ezo na trdno gojišče TBX in gojišče 48 ur inkubirali pri 37 °C (Slika 7). Po inkubaciji smo kolonije pregledali in za nadaljnje analize izbrali značilne modre kolonije. V primeru pojava le-teh smo nato izvedli še test IMViC, kjer je za bakterije vrste *E. coli* značilno, da je tvorba indola pozitivna, test na metil rdeče pozitiven, test na Voges Proskauer negativen in izkoriščanje citrata mora biti negativen.



Slika 7: Shema ugotavljanja bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* v vzorcih zelene solate (*Lactuca sativa* L.) iz različnih trgovin

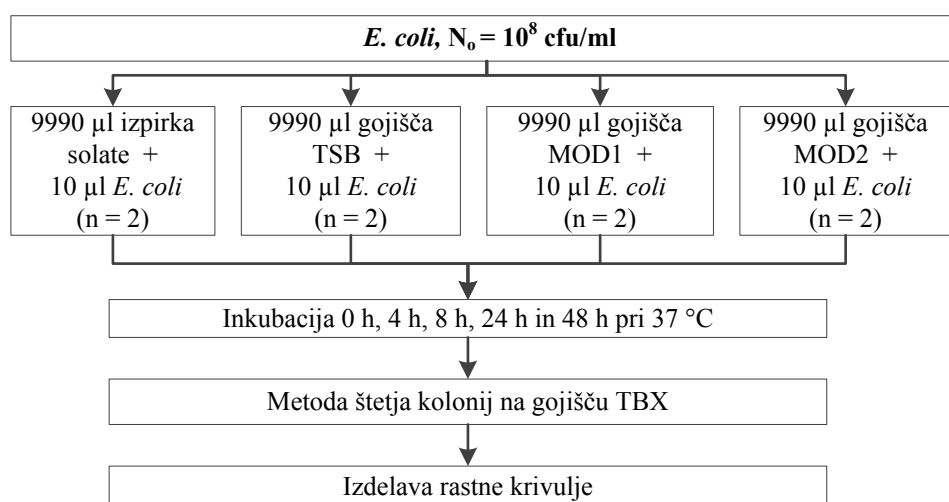
Legenda: n: število vzorcev; TR1: solata kristalka trgovina A, konvencionalna pridelava; TR2: solata kristalka, trgovina B, konvencionalna pridelava; TR3: solata kristalka, trgovina C, konvencionalna pridelava; TR4: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava; HF: gojišče Half Fraser; ALOA: gojišče ALOA agar; BZBLZ: gojišče briljantno zeleni žolčni bujon; TBX: gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X; Fraser: gojišče fraser

3.2.11 Določanje rasti bakterij vrste *E. coli* v različnih tekočih gojiščih

Rast bakterij vrste *E. coli* smo določali v 4 gojiščih:

- Gojišče izpirek solate: V 100 ml bidestilirane vode (ddH₂O) smo namočili za 1 minuto nepoškodovan solatni list s površino približno 200 cm². Izpirek smo nato prefiltrirali preko filter papirja z velikostjo por 0,22 µm.
- Modelno gojišče 1: sterilizirana ddH₂O s peptonom (1 g/l), NaCl (0,5 g/l), ter dodatkom glukoze (5 mg/l) in fruktoze (5 mg/l)
- Modelno gojišče 2: sterilizirana ddH₂O s peptonom (1 g/l), NaCl (0,5 g/l), ter dodatkom glukoze (5 mg/l) in fruktoze (5 mg/l) in galaktoze (1 g/l)
- Gojišče TSB: Triptični sojin bujon

Inokulum bakterij vrste *E. coli* smo pripravili kot je opisano pod točko 3.2.3. Začetna koncentracija bakterij (N_0) je bila približno 10⁸ cfu/ml. V 9990 µl gojišča (izpirek solate, TSB, MOD1, MOD2) smo prenesli po 10 µl namnožene bakterijske kulture. Vsako suspenzijo bakterij in gojišča smo naredili v dveh paralelkah. Začetna koncentracija bakterij v suspenziji preiskovanega gojišča je znašala približno 10⁵ cfu/ml. Sledila je 48 h inkubacija na stresalniku (100 obr./min) pri 37 °C. Po 0, 4, 8, 24 in 48 urah smo vzorčili tako, da smo iz vsake epruvete aseptično odvzeli po 100 µl vzorca in z metodo štetja kolonij na gojišču TBX določili bakterije vrste *E. coli*. Sledila je izdelava rasnih krivulj v gojiščih TSB, MOD1, MOD2 in izpirku solate (Slika 8).



Slika 8: Shema ugotavljanja rasti bakterij vrste *E. coli* v izpirku solate in gojiščih TSB, MOD1, MOD2

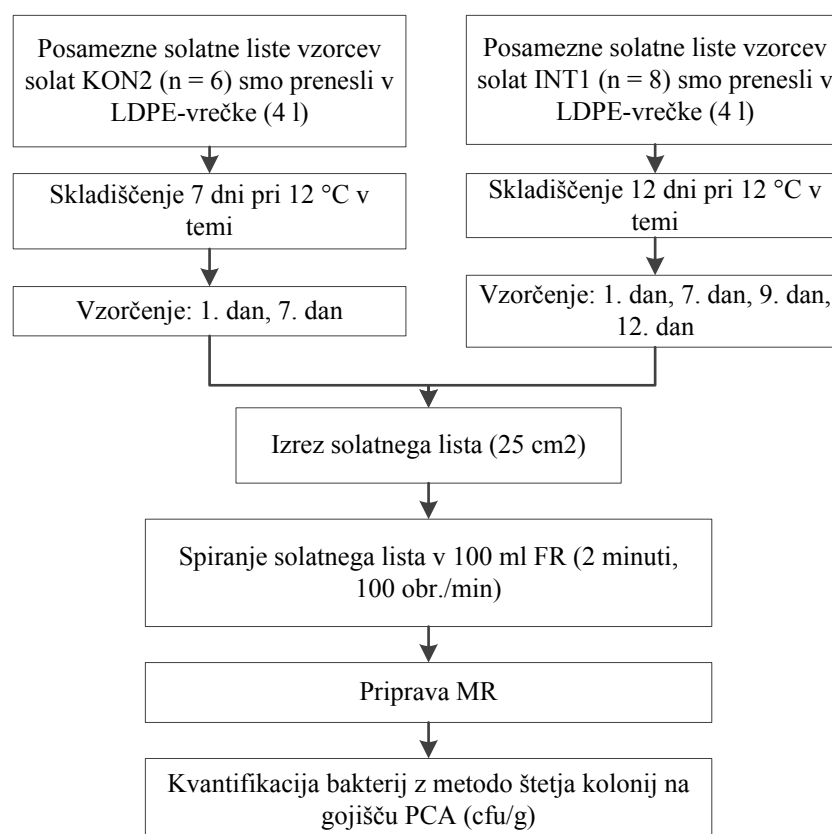
Legenda: n: število vzorcev; N_0 : začetna koncentracija bakterij; TSB: gojišče triptični sojin bujon; izpirek solate: sterilen izpirek površine solatnega lista 200 cm² z 100 ml ddH₂O; MOD1: modelno gojišče 1 - ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze; MOD2: Modelno gojišče 2 - ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 1g/l galaktoze, 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze; TBX: gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X

3.2.12 Določitev bakterijske adhezije

3.2.12.1 Adhezija naravno prisotnih aerobnih mezofilnih bakterij na solati

Adhezijo naravno prisotnih aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO) smo določali tako, da smo po spiranju skladiščenih solatnih listov kvantificirali število adheriranih bakterij z metodo štetja kolonij na gojišču PCA (Slika 9).

Pri vzorcih solat KON2 ($n = 6$) in INT1 ($n = 8$) (Preglednica 8) smo izbrali sredinske zdrave liste. Posamezen list smo prenesli v plastično vrečko in jo zaprli s sponkami. Sledilo je skladiščenje solate v različnih razmerah (različna temperatura in čas). Solatne liste vzorcev solat KON2 smo analizirali po 1-dnevnem in 7-dnevnem skladiščenju pri 12 °C v temi, solatne liste vzorcev solat INT1 pa smo analizirali po 1 dnevu, 7 dneh, 9 dneh, 12 dneh skladiščenja v temi pri 12 °C. Pred analizo smo ob gorilniku iz vrečke vzeli ustrezen list in na sredini izrezali približno 25 cm² del lista, katerega smo prenesli v 200 ml sterilni lonček, v katerega smo dodali 100 ml sterilne fiziološke raztopine. Lonček smo pokrili s pokrovom in stresali 2 minuti pri 100 obr/min. (3.2.7). Ta postopek imenujemo spiranje, kjer smo iz listov odstranili nevezane oz. zelo slabo pritrjene bakterije. Po stresanju smo pripravili matično raztopino (3.2.8), katero smo homogenizirali v gnetilniku (2 minuti pri srednji hitrosti; ISO 6887-1, 1999). Adherirane bakterije so v večini iz solatne površine prešle v fiziološko raztopino. Sledila je kvantifikacija bakterij z metodo štetja kolonij na gojišču PCA. Gojišča PCA smo 24 ur inkubirali pri 37 °C (Slika 9). Po inkubaciji smo prešteli vse kolonije na vseh ploščah, in izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone, ter statistično primerjali rezultate s testom ANOVA.



Slika 9: Shema določitve števila adheriranih naravno prisotnih aerobnih mezofilnih bakterij na solati (*Lactuca sativa* L.)

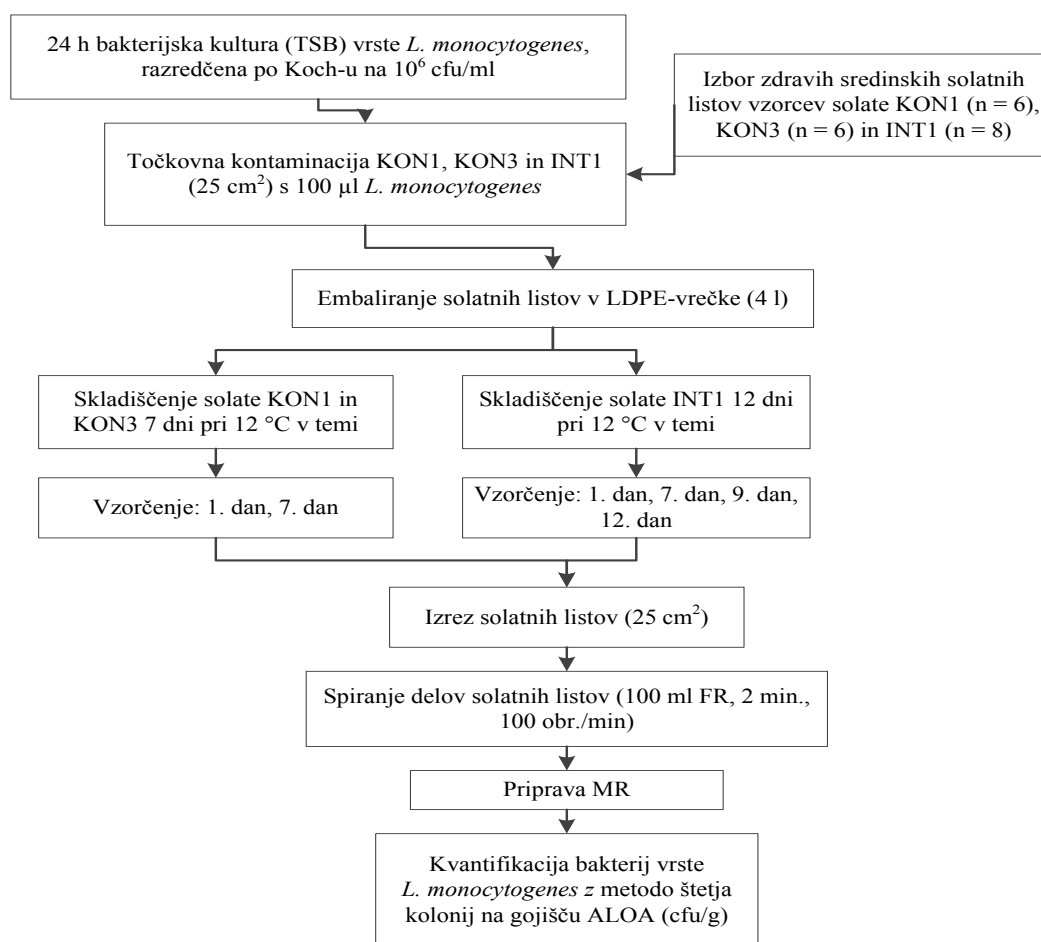
Legenda: n: število vzorcev; FR: fiziološka raztopina; MR: matična raztopina; PCA: gojišče Plate Count Agar; KON2: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava; INT1: solata kristalka, BF - Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; LDPE: polietilen nizke gostote

3.2.12.2 Adhezija bakterij vrste *L. monocytogenes* na solati

Adhezijo umetno dodanih bakterij vrste *L. monocytogenes* smo določili tako, da smo po spiranju skladiščenih solatnih listov kvantificirali število bakterij vrste *L. monocytogenes* z metodo štetja kolonij na gojišču ALOA (Slika 10).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo revitalizirali in jih namnožili v gojišču TSB do koncentracije približno 10^8 cfu/ml. Pred kontaminacijo solatnih listov smo razredčili koncentracijo bakterij na 10^6 cfu/ml. Za kontaminacijo solatnih listov smo izbrali zdrave notranje in sredinske solatne liste vzorcev solate KON1 (n = 6), KON3 (n = 6) in INT1 (n = 8) (Preglednica 9). Na sredini solatnih listov smo označili 5×5 cm (25 cm^2) dele na katere smo s pipeto na 15 naključno izbranih mest nanесли skupno 100 μl inokuluma bakterij (6,6 μl na vsako mesto). Posamezne liste smo prenesli v 4 l plastične vrečke in jih zaprli s sponkami. Sledilo je skladiščenje solate v različnih razmerah (različna temperatura in čas). Liste vzorcev solat KON1 in KON3 smo analizirali po 1-dnevnem in 7-dnevnem skladiščenju pri 12 °C, solatne liste vzorcev

solat INT1 pa smo analizirali po 1 dnevu, 2 dneh, 7 dneh, 9 dneh, 12 dneh skladiščenja v temi pri 12 °C. S sterilnimi škarjami smo izrezali kontaminirane dele listov, katere smo prenesli v 200 ml sterilni lonček, v katerega smo dodali 100 ml sterilne fiziološke raztopine. Lonček smo pokrili s pokrovom in stresali 2 minuti pri 100 obr./min. (3.2.7). Ta postopek imenujemo spiranje, kjer smo iz listov odstranili nevezane oz. zelo slabo pritrjene bakterije. Po stresanju smo pripravili matično raztopino (3.2.8), katero smo homogenizirali v gnetilniku (2 minuti pri srednji hitrosti; ISO 6887-1, 1999). Adherirane bakterije se v večini iz solatne površine prešle v fiziološko raztopino. Sledila je kvantifikacija bakterij z metodo štetja kolonij na gojišču ALOA. Gojišča ALOA smo inkubirali 24 ur pri 37 °C (Slika 10). Po inkubaciji smo prešteli vse kolonije na vseh ploščah in izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone ter statistično primerjali rezultate s testom ANOVA.



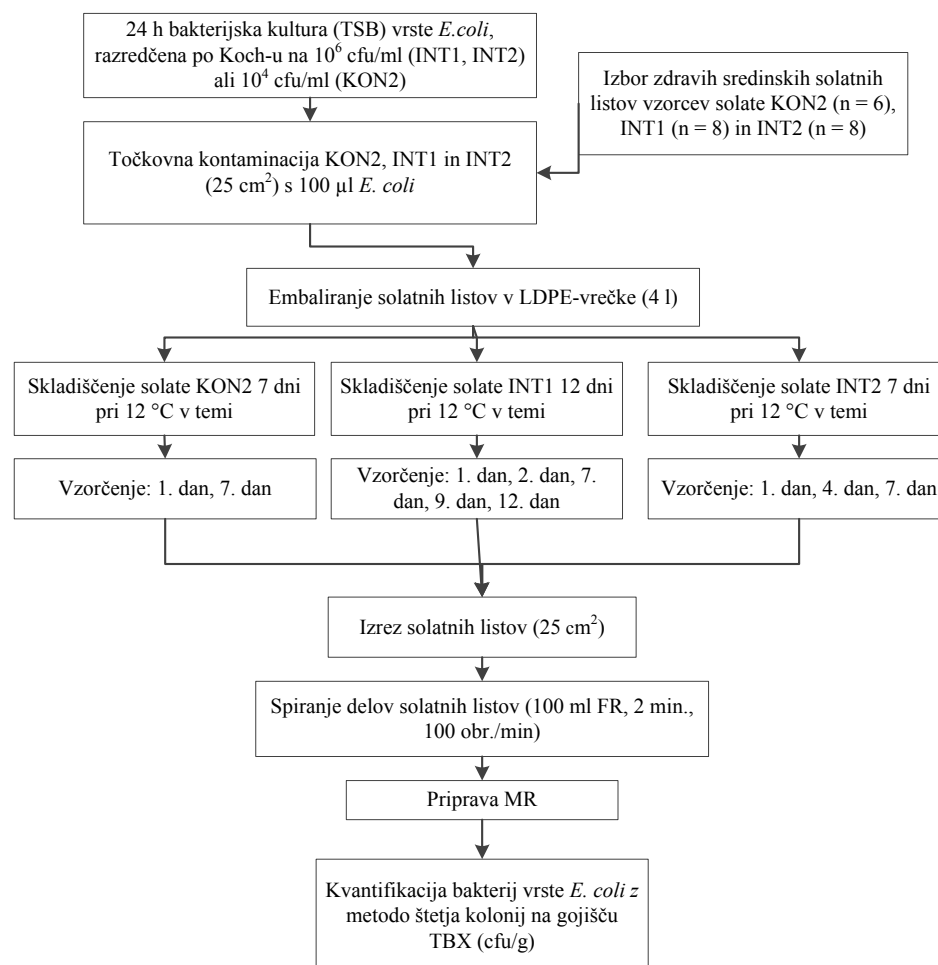
Slika 10: Shema določitve števila adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* na solati (*Lactuca sativa* L.)

Legenda: n: število vzorcev; FR: fiziološka raztopina; MR: matična raztopina; INT1: solata kristalka, BF - Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; INT2: solata kristalka, BF - Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; ALOA: gojišče ALOA agar; KON1: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava; KON3: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava; LDPE: Low density polyethylene (polietilen nizke gostote)

3.2.12.3 Adhezija bakterij vrste *E. coli* na solati

Adhezijo umetno dodanih bakterij vrste *E. coli* smo določili tako, da smo po spiranju skladiščenih solatnih listov kvantificirali število bakterij vrste *E. coli* z metodo štetja kolonij na gojišču TBX (Slika 11).

Bakterijsko kulturo vrste *E. coli* smo revitalizirali in jo v 24 urah namnožili v gojišču TSB do koncentracije približno 10^8 cfu/ml. Pred kontaminacijo solatnih listov smo jo razredčili na 10^6 cfu/ml (INT1, INT2) ali 10^4 cfu/ml (KON2). Za kontaminacijo smo izbrali zdrave sredinske solatne liste vzorcev solate KON2 ($n = 6$), INT1 ($n = 8$) in INT2 ($n = 8$) (Preglednica 9). Na sredini solatnih listov smo označili 5×5 cm (25 cm^2) dele na katere smo s pipeto na 15 naključno izbranih mest nanесли skupno 100 μl inokuluma bakterij (6,6 μl na vsako mesto). Posamezne liste smo prenesli v plastične vrečke in jih zaprli s sponkami. Sledilo je skladiščenje solate v različnih razmerah (različna temperatura in čas). Liste vzorcev solat KON2 smo analizirali po 1-dnevnem in 7-dnevnem skladiščenju pri 12 °C, medtem ko smo liste vzorcev solat INT1 analizirali po 1 dnevu, 2 dneh, 7 dneh, 9 dneh, 12 dneh skladiščenja pri 12 °C, liste vzorcev solat INT2 pa po 1 dnevu, 4 dneh, 7 dneh skladiščenja pri 12 °C. Solatne liste smo skladiščili v temi. S sterilnimi škarjami smo izrezali kontaminirane dele listov, katere smo prenesli v 200 ml sterilni lonček, v katerega smo dodali 100 ml sterilne fiziološke raztopine. Lonček smo pokrili s pokrovom in stresali 2 minuti pri 100 obr./min. (3.2.7). Ta postopek imenujemo spiranje, kjer smo iz listov odstranili nevezane oz. zelo slabo pritrjene bakterije. Po stresanju smo pripravili matično raztopino (3.2.8), katero smo homogenizirali v gnetilniku (2 minuti pri srednji hitrosti; ISO 6887-1, 1999). Adherirane bakterije so v večini iz solatne površine prešle v fiziološko raztopino. Sledila je kvantifikacija bakterij z metodo štetja kolonij na gojišču TBX. Gojišča TBX smo inkubirali 24 ur pri 37 °C (Slika 11). Po inkubaciji smo prešteli vse kolonije na vseh ploščah in izračunali povprečne vrednosti in standardne odklone ter statistično primerjali rezultate s testom ANOVA.



Slika 11: Shema določitve števila adheriranih bakterij vrste *E. coli* na solati (*Lactuca sativa* L.)

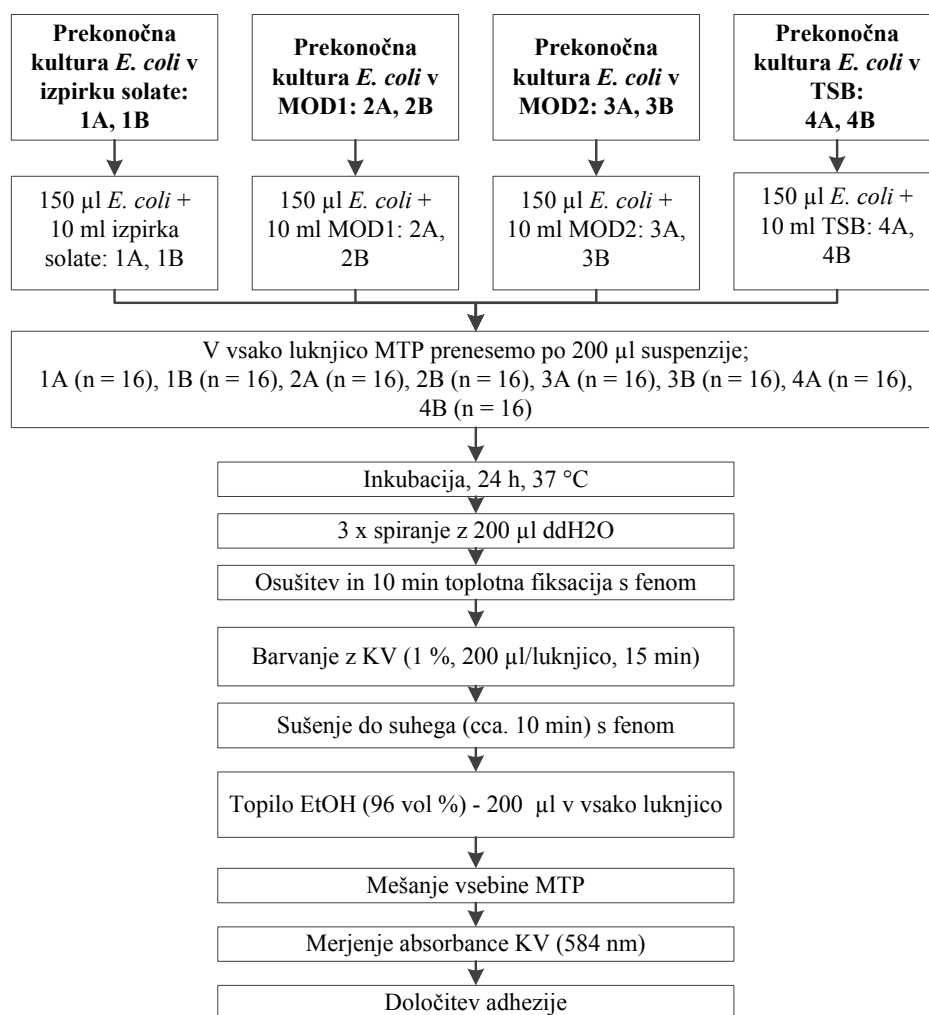
Legenda: n: število vzorcev; FR: fiziološka raztopina; MR: matična raztopina; INT1: solata kristalka, BF - Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; INT2: solata kristalka, BF- Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; KON2: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava; TBX: gojišče tripton žolčni agar z glukuronidom X

3.2.12.4 Adhezije bakterij vrste *E. coli* v mikrotitrski ploščici

Adhezijo bakterij vrste *E. coli* smo določili tudi v mikrotitrski ploščici (MTP). Uporabili smo metodo merjenja absorbcije barvila kristal violet (KV). Najprej smo pripravili inokulum bakterij, katerega je predstavljala prekonočna kultura bakterij vrste *E. coli* v ustreznih gojiščih TSB (4A, 4B), MOD1 (2A, 2B), MOD2 (3A, 3B) in izpirku solate (1A, 1B). Prekonočne kulture smo pripravili v dveh paralelkah (A in B). Tako pripravljeno prekonočno kulturo smo razredčili v ustreznih gojiščih (Slika 11) – TSB, MOD1, MOD2 in izpirku solate. Razredčeno kulturo (150 μl) smo dodali v 10 ml ustreznega gojišča. V vsako luknjico MTP smo prenesli po 200 μl ustrezne

suspenzije (Slika 12). Kot kontrolne vzorce smo uporabili sterilna gojišča, ki smo jih prenesli v MTP in sicer v vsako luknjico po 200 μ l (Slika 13). MTP smo nato pokrili s pokrovom in jo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo z ddH₂O in z izpiralcem MTP sprali nepritrjene bakterijske celice tako, da smo vsako luknjico 3-krat sprali z 200 μ l ddH₂O. Nato smo pritrjene celice fiksirali s sušenjem s fenom (10 min, maks. moč) in barvali s 1 % raztopino barvila kristal violet (KV). V vsako luknjico smo dodali 200 μ l KV. Barvilo smo po 15 min nežno sprali pod tekočo vodo. Obarvane, na polistiren pritrjene celice smo ponovno fiksirali tako, da smo MTP 10 min sušili s fenom pri maksimalni hitrosti. Sledil je dodatek topila (200 μ l) - etanol (96 vol %) (EtOH), katerega se uporablja za sprostitvev na bakterij vrste *E. coli* in EPS vezanega barvila KV. MTP smo premešali in izmerili absorbanco v čitalcu MTP pri 584 nm. Od izmerjenih vrednosti absorbanco vzorcev (A_{584nm}) smo odšteli absorbanco kontrolnih vzorcev ($A_{kontrola}$) katere so predstavljali ustrezni sterilni mediji. Nadalje smo s testom ANOVA izračunali povprečne vrednosti, odstopanja in statistično značilnost rezultatov.

Ugotavljali smo statistično značilne razlike med različnimi paralelkami enakih suspenzij ter statistično značilne razlike med suspenzijami bakterij v različnih gojiščih.



Slika 12: Shema določanja stopnje adhezije bakterij vrste *E. coli* na polistiren

Legenda: n: število uporabljenih luknjic v MTP; TSB: gojišče triptični sojin bujon; MOD1: modelno gojišče 1; MOD2: modelno gojišče 2; MTP: mikrotiterska ploščica; ddH₂O: bidestilirana voda; KV: barvilo kristal violet; EtOH (96 vol %): 96 % raztopina etanola; 1A in 1B: oznaka za supenzijo 150 µl prekonočne kulture bakterij vrste *E. coli* in 10 ml izpirka solate; 2A in 2B: oznaka za supenzijo 150 µl prekonočne kulture bakterij vrste *E. coli* in 10 ml gojišča MOD1; 3A in 3B: oznaka za supenzijo 150 µl prekonočne kulture bakterij vrste *E. coli* in 10 ml gojišča MOD2; 4A in 4B: oznaka za supenzijo 150 µl prekonočne kulture bakterij vrste *E. coli* in 10 ml gojišča TSB

(A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1
B	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1
C	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1
D	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1
E	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1
F	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1
G	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1
H	1A	1A	1B	1B	Izpirek	Izpirek	2A	2A	2B	2B	MOD1	MOD1

(B)

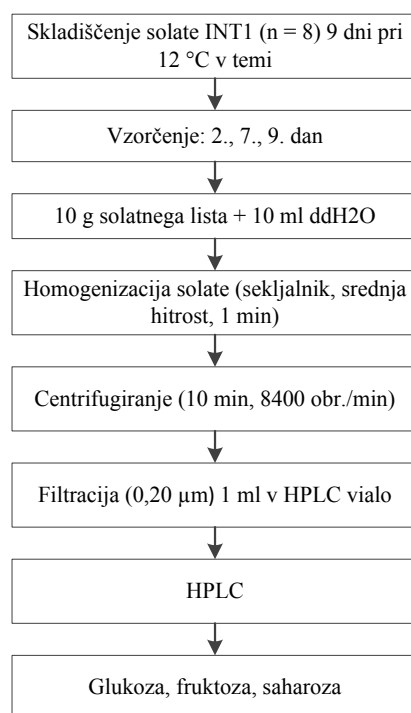
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB
B	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB
C	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB
D	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB
E	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB
F	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB
G	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB
H	3A	3A	3B	3B	MOD2	MOD2	4A	4A	4B	4B	TSB	TSB

Slika 13: Načrt izvedbe mikrotiterskih ploščic za določitev stopnje adhezije bakterij vrste *E. coli* z metodo barvanja z barvilom kristal violet; (A) gojišči izpirek solate in MOD1; (B): gojišči MOD2 in TSB

Legenda: 1A in 1B: oznaki paralelk (vsaka v 16 ponovitvah) za 200 µl suspenzije: 150 µl bakterij vrste *E. coli* in 10 ml izpirka solate; 2A in 2B: oznaki paralelk (vsaka v 16 ponovitvah) za 200 µl suspenzije: 150 µl bakterij vrste *E. coli* in 10 ml MOD1; 3A in 3B: oznaki paralelk (vsaka v 16 ponovitvah) za 200 µl suspenzije: 150 µl bakterij vrste *E. coli* in 10 ml MOD2; 4A in 4B: oznaki paralelk (vsaka v 16 ponovitvah) za 200 µl suspenzije: 150 µl bakterij vrste *E. coli* in 10 ml TSB; TSB: sterilna raztopina gojišča (kontrola); MOD1: sterilno raztopina gojišča MOD1 (kontrola); MOD2: sterilno raztopina gojišča MOD2 (kontrola); Izpirek: sterilni solatni izpirek (kontrola); v vsako luknjico MTP prenesemo po 200 µl ustreznega medija

3.2.13 Določitev vsebnosti v vodi topnih sladkorjev v solati

Zdrave, sredinske liste solate INT1 (Preglednica 9) smo posamezno embalirali v plastične vrečke s prostornino 4 litre. Vrečko smo zaprli s kovinskimi sponkami. Sledilo je 9-dnevno skladiščenje solate pri 12 °C v temi. Vzorčenje solatnih listov in določanje enostavnih sladkorjev smo izvedli 2., 7. in 9. dan (Slika 14). V 50 ml centrifugirko smo zatehtali 10 g reprezentativnega vzorca solatnega lista INT1, dodali smo 10 ml bidestilirane vode ter vse skupaj homogenizirali s sekljalnikom (Ultraturax, 12 000 obr./min). Sledilo je centrifugiranje (10 minut na 8400 obr./min). S pipeto smo iz vsake centrifugirke odvzeli 1000 µl supernatanta, katerega smo s pomočjo brizge prefiltrirali skozi 0,20 µm filter v HPLC-vialo. Vialo smo pokrili s pokrovčkom. Sledila je HPLC analiza.



Slika 14: Določitev vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze v solati (*Lactuca sativa* L.) s HPLC

Legenda: n: število vzorcev; INT1: solata kristalka (n = 8), BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; ddH₂O: bidestilirana voda; HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Za določitev glukoze fruktoze in saharoze v solati s HPLC-analizo smo uporabili nastavitve opisane v Preglednici 9.

Preglednica 9: Podatki o sistemu HPLC za analizo glukoze, fruktoze in saharoze

Tip aparata	Agilent 1100
Tip detektorja	Agilent Infinity 1260 ELSD
Tip kolone	• Prevail carbohydrate ES, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, • izokratsko izpiranje kolone, • sestava mobilne faze (A) H₂O, (B) mešanica acetonitril:aceton v razmerju 75:25 (v/v)
Temperatura kolone	30 °C
Pretok mobilne faze	1 ml/min.
Volumen injiciranja	10 µl

Z detektorjem (Agilent Infinity 1260 ELSD) smo zaznali in izmerili količino snovi, ki se je eluirala iz kolone. Detektirali smo razlike v fizikalnih lastnostih mobilne faze in v njej raztopljenih snovi. Določili smo retencijske čase glukoze, fruktoze in saharoze, njihove koncentracije pa smo izračunali glede na površino posameznega vrha z integracijo. Koncentracije sladkorjev smo določili glede predhodno pripravljene standardne koncentracije raztopin sladkorjev v ddH₂O (Preglednica 10) iz katerih smo glede na rezultate HPLC analize izdelali umeritveno krivuljo.

Preglednica 10: Standardne raztopine sladkorjev za izdelavo umeritvene krivulje za določanje sladkorjev v solati

Oznaka vzorca	Glukoza (g/l)	Fruktoza (g/l)	Saharoza (g/l)
S1	0,25	0,25	0,1
S2	3	3	0,2
S3	5	5	0,25
S4	7	7	0,4
S5	10	10	0,5

Legenda: S1-S5: standardne raztopine sladkorjev različnih koncentracij v ddH₂O

3.2.14 Določitev v vodi topnih sladkorjev na površini solate

Na površini solate so enostavni sladkorji prisotni v sledovih, zato smo uporabili postopek derivatizacije z reagentom heksametildisilazanom (HMDS), derivatizirane sladkorje pa smo določili s plinsko kromatografijo (GC).

Mobilno fazo pri GC predstavlja inertni nosilni plin (helij), stacionarno fazo pa nehlapna organska tekočina, ki je porazdeljena na inertnem nosilcu v koloni. Osnova ločbe je porazdelitev komponent med obe fazi. Pozamezne komponente potujejo skozi kolono z različno hitrostjo. Komponente zazna plemensko ionizacijski detektor, (FID, ang. Flame Ionization Detector) in omogoča zaznavo zelo majhnih količin preiskovanih snovi. GC smo izvedli z aparatom Agilent 6890N (Preglednica 11).

Preglednica 11: Podatki o sistemu GC za analizo glukoze, fruktoze in saharoze

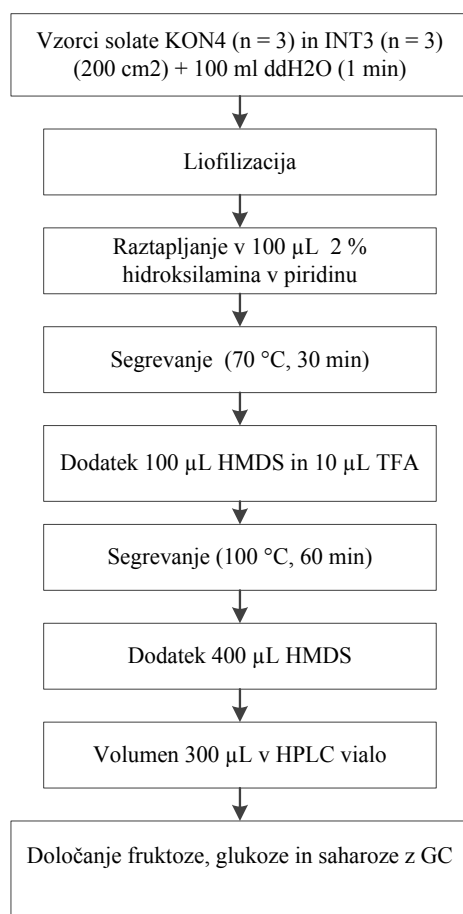
Tip aparata	Agilent 6890N
Tip injektorja	split/splitless
Razdelitveno razmerje injektorja	50:1
Temperatura injektorja	280 °C
Tip detektorja	FID
Temperatura detektorja	280 °C
Tip kolone	HP-5MS; 20 m x 180 µm x 0,18 µm
Nosilni plin	Helij, konstanten pretok, povprečna linearna hitrost nosilnega plina znaša 35 cm/s
Temperaturni gradient kolone	120 °C (3 min), 20 °C/min do 300 °C, 300 °C (6 min)

Solatne liste KON4 in INT3 smo posamično potopili v 100 ml ddH₂O in pri tem pazili, da v vodo nismo potopili začetnega odrezanega dela lista da smo preprečili, da bi v vodo iztekla kakršnakoli vsebnost sladkorjev iz notranjih tkiv lista. Solatni list smo namakali 1 minuto. Izpirek solatnega lista (100 ml) smo nato posušili z liofilizacijo, po sušenju pa je sledila derivatizacija. Najprej smo sušino raztopili v 100 µl 2 % hidroksilamina v piridinu. V evaporacijski napravi za segrevanje smo vzorce 30 minut segrevali v zaprtih epruvetah pri 70 °C. Vzorce smo nato ohladili in jim dodali 100 µl HMDS in 10 µl TFS (trifluoocetna kislina). Sledilo je 60 minutno segrevanje pri 100 °C ter ponovno ohlajanje in dodatek 400 µl HMDS (Slika 13). 300 µl smo s pipeto prenesli v HPLC-vialo in s GC določili fruktozo, glukozo in saharozo v sledovih na površini solatnega lista (Slika 15). Predhodno smo analizirali znane koncentracije sladkorjev v sledovih (Preglednica 12) s pomočjo katerih smo narisali umeritveno krivuljo.

Preglednica 12: Standardne raztopine sladkorjev za izdelavo umeritvene krivulje za določanje sladkorjev na površini solate

Oznaka vzorca	Glukoza (mg/l)	Fruktoza (mg/l)	Saharoza (mg/l)
S1	5	5	5
S2	10	10	10
S3	50	50	50
S4	100	100	100

Legenda: S1-S4: standardne raztopine sladkorjev različnih koncentracij v ddH₂O



Slika 15: Določitev vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze na površini solate (*Lactuca sativa* L.) z GC

Legenda: n: število vzorcev; INT3: solata kristalka, BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; KON4: solata kristalka, trgovina C, konvencionalni način pridelave; HMDS: heksametildisilazan; TFA trifluoroocetna kislina; ddH₂O: bidestilirana voda; GC: plinska kromatografija

3.2.15 Določitev nitratnega in amonijevega dušika na površini solate

Nitratni dušik in amonijev dušik smo določili v vodnem izpirku solatnega lista. Nepoškodovani solatni list, površine 198 cm² in mase 22,55 g smo izpirali z 100 ml ddH₂O. Za analizo nitratov smo uporabili 60 ml vodnega izpirka solate. Izpirek smo liofilizirali, nato raztopili v 6 ml ddH₂O za analizo vsebnosti nitratov. Tako pripravljen vzorec smo prenesli v 15 ml centrifugirko, ga zamrznili in poslali na analizo na Katedro za ekološko mikrobiologijo (Oddelek za živilstvo) Biotehniške fakultete v Ljubljani.

3.2.16 Vpliv dodatka sladkorjev na solato na rast bakterij vrste *E. coli*

Na površino solatnih listov smo aplicirali glukozo in fruktozo v koncentracijah, ki so podobne koncentracijam enostavnih sladkorjev, ki smo jih določili v vodnem izpirku solate.

Glukozo in fruktozo smo raztopili v fiziološki raztopini (5 mg/l). Tako pripravljeni raztopini smo sterilizirali (filter z velikostjo por 0,20 µm) in uporabili za določitev rasti bakterij vrste *E. coli* ŽM513 (3.2.11).

3.2.17 Statistična analiza

Vsi rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti (enačba 2) vseh (vsaj dveh) ponovitev meritev. Dopolnjeni so s standardnimi odkloni (enačba 3), kot informacijo o odstopanju posameznih vrednosti od povprečne vrednosti.

Enačba za izračun povprečne vrednosti (Košmelj, 2007):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (2)$$

$\bar{x}$... aritmetična sredina oz. povprečna vrednost vzorca

x_i ... posamezna meritev

n ... število meritev

Aritmetično sredino izračunamo tako, da seštejemo vrednosti spremenljivk vseh enot in vsoto delimo s številom enot. Aritmetična sredina predstavlja nekakšno težišče podatkov, saj je vsota odklonov posameznih vrednosti spremenljivke od povprečja navzgor enaka vsoti odklonov navzdol. Zato je vsota odklonov od aritmetične sredine vedno enaka nič (Adamič, 1989).

Enačba za izračun standardnega odklona (Košmelj, 2007):

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \dots (3)$$

SD ... standardni odklon

$\bar{x}$... povprečna vrednost

x_i ... posamezna meritev

n ... število meritev

3.2.17.1 Statistična značilnost rezultatov

Najprej smo tako kot navaja Adamič (1989) postavili osnovno domnevo oz. hipotezo H . Pri statistični analizi osnovni domnevi priredimo nasprotno domnevo oz. hipotezo H_0 - ničelno domnevo. Osnovna in ničelna domneva si nasprotujeta, zato ima zavrnitev ničelne domneve H_0 za posledico sprejetje osnovne domneve H in obratno. Ničelno domnevo preizkusimo z izračunom, kolikšna je verjetnost takšnega rezultata, kakršnega v posameznem primeru imamo, če bi bila ničelna domneva točna.

Izbrali smo vrednost 0,05 ($P = 0,05$); kot zgornjo mejo tveganja pri kateri zavrnemo ničelno hipotezo H_0 . Ničelno hipotezo H_0 smo preverili z ≥ 95 % stopnjo gotovosti (Adamič, 1989).

Izračune statističnih parametrov smo opravili z računalniškim programom MS EXCEL (Statsoft Inc., Tulsa, ZDA) in uporabili analizo variance (ANOVA).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

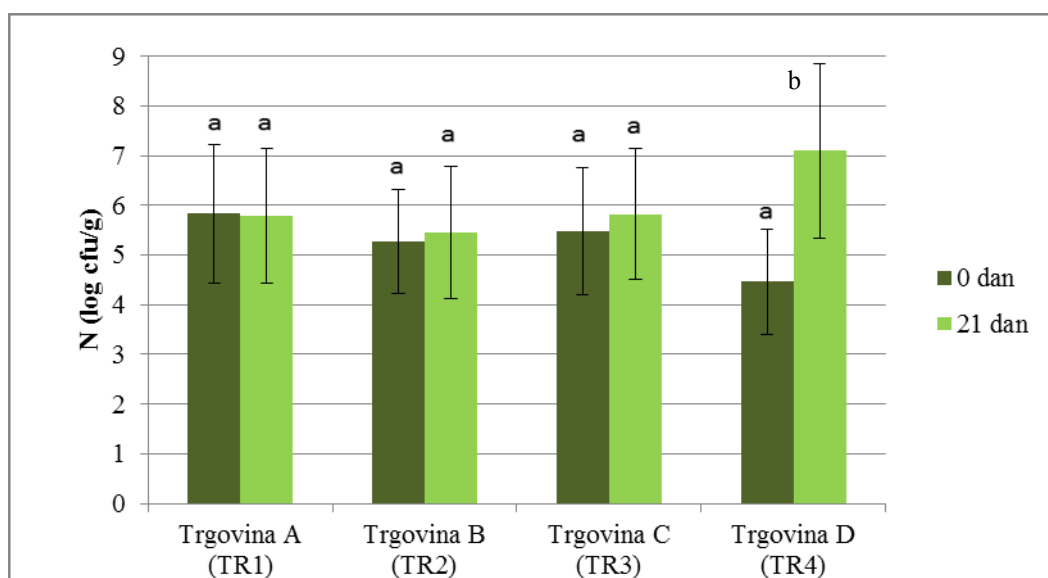
Najprej smo preverili samo mikrobiološko sliko zelene solate (*Lactuca sativa* L.) tako, da smo določili število aerobnih mezofilnih bakterij, število plesni in kvasovk ter ugotavljali naravno prisotnost bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*. Mikrobiološka slika nam je bila v pomoč pri nadaljnjem določanju adhezije aerobnih mezofilnih bakterij, bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*. Nato pa smo se lotili iskanja odgovora na vprašanje, katere snovi na solatni površini omogočajo rast in adhezijo bakterij.

4.1 MIKROBIOLOŠKA SLIKA ZELENE SOLATE (*Lactuca sativa* L.)

4.1.1 Število aerobnih mezofilnih bakterij

V štirih trgovinah (A, B, C, D) smo vzorčili zeleno solato (*Lactuca sativa* L.) in vzorce označili kot TR1, TR2, TR3 in TR4. V svežih vzorcih solate ($t = 0$) smo določali število aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO), nato smo paralelne vzorce skladiščili pri $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ v temnem prostoru in SŠMO določili še 21 dan. V prostoru je bila optimalna relativna vlaga več kot 85 %, zato tekom skladiščenja ni prišlo do večjih izgub vode solatnega tkiva. pH solate je v povprečju 6–7, kar ustreza ravnim zahtevam večine bakterij. Optimalna temperatura rasti aerobnih mezofilnih bakterij pa znaša $37\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$. So zelo pomembne v živilstvu. Mednje sodi večina bakterijskih povzročiteljev kvarjenja živil (Adamič in sod., 2003).

SŠMO v sveži in 21 dni stari solati iz trgovin A, B in C je bilo enako ($P > 0,05$), kar pomeni, da 21-dnevno skladiščenje ni vplivalo na povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij. Med SŠMO v vzorcih sveže solate ($t = 0$ dni) iz trgovin A, B, C in D ni bilo statistično značilnih razlik. Na solati iz trgovine D je bilo najmanj aerobnih mezofilnih bakterij in sicer $4,46 \pm 1,05 \log \text{ cfu/g}$, na solati iz trgovine A pa največ in sicer $5,83 \pm 1,40 \log \text{ cfu/g}$. Število aerobnih mezofilnih bakterij se je najbolj povečalo pri solatah iz trgovine D, ki je imela najmanjše začetno število bakterij. Pri solati iz trgovine D je bilo začetno število SŠMO ($t = 0$ dni) $4,41 \pm 0,26 \log \text{ cfu/g}$; po 21 dneh skladiščenja pa $6,65 \pm 1,06 \log \text{ cfu/g}$. Zdi se, da so se v danih razmerah skladiščenja bakterije na solati iz trgovine D najbolj razmnoževale (Slika 16).



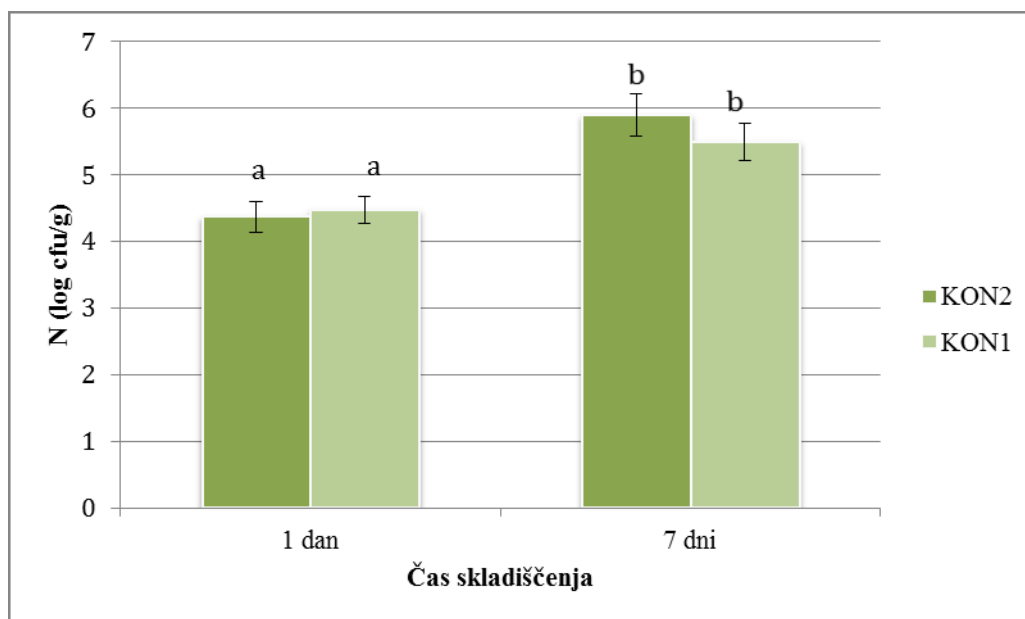
Slika 16: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih solate (*Lactuca sativa* L.) skladiščene 21 dni (1 °C)

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; TR1: solata kristalka trgovina A, konvencionalna pridelava, n = 6; TR2: solata kristalka, trgovina B, konvencionalna pridelava, n = 6; TR3: solata kristalka, trgovina C, konvencionalna pridelava, n = 6; TR4: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava, n = 6; a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Rastogi in sod. (2012) so pri preiskavi 106 vzorcev solate ugotovili, da je povprečna velikost naravno prisotne bakterijske populacije (SŠMO) med 10^5 – 10^6 cfu/g solatnega tkiva (solatni list). Rezultati naših preiskav solate so pokazali, da je povprečna velikost bakterijske populacije na solati nižja, saj se pri nas v solatah iz različnih trgovin (TR1, TR2, TR3 in TR4) začetna ($t = 0$) koncentracija SŠMO giblje med 10^4 cfu/g in 10^5 cfu/g solate.

Ker smo solato skladiščili pri 1 °C smo ustvarili dokaj neugodne razmere za razmnoževanje naravno prisotnih bakterij na solati. Aerobne mezofilne bakterije so se, razen pri vzorcih solate iz trgovine D (TR4), slabo razmnoževale. Njihovo število ostaja po 21 dnevnem skladiščenju enako pri vzorcih iz trgovin A, B, in C, pri vzorcih iz trgovine D se število poveča. Med samimi paralelkami ($n = 3$) je bilo zaznati slabšo ponovljivost, na kar kaže višji standardni odklon (SD) (Slika 16). Franz in sod. (2010) navajajo, da je znano, da se patogene bakterije in kvarljivci v splošnem ne razmnožujejo pri temperaturah pod 5 °C.

Da bi preverili vpliv povišane temperature na skupno število bakterij, smo pri vzorcih solate KON1, KON2 povečali skladiščno temperaturo na 12 °C. Vidimo (Slika 17), da je zvišanje skladiščne temperature iz 1 °C na 12 °C že v 7 dnevih povzročilo, da se je število bakterij na solatah povečalo ($P < 0,05$), in sicer pri vzorcih KON1 iz $4,48 \pm 0,20$ log cfu/g na $5,50 \pm 0,28$ log cfu/g in pri vzorcih KON2 iz $4,37 \pm 0,24$ log cfu/g na $5,90 \pm 0,33$ log cfu/g.



Slika 17: Povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih solate (*Lactuca sativa* L.) skladiščene 7 dni (12 °C)

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; KON1: solata kristalka trgovina D, konvencionalna pridelava (n = 6); KON2: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava (n = 6); a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Za aerobne mezofilne bakterije velja, da je optimalna temperatura rasti med 37 in 40 °C. Temperatura 1 °C predstavlja skladiščno temperaturo, kjer je rast večine bakterij inhibirana ali pa je zelo počasna, zato po pričakovanjih 21-dnevno skladiščenje pri 1 °C, ni imelo večjega vpliva na rast aerobnih mezofilnih bakterij (Slika 16). Drugačen trend se kaže pri 7-dnevnem skladiščenju solate pri 12 °C (Slika 17). Tekom skladiščenja se SŠMO poveča, kar kaže da temperatura 12 °C že predstavlja ugodno temperaturo za rast aerobnih mezofilnih bakterij. Agüero in sod. (2011) so v raziskavi primerjali skupno število aerobnih mezofilnih bakterij na sredinskih solatnih listih tekom skladiščenja pri visoki relativni vlagi (95–98 %) ter nižji relativni vlagi (70–72 %) pri 2 °C. SŠMO se je v obeh primerih tekom skladiščenja povečalo. Pri visoki relativni vlagi se je SŠMO povečalo iz 7,0–7,2 log cfu/g (N_0) na 7,9–8,1 log cfu/g po 12-dnevnem skladiščenju. Pri nižji relativni vlagi

pa se je SŠMO iz 7,0–7,2 log cfu/g (N_0) povečalo kar na 8,3–8,5 log cfu/g. Solata ima kakor tudi večina druge sveže hrane vodno aktivnost a_w visoko in sicer več kot 0,98. To ugodno vpliva na rast večine bakterij, saj večina bakterij raste v rangi a_w od 0,91–1,00. Dostopna voda je nujno potrebna za rast mikroorganizmov, saj ima v bioloških celicah voda štiri osnovne funkcije: je kemijski reaktant (hidrolize, kondenzacije), je univerzalno topilo za metabolite, ima mehansko vlogo pri ohranjanju celičnega turgorja ter omogoča strukturo proteinov, DNA, polisaharidom in membranam (Stopar, 2007).

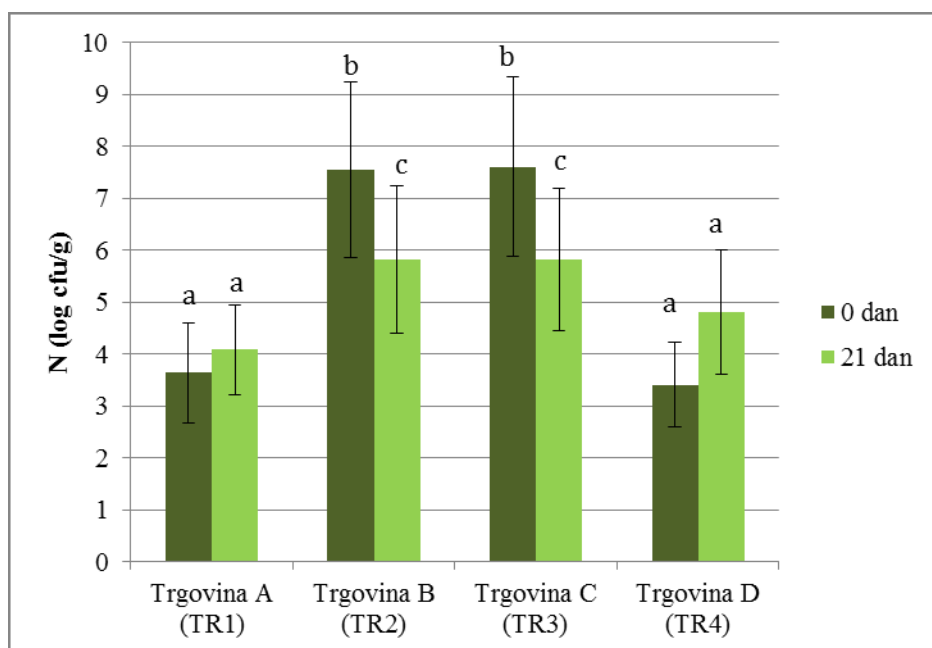
Oliveira in sod. (2010) so na 72 svežih konvencionalno pridelanih vzorcih solat iz Španije določili povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij, ki je znašalo $6,35 \pm 0,69$ log cfu/g. Največkrat so poročali da se je SŠMO na solati gibalo med 4 in 8 log cfu/g, število koliformnih bakterij pa med 0,7 in 6 log cfu/g. Podobno se je pokazalo tudi pri naši raziskavi, saj je bilo začetno število aerobnih mezofilnih bakterij dokaj različno med vzorci solate iz različnih trgovin. Mikrobiota na zelenjavi je v splošnem zelo raznolika, vendar jo večinoma sestavljajo gramnegativne bakterije, kot so bakterije iz družine Enterobacteriaceae.

4.1.2 Število plesni in kvasovk

V štirih različnih trgovinah (A, B, C, D) smo vzorčili solato (*Lactuca sativa* L.) in vzorce označili kot TR1, TR2, TR3 in TR4. V svežih vzorcih solate ($t = 0$) smo določali število plesni in kvasovk (SŠPK), nato smo paralelne vzorce skladiščili pri 1 °C v temnem prostoru in SŠPK določili še 21 dan (Slika 18).

SŠPK v sveži solati ($t = 0$) iz trgovin A in D je bilo nižje kot v solati iz trgovin B in C ($P < 0,05$). Na solatah iz trgovin B in C se je SŠPK tekom 21-dnevnega skladiščenja v temi pri 1 °C zmanjšalo ($P < 0,05$), medtem ko je na solatah iz trgovin A in D malo povečalo ($P > 0,05$). V trgovini B se je začetno SŠPK iz $7,56 \pm 1,69$ log cfu/g zmanjšalo na $5,82 \pm 1,42$ log cfu/g in pri trgovini C iz $7,60 \pm 1,73$ log cfu/g na $5,84 \pm 1,37$ log cfu/g. Pri solati iz trgovine A se je SŠPK povečalo iz $3,64 \pm 0,96$ log cfu/g na $4,08 \pm 0,85$ log cfu/g, pri trgovini D pa iz $3,41 \pm 0,82$ log cfu/g na $4,81 \pm 1,20$ log cfu/g.

V naši raziskavi vzorcev solate je začetno ($t = 0$) SŠPK v različnih trgovinah zelo različno z dokaj velikim SD. Najnižje začetno SŠPK je bilo $3,41 \pm 0,85$ log cfu/g, medtem ko je bilo najvišje $7,60 \pm 1,37$ log cfu/g. V nasprotju z našo raziskavo je Trdan (2015) pri vzorčenju ($n = 5$, $t = 0$) solate iz trgovine določila manjša odstopanja med posameznimi vzorci (manjši SD) in dobila bolj ponovljive rezultate, saj je bilo povprečno $4,86 \pm 0,13$ log cfu/g solate. Moramo pa upoštevati, da pri solati iz trgovine nimamo podatka o starosti solate, proizvajalcu in o rokovanju s solato pred nakupom. Vsi ti dejavnimi zagotovo doprinesejo k SŠPK.



Slika 18: Povprečno število plesni in kvasovk v vzorcih solate (*Lactuca sativa* L.) skladiščene 21 dni (1 °C)

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; TR1: solata kristalka trgovina A, konvencionalna pridelava, n = 6; TR2: solata kristalka, trgovina B, konvencionalna pridelava, n = 6; TR3: solata kristalka, trgovina C, konvencionalna pridelava, n = 6; TR4: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava, n = 6; a, b, c: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Rezultati so si dokaj nasprotujoči. Nizka temperatura skladiščenja solate (1 °C) očitno lahko vpliva tako na razmnoževanje, kot tudi na odmiranje kvasovk in plesni, za kar je lahko odgovorno začetno število kvasovk in plesni. Vzorci solate iz trgovin B in C so imeli že na začetku skladiščenja zelo veliko SŠPK v primerjavi z vzorci iz trgovin A in D. Pri vzorcih solate iz trgovin A in D se je v nasprotju s trgovinama B in C SŠPK kljub skladiščenju na nizki temperaturi povečalo. Tudi pri drugih raziskavah so dokaj velika odstopanja v skupnem številu plesni in kvasovk na solatnih listih (Abadias in sod., 2008; Oliveira in sod., 2010). Oliveira in sod. (2010) so v 72 vzorcih solate določili skupno število plesni in kvasovk. Povprečno število plesni in kvasovk je znašalo $4,21 \pm 0,96$ log cfu/g. SŠPK je v 52,8 % med 4 in 5 log cfu/g, lahko pa je tudi pod 3 log cfu/g in nad 6 log cfu/g pri konvencionalno pridelani solati. Trdan (2015) je preiskala SŠPK vzorcev dveh različnih proizvajalcev solate. Po 10-dnevnem skladiščenju pri 3 ± 1 °C se je SŠPK pri obeh proizvajalcih povečalo (iz $4,86 \pm 0,13$ log cfu/g na $6,57 \pm 0,46$ log cfu/g ter iz $5,52 \pm 0,14$ log cfu/g na $6,02 \pm 0,99$ log cfu/g). Njeni rezultati so primerljivi z rezultati naše raziskave pri vzorcih solate iz trgovin A in D. V njenem primeru se je SŠPK povečalo med skladiščenjem, kljub

uporabljeni dokaj nizki temperaturi 3 ± 1 °C. V našem primeru je SŠPK med različnimi vzorci solate prav tako dokaj različno, kakor navajajo Oliveira in sod. (2010). Agüero in sod. (2011) so mnenja, da je eden izmed parametrov ki vplivajo na kakovost solate tekom skladiščenja tudi ustrezna visoka vsebnost relativne vlage. Če je vsebnost relativne vlage prenizka, prihaja do izgube vode solatnih listov. To je pri solati bistvenega pomena, zato kjer imajo listi relativno veliko površino v primerjavi z volumnom. V raziskavi so primerjali rast plesni in kvasovk pri visoki relativni vlagi (95–98 %) ter nižji relativni vlagi (70–72 %) pri 2 °C. SŠPK je bilo pri nižji relativni vlagi za 1,5 log cfu/g nižje, kot pri visoki relativni vlagi. V našem primeru smo pri skladiščenju solate zagotovili optimalno relativno vlago (> 85 %).

Jeddi in sod. (2014) navajajo, da so bile kvasovke prisotne v vseh preiskovanih 20 vzorcih solate. Med plesnimi pa so prevladovali plesni rodov *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* in *Fusarium*. Do kontaminacije solate s plesnimi in kvasovkami lahko pride preko zemlje, prahu, vode, ter neustreznega rokovanja med pridelavo in procesiranjem. Visoko SŠPK ima lahko vpliv tako na varnost, kot tudi na kakovost solate. Lahko pride do pojave gnilobe. Tournas (2005) navaja možne zdravstvene težave, ki nastanejo zaradi prisotnosti plesni in kvasovk v zelenjavi, saj nekatere plesni lahko proizvajajo mikotoksine ali povzročajo alergije. Zaradi tega Jeddi in sod. (2014) priporočajo, da pri rokovanju s solato zagotavljamo varnost in kakovost »od vil do vilic« in upoštevamo dobro kmetijsko prakso, dobro proizvodnjo prakso ter sistem HACCP (ang. Hazard Analysis and Critical Control Points, analiza tveganja kritičnih kontrolnih točk).

4.1.3 Naravna prisotnost bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* na solati

V splošnem se lahko s patogenimi mikroorganizmi zelenjava kontaminira med rastjo, pri pobiranju, pri rokovanju po obiranju ter med distribucijo. Kontaminacija zelenjave pred obiranjem je lahko direktna ali indirektna preko živali, insektov, vode, zemlje, umazane opreme in človeškega rokovanja (Oliveira in sod., 2010; Oliveira in sod., 2011). V nadaljevanju smo preverili tudi prisotnost patogenih bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* v zeleni solati, saj ti bakterijski vrsti predstavljata resno tveganje za zdravje ljudi.

Na nobenem od preiskovanih vzorcev solat iz trgovin A, B, C in D nismo zasledili naravno prisotnih bakterij vrst *E. coli* (n = 12) in *L. monocytogenes* (n = 12) (v 1 g). Ponekod so začetni rezultati mikrobioloških preiskav kazali na možno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki jih z nadaljnjimi preiskavami nismo zaznali. To kaže na dejstvo, da so v trgovinah A, B, C in D prodajali s stališča odsotnosti bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* mikrobiološko varno solato.

Kar se tiče naravno prisotnih bakterij vrste *E. coli* so Oliveira in sod. (2010) v 9 (12,5 %) od skupno 72 vzorcev solat konvencionalne pridelave dokazali naravno prisotne bakterije vrste *E. coli*, v nobenem primeru pa niso določili patogenega seva bakterije vrste *E. coli* O157:H7. V 72 vzorcih ekološko pridelane solate pa jih je bilo kar 16 (22,2 %) kontaminiranih z bakterijami vrste *E. coli*. V nasprotju z rezultati naše raziskave je Trdan (2015) v 21 preiskovanih vzorcih solate, dokazala prisotna 2 (9,5 %) seva bakterij vrste *E. coli* v solati. Jeddi in sod. (2014) so na 6 vzorcih solate (od skupno 20) detektirali prisotne bakterije vrste *E. coli*, od tega ni bil nobeden patogen sev vrste *E. coli* O157:H7. Bakterije vrste *E. coli* (tip I) so najpogostejši indikator sveže fekalne kontaminacije, na kar kaže tudi dejstvo, da je tip I vključen v higienske kriterije (Uredba komisije št. 2073/2005, 2005). Prisotnost bakterij vrste *E. coli* na sveži solati lahko kaže na nezadostno higiensko prakso pri pridelavi solate ali na sporadično kontaminacijo namakalne vode (Oliveira in sod., 2011). V našem primeru na vzorcih solat konvencionalne pridelave iz različnih trgovin ni bilo prisotnih bakterij vrste *E. coli*, kar s tega stališča kaže na dobro higiensko prakso med predvsem pridelavo ter tudi kasnejšo distribucijo in skladiščenjem solate.

Trdan (2015) pristnosti bakterij vrst *L. monocytogenes* ni dokazala. Tudi Carrasco in sod. (2008) v vzorcih ($n = 58$) niso dokazali prisotnosti bakterij vrste *L. monocytogenes*. Podobno je bilo v drugi študiji 72 vzorcev solat negativnih na naravno prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* (Oliveira in sod., 2010). V študiji Carrasco in sod. (2008) zatrjujejo, da kadar so bakterije vrste *L. monocytogenes* prisotne, so sposobne tudi rasti na sveži "Ready-to-Eat" solati ledenki. Večina zelenjave ima višje vrednosti pH, kar ustreza ravnim zahtevam bakterij vrste *L. monocytogenes* (Adams, 2016). Bakterije rodu *Listeria* so mikroorganizmi, ki so prisotni v okolju in jih najdemo tako na/v zemlji, kot tudi v vodi. S tega stališča se zelenjava na polju zlahka kontaminira s temi bakterijami. Vendar je pojavnost bakterij vrste *L. monocytogenes* glede na navedbe avtorjev v vzorcih solate dokaj nizka (Carrasco in sod., 2008; Oliveira in sod., 2010; Oliveira in sod., 2011; Trdan, 2015). Nekateri avtorji predvidevajo, da bi lahko naravno prisotna mikrobiota na zelenjavi imela inhibitorni efekt na rast bakterij vrste *L. monocytogenes* (Liao in Fett, 2001). Tudi v naši raziskavi v 12 vzorcih solate iz 4 različnih trgovin ni bilo prisotnih bakterij vrste *L. monocytogenes*, kar je eden od kriterijev, ki kaže na dobro zagotavljanje varnosti »od vil do vilic«. Jeddi in sod. (2014) ugotavljajo da so v splošnem patogene bakterije, kot so bakterije vrste *E. coli* O157:H7, *Salmonella* in *L. monocytogenes* na solati redkeje naravno prisotne.

4.2 ADHEZIJA BAKTERIJ

4.2.1 Vpliv spiranja zelene solate (*Lactuca sativa* L.) na kvantifikacijo bakterij

Namen teh eksperimentov je bil ugotoviti, v kakšnem obsegu spiranje zmanjša skupno število aerobnih mezofilnih bakterij (SŠMO) in bakterij vrste *E. coli*. S spiranjem vzorcev solate po 1-dnevnem in 7-dnevnem skladiščenju pri 12 °C (v 4 l plastični (LDPE) vrečki in v temi) smo s solatnih listov odstranili nepritrjene oz. slabo pritrjene bakterijske celice. Na listih so ostale le pritrjene oz. ireverzibilno adherirane bakterijske celice.

Spiranje solate (KON2) s 100 ml sterilne fiziološke raztopine v sterilnem lončku (1 min. na stresalniku, 100 obr./min.) vpliva na zmanjšanje SŠMO po 1-dnevnem skladiščenju ($P < 0,05$). Pri vzorcih solate smo po spiranju določili SŠMO $3,43 \pm 0,42$ log cfu/g, medtem ko, če spiranja nismo uporabili, smo določili $4,36 \pm 0,08$ log cfu/ml. Sklepamo lahko, da s spiranjem odstranimo nepritrjene oz. slabo pritrjene bakterijske celice s površine solatnega lista. Enake rezultate smo dobili po 7 dneh skladiščenja solate, saj smo po spiranju določili $5,32 \pm 0,11$ log cfu/g, medtem ko smo na listih solate brez spiranja določili $5,87 \pm 0,18$ log cfu/g (Preglednica 13).

Pri bakterijah vrste *E. coli* smo po 1-dnevnem skladiščenju solatnih listov določili večje število teh bakterij ($6,38 \pm 0,10$ log cfu/g) kjer spiranja nismo uporabili, kot pri skupini, kjer smo solatne liste spirali ($5,69 \pm 0,20$ log cfu/g) ($p < 0,05$). Tudi po 7 dneh skladiščenja smo določili manj bakterij po spiranju ($4,94 \pm 0,46$ log cfu/g), kot tam kjer spiranja nismo uporabili ($5,40 \pm 0,24$ log cfu/g) ($P > 0,05$) (Preglednica 14).

Preglednica 13: Vpliv spiranja solate (*Lactuca sativa* L.) na povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij in bakterij vrste *E. coli*

Mikrobiološka preiskava	Čas skladiščenja	N (log cfu/g) $\pm$ SD	
		Spiranje solate	Brez spiranja solate
<i>E. coli</i>	1 dan	$5,69 \pm 0,20^a$ (n = 3)	$6,38 \pm 0,10^b$ (n = 3)
	7 dni	$4,94 \pm 0,46^a$ (n = 3)	$5,40 \pm 0,24^a$ (n = 3)
SŠMO	1 dan	$3,43 \pm 0,42^a$ (n = 3)	$4,36 \pm 0,08^b$ (n = 3)
	7 dni	$5,32 \pm 0,11^a$ (n = 3)	$5,87 \pm 0,18^b$ (n = 3)

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; SD: standardna deviacija; SŠMO: povprečno število aerobnih mezofilnih bakterij; a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Podobno je Trdan (2015) pri vrednotenju vpliva spiranja na bakterije vrste *L. monocytogenes* ugotovila, da pri uporabi spiranja določimo manjše število bakterij. Po 24-urah skladiščenja kontaminiranih svežih solatnih listov je po spiranju določila 5,84 log cfu/g bakterij, pri listih kjer ni uporabila spiranja pa 7,05 log cfu/g. Manjša je bila razlika po 48 – urnem skladiščenju in sicer je določila 6,74 log cfu/g (spiranje) in 7,70 log cfu/g (brez spiranja). Tudi Domenech in sod. (2013) so kontaminirali solato z bakterijami vrste *L. monocytogenes* ($N_0 = 10^8$ cfu/ml). Solatne liste so različno dolgo spirali pod tekočo vodo. Ugotovili so, da 30-sekundno spiranje solatnih listov s tekočo vodo zmanjša končno število bakterij. Pri 30-sekundnem spiranju listov s tekočo vodo se je število bakterij zmanjšalo za približno 1 log cfu/g, medtem ko so pri 10-sekundnem spiranju določili le 0,6 log cfu/g manjše število bakterij.

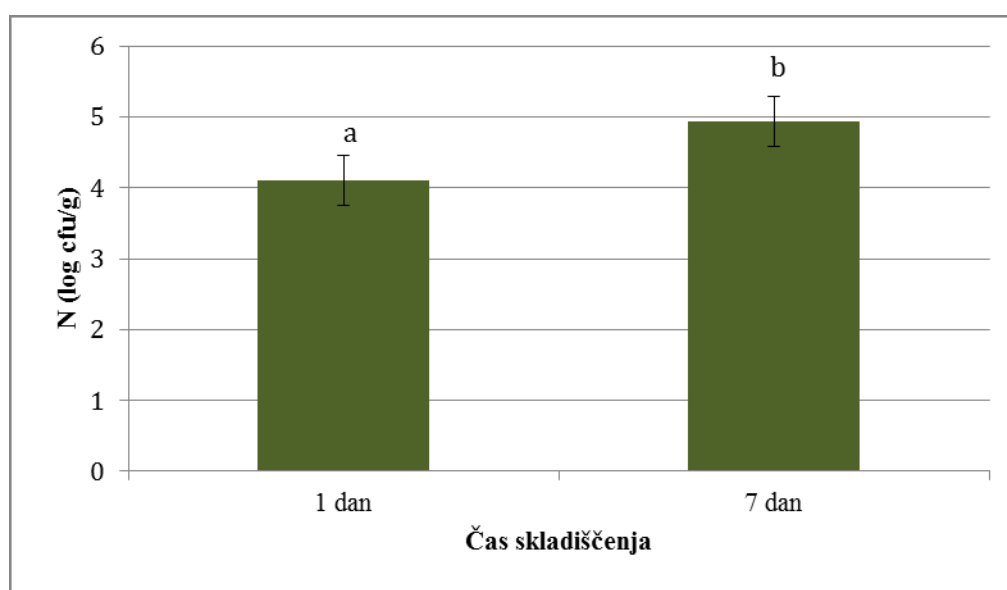
Nastou in sod. (2012), so ugotavljali učinek odstranjevanja bakterij s solatnih listov s pomočjo mešanja vode. Solatne liste so kontaminirali z bakterijami vrste *L. monocytogenes* (100 μ l koncentracije 10^5 – 10^6 cfu/ml) in inkubirali 24 h pri 5 °C. Po inokulaciji so liste dali v čašo z vodo ($V = 100$ ml, $T = 19$ °C) in jih z magnetnim mešalom mešali 5 minut pri hitrosti 900 obr./min. Oprano solato so prenesli v sterilne plastične vrečke. Rezultati so pokazali, da so z mešanjem odstranili približno 1 log cfu/cm² več bakterij vrste *L. monocytogenes*, kot pri statičnem potapljanju solatni listov. Pri uporabi mešanja solatnih listov v vodi je znašalo število bakterij $1,71 \pm 0,38$ log cfu/cm², pri potapljanju listov v vodo $2,75 \pm 0,29$ log cfu/cm², pri kontroli pa je bilo pričakovano največje število $3,42 \pm 0,11$ log cfu/cm². Primerjali so tudi različne temperature skladiščenja kontaminirane solate. Ugotovili so, da višja skladiščna temperatura ne vpliva samo na boljšo rast bakterij vrste *L. monocytogenes* ampak, da je le-te težje tudi odstraniti z vodo. Bakterije se močneje pritrdijo na listno površino.

Glede na rezultate Nastou in sod. (2012) je razviden učinek mešanja in potapljanja solatnih listov, s katerima so odstranili nepritrjene in slabo pritrjene bakterijske celice. Če tekočina miruje, so vse sile, ki delujejo na tekočino v ravnotežju, na nek delec ali površino pa pravokotno delujejo sile tlaka. Ob gibanju tekočine oz. mešanju pa na bakterije delujejo tudi druge površinske sile. Pri majhnih hitrostih je tok laminaren, ustvari se tangencialni tok, kjer se tekočina giblje vzporedno s stenami posode. Pri visokih hitrostih in manj viskozni tekočini, kot je voda, pa je gibanje turbulentno.

Uporabili smo tangencialni tok pri mešanju tekočin, tako da smo ustvarili dokaj slab mešalni in centrifugalni učinek, a vendar dovolj močan, da smo odstranili slabo pritrjene bakterijske celice s solatne površine. Odločili smo se, da bomo pri vseh nadaljnjih preiskavah bakterijske adhezije na solatnih listih uporabili spiranje, saj po spiranju določamo le na solatne liste pritrjene oz. adherirane bakterije. Določili smo parametre spiranja kontaminiranih solatnih listov: hitrost stresanja je znašala 100 obratov/minuto, stresanje smo izvajali 2 minuti. Spirali smo kontaminirane dele solatnih listov površine približno 25 cm².

4.2.2 Adhezija aerobnih mezofilnih bakterij na zeleno solato (*Lactuca sativa* L.)

Na zeleni solati smo določali adhezijo aerobnih mezofilnih bakterij, saj smo predvidevali da se naravno prisotne bakterije v ugodnih razmerah skladiščenja solate vedno bolj adherirajo. Povprečno število adheriranih aerobnih mezofilnih bakterij se je na zeleni solati (KON2) po 7 dneh skladiščenja pri 12 °C povečalo za skoraj 2 log enoti, iz $3,59 \pm 0,35$ log cfu/g (1 dan) na $5,34 \pm 0,49$ log cfu/g (7 dni) ($P < 0,05$) (Slika 19).

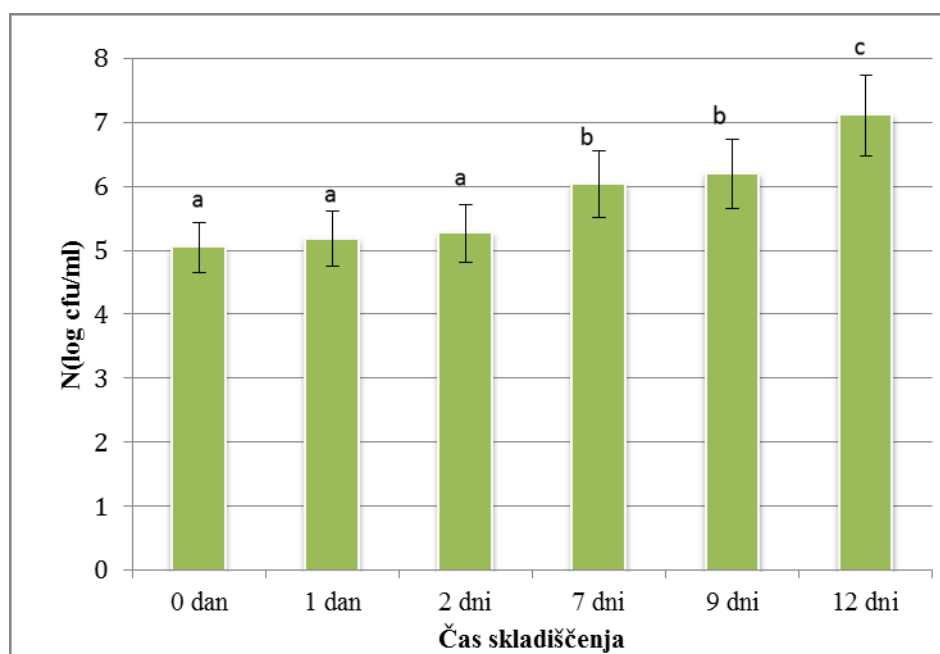


Slika 19: Povprečno število adheriranih aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih solate KON2 (*Lactuca sativa* L.) skladiščenih pri 12 °C

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; KON2: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava, n = 3; a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

V nadaljevanju smo določili adhezijo SŠMO na solato INT1 – solata kristalka pridelana na integriran način na BF, Oddelek za agronomijo. Povprečno število adheriranih SŠMO se je po 12-dnevnem skladiščenju solate pri 12 °C povečalo iz $5,05 \pm 0,30$ log cfu/g na $7,11 \pm 0,63$ log cfu/g (Slika 20) ($P < 0,05$). Vzorčenje smo izvajali po 1 dnevu, 2 dneh, 7 dneh, 9 dneh in 12 dneh. Pri sveži solati ($t = 0$ dni) ter po 1 in 2 dneh skladiščenja solate je bilo povprečno število adheriranih SŠMO podobno ($P > 0,05$) in sicer je po 1-dnevem skladiščenju znašalo $5,18 \pm 0,42$ log cfu/g, po 2-dnevem skladiščenju pa $5,27 \pm 0,45$ log cfu/g. Dlje ko smo solato skladiščili, večje je bilo povprečno število adheriranih SŠMO. Do večjih razlik je prišlo po 7 dneh skladiščenja solate, saj se je povprečno število adheriranih SŠMO povečalo na $5,92 \pm 0,53$ log cfu/g. Glede na povprečno število adheriranih SŠMO po

7 dneh skladiščenja, po 9 dneh ni prišlo do bistvenega povečanja, saj je SŠMO znašalo $6,27 \pm 0,54 \log \text{cfu/g}$ ($P > 0,05$). Po 12 dneh pa je SŠMO že znašalo $7,11 \pm 0,63 \log \text{cfu/g}$.



Slika 20: Povprečno število adheriranih aerobnih mezofilnih bakterij na vzorcih solate INT1 (*Lactuca sativa* L.) skladiščenih pri 12 °C

Legenda: N: število bakterijskih kolonij; n: število vzorcev; INT1: solata kristalka, BF- Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave, n = 3; a, b, c: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Sklepamo lahko, da so ugodne razmere skladiščenja, kot je višja temperatura (12 °C), ugodno vplivajo na rast in večjo adhezijo bakterij. Na višje SŠMO vpliva tudi daljši čas skladiščenja. Temperatura je eden od ključnih dejavnikov, ki vplivajo na rast bakterij. Mezofilne bakterije imajo temperaturni optimum okrog 37 °C, rastejo pa tudi že pri nižjih temperaturah, kot je 15 °C (Stopar, 2007). V našem primeru so bakterije dobro rastle tudi pri 12 °C. V povezavi z bakterijsko rastjo pa je tudi adhezija bakterij, večja kot je bila rast bakterij na solatnem tkivu, večja je bila tudi adhezija le-teh. Bakterijska adhezija pa predstavlja začetne stopnje tvorbe biofilmov.

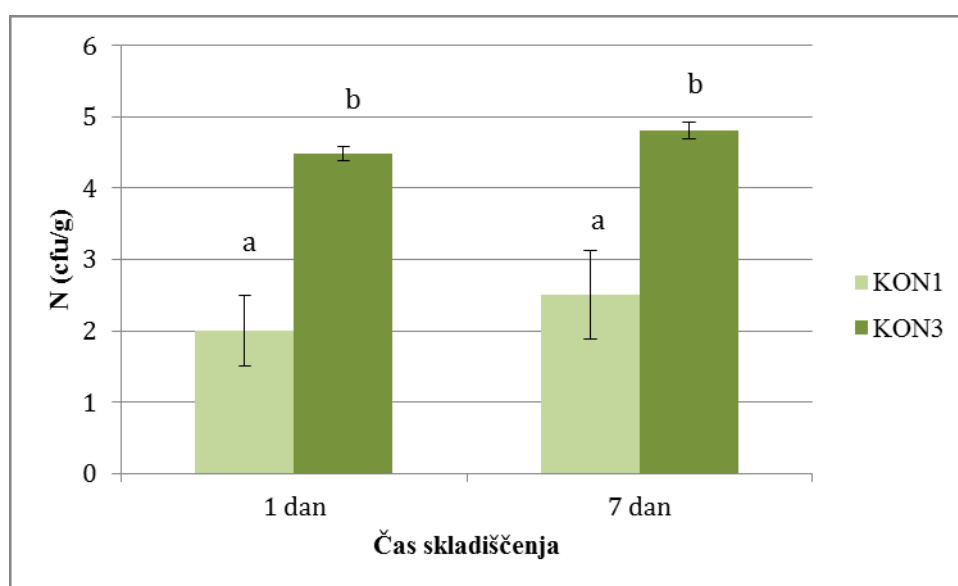
Fett (2000) poroča o naravni tvorbi biofilmov. Več kot polovica vseh aerobnih mezofilnih bakterij je v obliki biofilma pritrjenih na površino kalčkov. Biofilmi pa predstavljajo do 80 % celotne mikrobne populacije na površinah rastlin (Lindow in Brandl, 2003). V naši raziskavi lahko potrdimo, da se z daljšim časom skladiščenja število adheriranih bakterijskih celic povečuje. Verjetno so na površini ustrezne hranilne snovi, ki v ugodnih razmerah (ustrezna relativna vlaga in temperatura) vplivajo na rast naravno prisotne mikrobiote. Jeffersen (2004) navaja, da se zrasle

bakterije v večini adherirajo na solatno površino, zato jih je težje odstraniti. Bakterijske celice so vgrajene v biofilmski kompleks, zato lahko ostanejo pritrjene tudi, ko primanjkuje hranilnih snovi ali se spremeni vrednost pH.

4.2.3 Adhezija bakterij vrste *L. monocytogenes* na zeleno solato (*Lactuca sativa* L.)

Vzorci solate KON1 smo pred skladiščenjem solate kontaminirali z bakterijami vrste *L. monocytogenes* in uporabili nizko začetno število (10^4 cfu/ml). Po 1-dnevem skladiščenju solate pri 12 °C smo ocenili povprečno število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* $2,00 \pm 0,50$ log cfu/g in po 7 dneh skladiščenja pa $2,51 \pm 0,62$ log cfu/g ($P > 0,05$) (Slika 21).

Nadaljnje eksperimente smo zato izvedli z večjim začetnim številom bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^6 cfu/ml). Po 1 dnevnem skladiščenju solate KON3 pri 12 °C smo določili povprečno število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* $4,49 \pm 0,10$ log cfu/g in po 7 dneh skladiščenja pa $4,81 \pm 0,12$ log cfu/g ($P > 0,05$) (Slika 21).



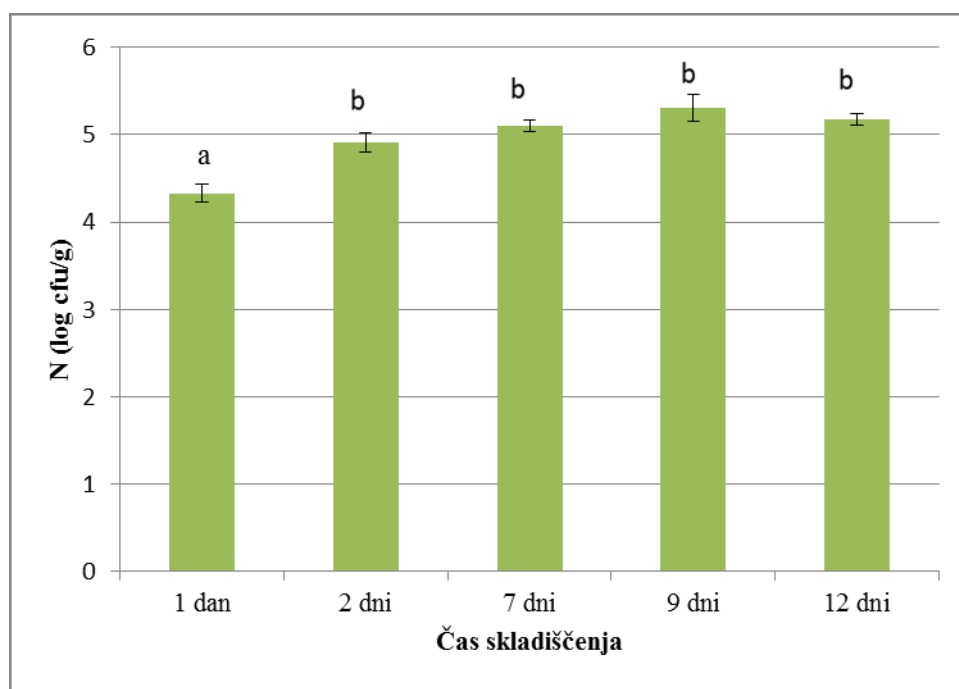
Slika 21: Povprečno število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* na vzorcih zelene solate KON1 in KON3 (*Lactuca sativa* L.) skladiščenih pri 12 °C

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; KON1: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava, n = 3; KON3: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava, n = 3; a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Glede na rezultate prikazane na sliki 21 smo v nadaljnjih eksperimentih adhezije za kontaminacijo solate uporabljali višje začetno število bakterij vrste *L. monocytogenes* 10^6 cfu/ml. V glavnem poskusu, kjer smo uporabili solato INT1, je bilo število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* največje po 9 dneh skladiščenja solate in sicer $5,31 \pm 0,15$ log cfu/g (Slika 22), nato pa se je naslednje 3 dni povprečno število adheriranih bakterij malo zmanjšalo (12 dan: $5,18 \pm 0,07$ log cfu/g) ($P > 0,05$).

Do največjega povečanja števila adheriranih bakterij je prišlo med 1 in 2 dnevom skladiščenja solate ($4,33 \pm 0,11$ log cfu/g na $4,91 \pm 0,11$ log cfu/g), kar je podobno kot v raziskavi Trdan (2015), kjer se je pri 10 °C število bakterij vrste *L. monocytogenes* povečalo za 0,21 log cfu/g. Manjše povečanje števila adheriranih bakterij kot v naši raziskavi lahko pripišemo tudi nižji skladiščni temperaturi (10 °C) kontaminirane solate, saj tudi Ells in Hansen (2006) poročata, da se pri višji temperaturi bakterije vrste *L. monocytogenes* na zelju bolje adherirajo.

Pri naših vzorcih zelene solate INT1 se je število adheriranih bakterij povečalo od $4,33 \pm 0,11$ log cfu/g, 1 dan na $5,18 \pm 0,12$ log cfu/g, do $5,31 \pm 0,15$ log cfu/g - 9 dan (Slika 22). Dokaj ugodna višja temperatura (12 °C) skladiščenja solate je vplivala na večjo stopnjo adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes*. Trend naraščanja stopnje adhezije se kaže do 9 dne skladiščenja solate, 12 dan skladiščenja solate pa je adhezija manjša, vendar med 9 in 12 dnevnim skladiščenjem ni značilnih razlik ($P > 0,05$).



Slika 22: Povprečno število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes* na vzorcih zelene solate INT1 (*Lactuca sativa* L.) skladiščene pri 12 °C

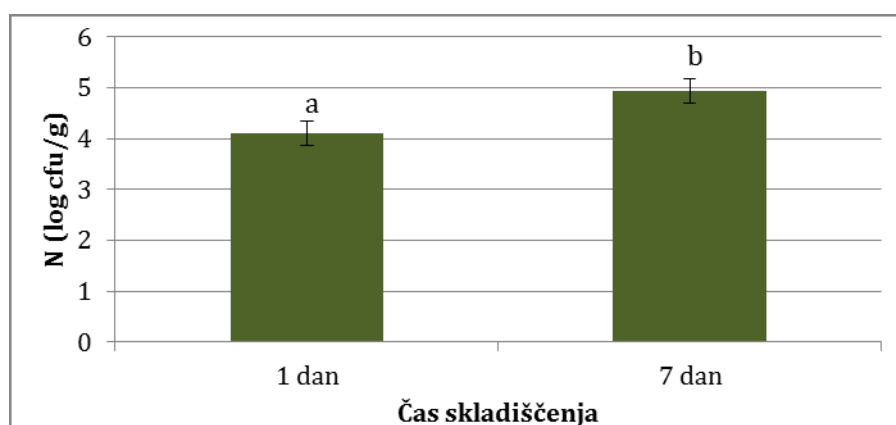
Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; INT1: solata kristalka, BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave, n = 3; a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

V raziskavi Olmez in Temur (2010) se je adhezija skladiščene umetno kontaminirane solate z daljšim časom skladiščenja povečala. Število pritrjenih bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* so določili po spiranju z vodo. Statistično značilne razlike ($P < 0,05$) so se pokazale po 6, 24, in 48 urah inkubacije bakterij na solati pri 10 °C. Po 48-urni inkubaciji so z SEM detektirali tvorbo biofilmov obeh bakterij. Prav tako pa so dokazali internalizacijo bakterij vrste *L. monocytogenes* v notranjost listnih rež. V naši preiskavi smo ugotovili, da se z daljšim časom skladiščenja pri 12 °C povečuje število adheriranih bakterij vrste *L. monocytogenes*. Glede na rezultate Olmez in Temur (2010) lahko sklepamo, da se je po 2 dneh že razvil biofilm na solatni površini. Od 2 dneva naprej pa je število bakterij ostalo praktično enako, kar pomeni da se rast in adhezija bakterij z daljšim časom skladiščenja ni povečevala linearno. Sklepamo lahko, da je prišlo do pomanjkanja ustreznih hranil na površini, kompeticije z naravno prisotnimi mikroorganizmi ali pa je prišlo do maksimalne zapolnitve inokulirane solatne površine z bakterijami vrste *L. monocytogenes*.

4.2.4 Adhezija bakterij vrste *E. coli*

4.2.4.1 Adhezija bakterij vrste *E. coli* na zeleno solato (*Lactuca sativa* L.)

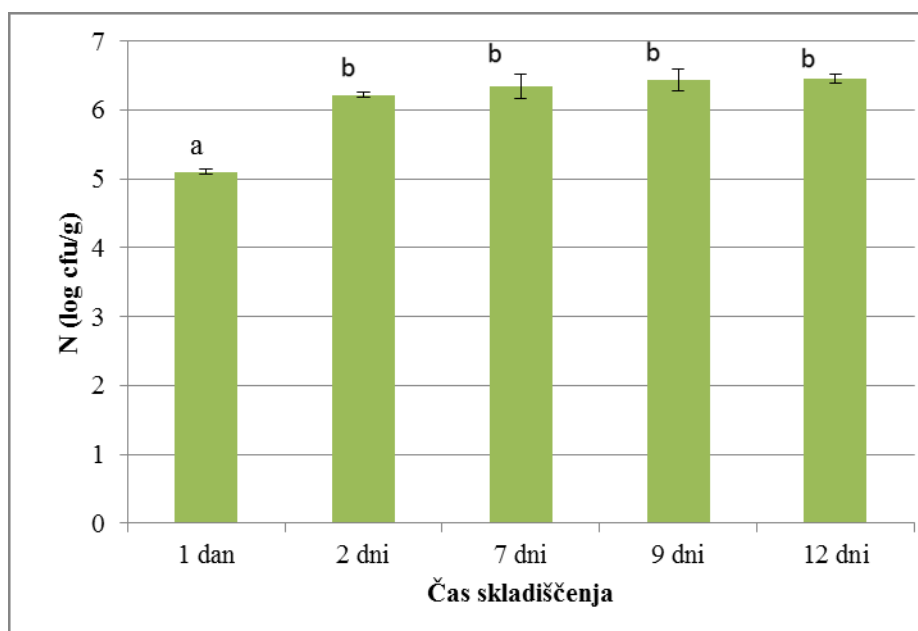
Vzorci solate KON2 smo pred skladiščenjem kontaminirali z bakterijami vrste *E. coli* koncentracije 10^4 cfu/ml. Po 1-dnevnem skladiščenju solate pri 12 °C smo ocenili povprečno število adheriranih bakterij vrste *E. coli* $4,11 \pm 0,20$ log cfu/g; po 7 dneh skladiščenja pa $4,94 \pm 0,24$ log cfu/g ($P < 0,05$) (Slika 23).



Slika 23: Povprečno število adheriranih baterij vrste *E. coli* na vzorcih zelene solate KON2 (*Lactuca sativa* L.) skladiščenih 7 dni pri 12 °C

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; KON2: solata kristalka, trgovina D, konvencionalna pridelava, n = 3; a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Vzorci solate INT1 smo pred skladiščenjem kontaminirali z višjo koncentracijo ($N_0 = 10^6$ cfu/ml) bakterij vrste *E. coli* kot vzorce solate KON2 ($N_0 = 10^4$ cfu/ml), ker smo v nadaljevanju želeli preveriti, kako se število adheriranih bakterij vrste *E. coli* spreminja skozi 12-dnevno skladiščenje solate pri 12 °C. Vzorčenje smo izvajali po 1 dnevu, 2 dneh, 7 dneh, 9 dneh in 12 dneh. Po 1-dnevnem skladiščenju solate je bilo povprečno število adheriranih bakterij vrste *E. coli* $5,10 \pm 0,04$ log cfu/g. Po 12 dneh skladiščenja pa je bilo njihovo število največje in sicer $6,46 \pm 0,07$ log cfu/g. Sama adhezija se je najbolj povečala med 1-dnevnim in 2-dnevnim skladiščenjem solate in sicer za 1,12 log cfu/g. Med 2. in 12. dnem skladiščenja solate pri 12 °C se je število adheriranih bakterij le malo povečalo in sicer za 0,25 log cfu/g ($P > 0,05$). Od prvega dneva skladiščenja naprej pa vse do 12 dneva skladiščenja se je povprečno število adheriranih bakterij vrste *E. coli* povečalo za 1,36 log cfu/g (Slika 24).



Slika 24: Povprečno število adheriranih bakterij vrste *E. coli* na vzorcih zelene solate INT1 (*Lactuca sativa* L.) skladiščenih 12 dni pri 12 °C

Legenda: n: število vzorcev; N: število bakterijskih kolonij; INT1: solata kristalka, BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave; a, b: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$)

Če primerjamo število adheriranih bakterij vrste *E. coli* na vzorcih solate KON2 in INT1, vidimo, da nižja začetna koncentracija bakterij ($N_0 = 10^4$ cfu/ml) v primerjavi z višjo ($N_0 = 10^6$ cfu/ml), vpliva na manjšo adhezijo bakterij po 1 in 7 dneh skladiščenja pri 12 °C (Slika 23, Slika 24). Pri KON2 se je po 1-dnevnem skladiščenju adheriralo $3,59 \pm 0,35$ log cfu/g; pri INT1 pa le $5,10 \pm 0,04$ log cfu/g. Podoben trend se kaže po

7-dnevnem skladiščenju solate, kjer se je pri KON2 adheriralo $5,34 \pm 0,49$ log cfu/g; pri INT1 pa $6,34 \pm 0,18$ log cfu/g. Tako pri vzorcih solate KON2, kot tudi pri INT1, gre razbrati, da daljši čas skladiščenja vpliva na večjo adhezijo bakterij vrste *E. coli*.

Podobno kot v našem poskusu tudi Patel in sod. (2011) v raziskavi različnih sevov bakterije vrste *E. coli* O157:H7 navajajo, da se s časom stopnja adhezije bakterij na intaktne ali narezane solatne liste povečuje. Med 1 uro in 24 urami inkubacije bakterij se na intaktni solati ledenki adhezija poveča za najmanj $0,55$ log cfu/cm² solatne površine in največ $1,81$ log cfu/cm² solatne površine. V našem primeru smo adhezijo bakterij vrste *E. coli* spremljali dlje časa in ugotovili da med 2. in 12. dnevom skladiščenja ni statistično značilnih razlik med številom adheriranih bakterij. Podoben trend se kaže tudi pri adheziji bakterij vrste *L. monocytogenes* (poglavje 4.2.3).

Eden izmed razlogov zakaj se adhezija bakterij vrste *E. coli* od 2. dne naprej ne spreminja, je tudi omejitev hranil na listni površini. Sklepamo lahko, da so bakterije izčrpale oz. porabile vsa dostopna hranila na površini. O tem poročata Mercier in Lindow (2000). Dognala sta, da se tekom bakterijske kolonizacije sladkorji na površini listov zmanjšujejo, saj je pri njihovi preiskavi na koloniziranih listih ostalo le še 20 % lahko izkoristljivih sladkorjev, kot je glukoza. Razlog leži mogoče tudi v tem, da smo izbirali samo zdrave, sredinske in na videz nepoškodovane liste solate, kjer je izceja hranilnih snovi na listno površino manjša, kot pri poškodovanih listih.

Brandl in Amundson (2008), sta določala rast bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na solatnih listih. Solatne liste sta za 3 sekunde potopila v inokulacijski medij s suspenzijo 10^4 cfu/ml bakterij vrste *E. coli* O157:H7. Sledila je 2-dnevna inkubacija pri 28 °C. Velikost populacije bakterij vrste *E. coli* O157:H7 se je na sredinskih solatnih listih povečala za 56-krat. Število bakterij se je iz 3,5 log cfu/g listov ($t = 0$) povečalo na 5,0 log cfu/g listov po 1-dnevem skladiščenju ter na 5,3 log cfu/g listov po 2 dnevih skladiščenja solate. Generacijski čas bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na je na sredinskih listih znašal 3,63 h; na notranjih pa je bil še nižji (2,38 h). Navajata tudi, da imajo zunanji solatni listi več naravno prisotnih bakterij, kakor notranji in sredinski listi, kar pomeni, da imajo bakterije v notranjosti solatne glave na voljo več hranil, saj je kompeticija za hranila manjša. Za razliko od naše raziskave sta določila vsoto tako adheriranih, kot neadheriranih bakterij ter uporabila višjo temperature skladiščenja kontaminiranih solatnih listov. Vseeno pa se kaže podoben trend kot pri naši raziskavi, saj bakterije vrste *E. coli* O157:H7 dobro rastejo na solatnem listu in se najbolj namnožijo v prvem dnevu skladiščenja, nekaj pa tudi v času med 1. in 2. dnevom skladiščenja. Višja uporabljena skladiščna temperatura (28 °C) kot v naši raziskavi (12 °C) vpliva na boljšo rast bakterij vrste *E. coli*. Glede na dano temperaturo skladiščenja kontaminirane solate (12 °C) so se bakterije vrste *E. coli* pri naši preiskavi adherirale v skladu z navedbami Rodriguez-Caturla in sod. (2012). V raziskavi, kjer so preizkušali vpliv različnih temperatur, ki vplivajo na rast bakterij, so ugotovili, da se po 6-urnem skladiščenju pri temperaturi 8 °C rahlo zmanjša rast bakterij za 0,4–0,5 log cfu/g ($N_0 = 4,5$ log cfu/g). Pri temperaturi 12 °C

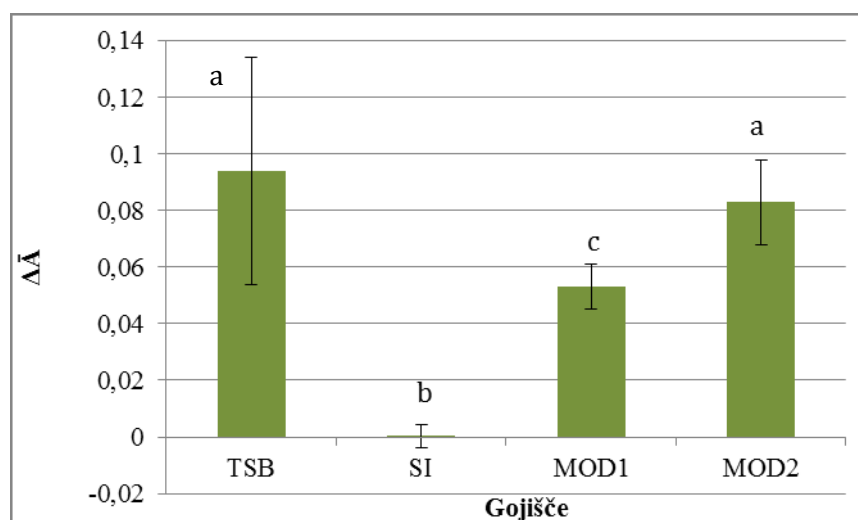
($N_0 = 4,5 \log \text{cfu/g}$) pa se je število bakterij po 6-urnem skladiščenju povečalo za $0,2 \pm 0,04 \log \text{cfu/g}$. Sklepamo lahko, da je temperatura eden izmed ključnih dejavnikov, ki vpliva na razmnoževanje in zato tudi na adhezijo bakterij na listih zelene solate.

Bakterije vrste *E. coli* se v naši raziskavi na solatno površino v enakih razmerah skladiščenja adherirajo bolje kot bakterije vrste *L. monocytogenes*. Po 12-dnevnem skladiščenju kontaminirane solate pri 12 °C se je adheriralo približno za 1 log cfu/g več bakterij vrste *E. coli* kot bakterij vrste *L. monocytogenes*. Patel in sod. (2011) navajajo, da prisotnost hidrofobne voskaste kutikule na površini solatnih listov vpliva na večjo adhezijo bakterij vrste *E. coli* O157:H7, ki so tudi bolj hidrofobne, kot bakterije vrste *L. monocytogenes*. Po drugi strani pa Ukuku in Fett (2002) nista zaznala statistično značilnih razlik med sevoma bakterije vrste *E. coli* O157:H7 v povezavi z hidrofobnostjo celične površine in stopnjo ter močjo adhezije. Na stopnjo adhezije poleg lastnosti posameznega mikroba (giblјivost, površina mikrobov in njihovi virulenčni dejavniki) vplivajo tudi okoljski in drugi dejavniki, kot so površinski naboj in površinska energija substrata, omočļivost, ionska jakost, hrapavost površine, hidrodinamika, sestava substrata oz. površine. Če primerjamo nekatere dejavnike rasti v okolju, opazimo, da so bile vrednosti pH in a_w primerne za rast obeh vrst bakterij, temperatura 12 °C pa bi po teoriji morala bolj ustrezati bakterijam vrste *L. monocytogenes*. Na sposobnost adhezije bakterij vrste *L. monocytogenes* naj bi vplivali prisotnost gena *lpc*, ki kodira listerijski povezovalni protein za celulozo in s tem omogoča večjo stopnjo adhezije, kakor če bakterije nimajo prisotnega tega gena (Bae in sod., 2013). Pri tvorbi biofilmov z bakterijami vrste *L. monocytogenes* so pomembni tudi sistemi medcelične komunikacije in zunajcelična DNK ter prisotne flagele. Flagele omogočajo boljšo giblјivost, kar posledično vpliva tudi na večjo stopnjo adhezije teh bakterij (Botticella in Russo, 2013). Po drugi strani na adhezijsko sposobnost bakterij vrste *E. coli* vplivajo: prisotnost divalentnih kationov, hidrofobnost in produkcija kapsule pri pasivnem ali aktivnem procesu adhezije (Hassan in Frank, 2003). Če povzamemo študije jih le malo kaže na korelacijo med prisotnostjo celičnih izrastkov na površini, nabojem ali hidrofobnostjo ter sposobnostjo bakterij za adhezijo solatnega tkiva (Yaron in Römļing, 2014). Na adhezijsko sposobnost bakterij vrste *E. coli* naj bi vplivale tudi amiloidne navite fimbrije, vendar pa Torres in sod. (2005) niso zaznali večjega vpliva amiloidnih navitih fimbrij na adhezijo bakterij na kalčke. Shaw in sod. (2011) so pokazali, da imajo flagele glavno vlogo pri adheziji ETEC na epidermis svežih solatnih listov. Glede na omenjena dognanja raziskav se zdi, da so tako bakterije vrste *L. monocytogenes*, kot tudi bakterije vrste *E. coli* dobro prilagojene na filosfero in da uporabļajo številne mehanizme za kolonizacijo rastlin.

4.2.4.2 Adhezija bakterij vrste *E. coli* na polistiren v modelnih gojiščih

Da bi preverili, ali hranila prisotna na solatnem listu omogočajo adhezijo se bakterij vrste *E. coli* smo določili njihovo adhezijo na polistiren v mikrotiterski ploščici ($n = 32$). Izbrali smo gojišče TSB kot pozitivno kontrolo, solatni izpirek, modelno gojišče 1 (MOD1) in modelno gojišče 2 (MOD2). MOD1 je po vsebnosti enostavnih sladkorjev glukoze in fruktoze podobno solatnemu izpirku, vsebuje še druga hranila kot sta pepton in NaCl. MOD2 pa je vsebuje vsa osnovna potrebna hranila za rast bakterij, glavni vir ogljika pa predstavlja galaktoza.

V gojišču TSB se je adheriralo največ bakterij ($\Delta\bar{A} = 0,094 \pm 0,040$), sledila je adhezija v MOD2 ($\Delta\bar{A} = 0,083 \pm 0,015$) ter adhezija v MOD1 ($\Delta\bar{A} = 0,053 \pm 0,008$), medtem ko se je po pričakovanjih najmanj bakterij vrste *E. coli* ($\Delta\bar{A} = 0,00022 \pm 0,004$) adheriralo v solatnem izpirku (Slika 25). Stopnja adhezije v gojišču TSB in v modelnem gojiščem 2 je bila enaka ($P > 0,05$). To lahko pojasnimo z vsebnostjo hranil, saj je v obeh gojiščih podobna in količinsko ugodna in ustrezna količina hranil za rast bakterij. Gojišče TSB predstavlja pozitivno kontrolo, MOD2 pa glede na sestavo zadošča za optimalno bakterijsko rast, le da vir ogljika predstavlja galaktoza. S tem lahko podpremo tudi hipotezo, da bolje kot bakterije rastejo, bolje se tudi adherirajo (v tem primeru na polistiren). Zdi se, da večja količina hranilnih snovi vpliva na večjo adhezijo bakterij. V gojišču MOD1 so bile nižje vsebnosti ogljika, kar je vplivalo na manjšo bakterijsko rast in manjšo adhezijo kot v gojišču MOD2 in v TSB. Adhezija bakterij vrste *E. coli* v solatnem izpirku je bila najmanjša. V primerjavi z gojiščem TSB je solatni izpirek zelo osiromašeno gojišče, zato tudi tukaj lahko tudi potegnemo pozitivno korelacijo z vsebnostjo hranil v samem gojišču, bakterijsko rastjo in stopnjo adhezije. Več kot ima samo gojišče ustreznih hranil, boljša je rast in boljša adhezija bakterij vrste *E. coli* na polistiren.



Slika 25: Povprečna stopnja adhezije bakterij vrste *E. coli* na polistiren v modelnih gojiščih

Legenda: $\Delta\bar{A}$: povprečna stopnja adhezije ($n = 32$); TSB: gojišče triptični sojin bujon; ; MOD1: modelno gojišče 1 - ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze; MOD2: modelno gojišče 2 - ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 1g/l galaktoze, 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze; SI: izpirek solate: sterilni izpirek površine solatnega lista 200 cm² z 100 ml ddH₂O

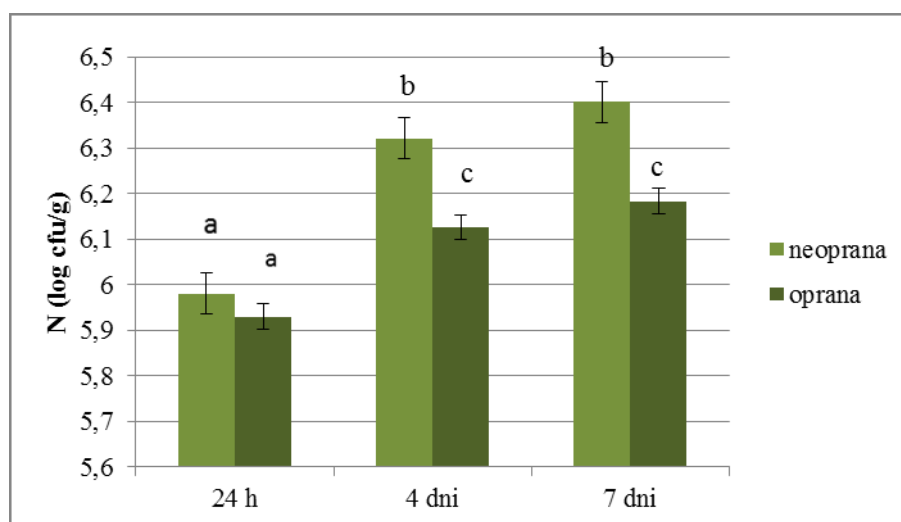
Na adhezijo bakterij vpliva tudi površina kamor se bakterije pritrdijo, saj imajo različne površine različne lastnosti in zato je tudi adhezija bakterij na različne površine različna. Glede na rezultate merjenja adhezije bakterij vrste *E. coli* na polistiren (Slika 25) lahko sklepamo, da polistiren ni primeren medij za preverjanje adhezije bakterij na zeleno solato, saj gre za povsem drugačno površino. Podobno Patel in sod. (2011) menijo, da je adhezija bakterij vrste *E. coli* na različnih površinah različna. Pozitivno korelacijo pri adheziji na polistiren in na rastlinsko tkivo so odkrili le pri enem sevju bakterij vrste *E. coli*. Tudi Rivas in sod. (2007) domnevajo, da adhezija in tvorba biofilmov bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na polistirenskih ploščah ni primerna za predstavo o adhezijah in tvorbi biofilmov na drugih površinah. Patel in sod. (2011) tudi ugotavljajo, da je adhezija na rastlinska tkiva dokaj zapleten proces, kjer je vključenih veliko mehanizmov adhezije. Močnejša adhezija bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na narezane rastlinske produkte, zahteva bolj učinkovite načine pranja za zmanjšanje kontaminacije s patogenimi mikroorganizmi. Problem predstavlja tudi dejstvo, da se moč/stopnja adhezije povečuje s časom, zato bi bile za preprečevanje kontaminacije in širjenja patogenov na površinah potrebne zgodnje intervencijske strategije.

4.2.4.3 Vpliv pranja zelene solate (*Lactuca sativa* L.) na adhezijo bakterij vrste *E. coli*

Naš namen je bil tudi ugotoviti, ali pranje solate pred kontaminacijo zelene solate z bakterijami vrste *E. coli* ($N_0 = 10^6$ cfu/ml) vpliva na adhezijo teh bakterij. Polovico vzorcev solate INT1 ($n = 3$) in INT2 ($n = 3$) smo oprali z 10 minutnim namakanjem v 5 litrih pitne vode. Druge polovice vzorcev solate INT1 ($n = 3$) in INT2 ($n = 3$) pred kontaminacijo z bakterijami nismo oprali. Vse vzorce smo 7 dni skladiščili v plastičnih vrečkah v temi pri 12 °C. Adhezijo smo pri vzorcih solate INT1 določali po 1-dnevnem skladiščenju, pri vzorcih solate INT2 pa po 1 dnevu, 4 dneh in 7 dneh. Med seboj smo primerjali adhezijo na opranih in neopranih solatnih listih.

Pri vzorcih solate INT1 smo ugotovili, da pranje solate vpliva na manjšo adhezijo bakterij vrste *E. coli* po 1-dnevnem skladiščenju solate INT1 ($n = 3$) pri 12 °C v temi. Po 1 dnevu smo na neoprani solati določili $5,10 \pm 0,038$ log cfu/g, na oprani solati pa $4,66 \pm 0,033$ log cfu/g ($P < 0,05$). S predhodnim pranjem solate izperemo v vodi topne hranilne snovi (npr. enostavne sladkorje, nitratni dušik in amonijev dušik), kar je vplivalo na manjšo stopnjo adhezije.

V nasprotju z vzorci INT1, po 1-dnevnem skladiščenju nismo zaznali vpliva pranja solate INT2 na adhezijo bakterij vrste *E. coli* ($P > 0,05$). Na neoprano solato se je adheriralo $5,98 \pm 0,04$ log cfu/g, na oprano pa $5,93 \pm 0,06$ log cfu/g. Po 4 in 7 dneh inkubacije pa se je razlika med skupinama povečala. Po 4 in 7 dneh skladiščenja je bila adhezija bakterij na oprano solato manjša ($P < 0,05$) ($6,12 \pm 0,02$ log cfu/g, 4 dan; $6,18 \pm 0,02$ log cfu/g, 7 dan) v primerjavi z neoprano solato ($6,32 \pm 0,01$ log cfu/g, 4 dan; $6,40 \pm 0,07$ log cfu/g, 7 dan) (Slika 26).



Slika 26: Vpliv pranja solate (*Lactuca sativa* L.) INT2 na adhezijo bakterij vrste *E. coli* pri 7 dnevnem skladiščenju pri 12 °C

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; N; INT2: solata kristalka, BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave, n = 3; pranje solate: pred kontaminacijo z bakterijami vrste *E. coli* smo solato namakali 10 min v 5 l H₂O; a, b, c: rezultati z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo (P < 0,05)

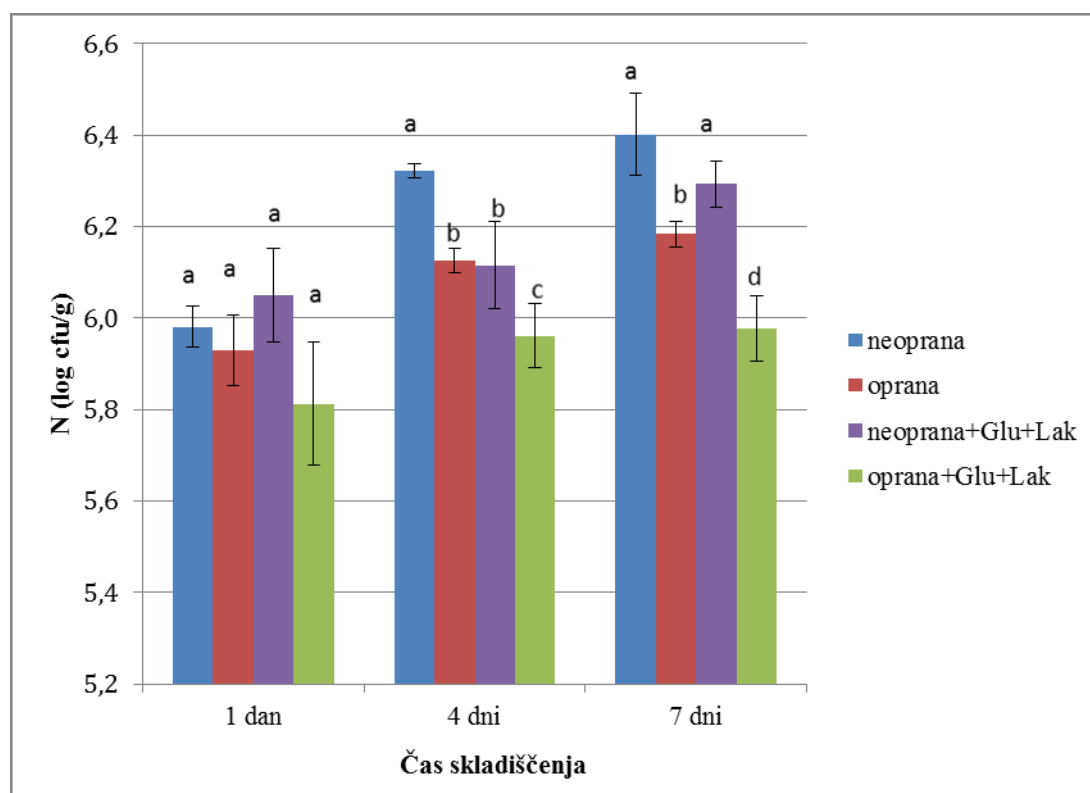
Boyer (2002) navaja, da voda raztaplja številne biološke molekule. Polarne (ionske in nenabite) snovi so dobro topne v vodi. Polarne in ionske snovi imenujemo hidrofilne, niso pa vse snovi ki vsebujejo polarne skupine topne v vodi. Med snovi ki so topne v vodi spada tudi glukoza in drugi enostavni ogljikovi hidrati. Tudi amonijak je zelo dobro topen v vodi, po reakciji z vodo nastane NH₄⁺. Prav tako pa so tudi nitrati dobro topni v vodi. Glede na naše rezultate, predvidevamo, da s predhodnim pranjem solate (pred kontaminacijo s patogenimi bakterijami) izperemo v vodi topne hranilne snovi (npr. enostavne sladkorje, nitratni dušik in amonijev dušik), ki jih bakterije lahko izkoriščajo za svojo rast. Manj hranilnih snovi na sami površini solate posledično vpliva na manjšo stopnjo adhezije bakterij vrste *E. coli*. Brandl in Amundson (2008) sta v izpirkih solatne površine določila kar nekaj prisotnega celokupnega dušika in ogljika. Na sredinskih solatnih listih sta določila 0,782 µg celokupnega dušika/g lista ter 61 µg celokupnega ogljika/g lista. Na notranjih solatnih listih pa je bila ta vsebnost še višja in sicer sta določila 2,290 µg celokupnega dušika/g lista ter 89 µg celokupnega ogljika/g lista. V naši raziskavi smo ta hranila (ter verjetno še kakšne druge snovi) s predhodnim pranjem odstranili, kar se kaže tudi v manjši rasti oz. adheziji bakterij vrste *E. coli* v primerjavi z vzorci listov, ki jih pred kontaminacijo nismo oprali.

4.2.4.4 Adhezija bakterij vrste *E. coli* na zeleno solato (*Lactuca sativa* L.) z dodanimi nizkimi vsebnostmi glukoze in laktoze

Adhezijo bakterij vrste *E. coli* smo določili tudi na različno tretirani zeleni solati (INT2, $n = 3$) med 7 dnevnim skladiščenjem pri 12 °C. Vzorci solate so bili: neoprana solata, neoprana solata z dodatkom nizkih koncentracij glukoze in fruktoze (5 mg/l), oprana solata in oprana solata z dodatkom nizkih koncentracij glukoze in fruktoze (5 mg/l). Enostavne sladkorje (glukoza, fruktoza) smo dodali direktno v inokulum bakterij. Bakterije vrste *E. coli* z začetno koncentracijo 10^6 cfu/ml smo točkovno inokulirali na solatni list. Rezultati kažejo, da je bila 1. dan adhezija bakterij vrste *E. coli* enaka na vse površine solate ne glede na predhodno tretiranje solatnih listov (Slika 27) ($P > 0,05$). Tekom nadaljnjega skladiščenja opazimo razlike. Po 4 dnevih skladiščenja pri 12 °C je bilo največ adheriranih bakterij na neoprani solati ($P < 0,05$), medtem ko med tretmaji oprane solate ter neoprane solate z dodanimi nizkimi koncentracijami sladkorjev, ni bilo razlik v adheziji. Po 7 dnevih je bilo največ bakterij adheriranih na neoprani solati, sledi neoprana solata z dodatkom nizkih koncentracij enostavnih sladkorjev, najmanj bakterij pa se je adheriralo na oprano solato ter na oprano solato z dodano nizko koncentracijo sladkorjev.

Na predhodno oprano solato je po 1-dnevnem skladiščenju v primerjavi z oprano solato z dodanimi sladkorji prišlo le do 0,12 log cfu/g večje adhezije bakterij vrste *E. coli* ($P > 0,05$). Po 4 dneh skladiščenja je bila zaznana že večja razlika med skupinama. Adhezija bakterij na oprano solato je znašala $6,13 \pm 0,03$ log cfu/g, na oprano solato z dodanimi enostavnimi sladkorji pa $5,96 \pm 0,07$ log cfu/g, podoben trend se kaže tudi po 7-dnevnem skladiščenju solate ($P < 0,05$). Na oprani solati smo določili $6,18 \pm 0,03$ log cfu/g bakterij, na oprani z dodanimi sladkorji pa $5,98 \pm 0,07$ log cfu/g (Slika 27).

Pri primerjavi adhezije bakterij vrste *E. coli* na neoprano solato ter neoprano solato z dodanimi nizkimi koncentracijami sladkorjev, se le-ta po 1-dnevnem skladiščenju ne razlikuje. Po 4 dneh je bilo na neoprani solati adheriranih $6,32 \pm 0,02$ log cfu/g bakterij, na neoprani solati z dodanimi sladkorji pa $6,12 \pm 0,10$ log cfu/g ($P < 0,05$). Po 7 dneh pa se je na neoprano solato adheriralo $6,40 \pm 0,09$ log cfu/g, na neoprano solato z dodanimi sladkorji pa $6,29 \pm 0,05$ log cfu/g ($P > 0,05$) (Slika 27).



Slika 27: Vpliv različnih načinov priprave površine solate (*Lactuca sativa* L.) INT2 na adhezijo bakterij vrste *E. coli* pri 7 dnevnem skladiščenju pri 12 °C

Legenda: N: število bakterij; n: število vzorcev; INT2: solata kristalka, BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave, n = 3; pranje solate: 10 min v 5 l H₂O; a, b, c, d: rezultati vzorčenja istega dne z različno oznako se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$); Glu: na površino solate dodana glukoza (100 µl, 5 mg/l) ; Lak: na površino solate dodana laktoza (100 µl, 5 mg/l)

Dodatek nizkih koncentracij enostavnih sladkorjev (glukoza, fruktoza) ima pri oprani solati viden inhibitorski učinek na adhezijo bakterij vrste *E. coli*. Lahko sklepamo, da nizke koncentracije dodanega izkoristljivega vira ogljika (glukoza, fruktoza) na solatno površino ne vplivajo na adhezijo bakterij vrste *E. coli* oziroma jo celo rahlo zavirajo. Podobne količine sladkorjev glukoze in fruktoze, kot smo jih dodali na solatno površino, smo v predhodnih analizah določili, da so že prisotne na sami površini. Z dodatkom smo želeli ugotoviti ali naravno prisotni enostavni sladkorji vplivajo na večjo adhezijo bakterij vrste *E. coli*. Glede na rezultate, se zdi, da na listni površini naravno prisotna glukoza in fruktoza ne vplivata na večjo adhezijo bakterij vrste *E. coli* in da ima večji vpliv pranje solatnih listov, ki odstrani oziroma zmanjša vsebnost ne samo enostavnih sladkorjev, ampak tudi drugih hranil, ki jih bakterije potrebujejo za rast. Zato je bila rast bakterij vrste *E. coli* manjša in posledično tudi manjša adhezija.

Trend kaže na delno inhibitorno delovanje dodane glukoze in laktoze na samo adhezijo bakterij na solato. To bi lahko pripisali dejstvu, da v določenih razmerah glukoza in ostali lahko izkoristljivi viri ogljika postanejo slabše izkoristljivi (Bren in sod., 2016). Bren in sod. (2016) so raziskali vpliv več različnih kombinacij virov dušika in ogljika na rast različnih laboratorijskih in naravno prisotnih sevov bakterij vrste *E. coli*, saj sta metabolizma dušika in ogljika medsebojno povezana. Dognali so, da v razmerah, ko so bakterijam na voljo osiromašeni viri dušika (npr. posamezne aminokisline), glukoza postane eden od najslabših virov ogljika, saj zagotavlja slabšo rast kot drugi sladkorji. To je posledica nižje vsebnosti cAMP (ciklični adenozin monofosfat), kot je optimalna za rast.

Brandl in Amundson (2008) sta preučevala vpliv dodanega vira dušika in ogljika na rast bakterij vrste *E. coli* na solati *in vivo*. Kot vir dušika sta uporabila amonijev nitrat (6 mmol), kot vir ogljika pa glukozo (0,1 %) v 0,5 % mmol kalijevim fosfatnem pufru. Začetna koncentracija bakterijskih celic je znašala 10^4 cfu/ml. Liste sta inokulirala posamično, tako da sta jih za 3 sekunde potopila v suspenzijo bakterij in hranil (glukoza, amonijev nitrat). Liste sta odcedila in dala v plastične vrečke. Odprte vrečke sta skladiščila 3 dni pri 28 °C. Velikost populacije bakterij vrste *E. coli* O157:H7 na sredinskih listih je bila ob dodatku amonijevega nitrata 5-krat višja, kot pri vzorcih brez dodatka ($P < 0,001$). V nasprotju pa velikosti populacije bakterij ob dodatku glukoze niso statistično značilno različne v primerjavi z vzorci, kjer glukoze niso dodali ($P > 0,05$). Po treh dneh je bilo število bakterij vrste *E. coli* pri kontroli 4,7 log cfu/g lista; pri dodatku amonijevega nitrata 5,5 log cfu/g lista in pri dodatku glukoze 5 log cfu/g. Tako kot v naši raziskavi je tudi raziskavi Brandl in Amundson (2008), razviden rahel inhibitorni učinek dodatka glukoze na rast bakterij vrste *E. coli* na solati. V naši raziskavi smo se osredotočili le na tiste bakterije vrste *E. coli*, ki so se adherirale na solatno površino. Očitno gre za pozitivno korelacijo med skupnim številom bakterij (adherirane in neadherirane) ter številom bakterij, ki so se adherirale. Več kot je zrastle bakterij na solatni površini, več se jih je tudi adheriralo. Sklepamo da ustrezna hranila na solatni površini vplivajo tako na rast kot adhezijo bakterij vrste *E. coli*.

4.3 RAST BAKTERIJ VRSTE *E. coli*

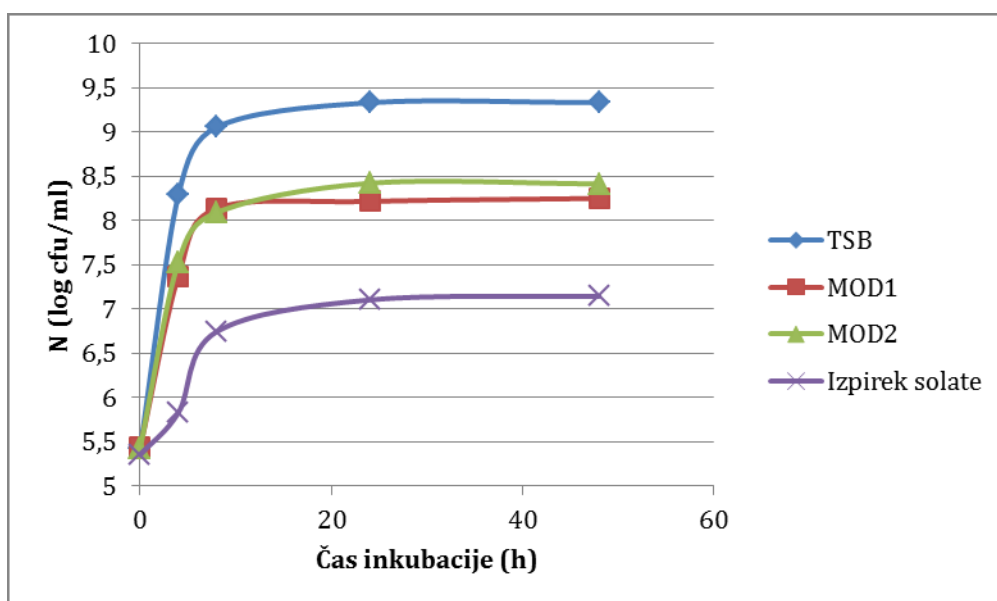
4.3.1 Rast bakterij vrste *E. coli* v modelnih gojiščih

Poleg adhezije bakterij vrste *E. coli* smo določali tudi njihovo rast v solatnem izpirku (vzorci solate INT3). Sočasno smo določali rast tudi v modelnem gojišču 1 (MOD1) in modelnem gojišču 2 (MOD2), ter gojišču TSB. Rast so določali 48 ur pri 37 °C. Pri določanju rastne krivulje bakterij vrste *E. coli* je bila najboljša rast v gojišču TSB,

sledila je rast bakterij v MOD2 (ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 1 g/l galaktoze, 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze) in v MOD1 (ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze). Sam dodatek galaktoze, kot glavnega vira ogljika za rast bakterij v MOD2, ni bistveno vplival na boljšo rast bakterij vrste *E. coli* v primerjavi z gojiščem MOD1, kjer galaktoze nismo dodali. Najslabša rast je bila v izpirku solate (sterilen izpirek površine solatnega lista 200 cm² s 100 ml ddH₂O), vendar pa se je kljub temu koncentracija bakterij vrste *E. coli* povečala za skoraj 2 logaritemski stopnji in je dosegla po 24 urah koncentracijo $1,40 \times 10^7$ cfu/ml (Slika 28).

V gojišču TSB, ki nudi bakterijam optimalna hranila (sestavine gojišča: 17 g/l tripton; 3 g/l sojton; 2,5 g/l glukoza; 5,0 natrijev klorid, 2,5 g/l dikalijev fosfat) je bila rast pričakovano zelo dobra, saj se začetno število bakterij iz $5,42 \pm 0,01$ log cfu/ml po 48 urah pri 37 °C, povečalo na $9,34 \pm 0,01$ log cfu/ml (Slika 28). V eksponentno fazo rasti so bakterij prišle med 0 in 2 uro inkubacije, po 5 urah pa se je rast začela upočasnjevati. Med 24 in 48 uro so bile bakterije že v stacionarni fazi rasti. V modelnem gojišču MOD1 in MOD2 je bila rast podobna in prav tako je bila hitro dosežena eksponentna faza rasti kot v gojišču TSB. Po 8 urah so bakterije v MOD1 prešle že v stacionarno fazo rasti, medtem ko so bakterije MOD2 še rastle do 24 ure inkubacije. To gre pripisati dodani galaktozi v samem gojišču, ki je služila kot vir ogljika. Rast bakterij v MOD1 in MOD2 je po pričakovanjih manjša kot v gojišču TSB, saj je gojišče TSB bogatejše s hranilnimi snovmi za rast bakterij, kot gojišči MOD1 in MOD2.

Bakterije so dobro rastle tudi v solatnem izpirku, saj se je začetno število $5,35 \pm 0,02$ log cfu/ml po 48 urah povečalo na $7,15 \pm 0,03$ log cfu/ml. Bakterije so v eksponentno fazo rasti prišle malo kasneje kot pri uporabi ostalih treh gojišč. Eksponentna faza rasti se je začela nekje po 4 urah inkubacije in je trajala do 10 ure inkubacije. Največjo rast v izpirku solate smo določili med 4 in 8 uro kjer se je število bakterij povečalo iz $5,82 \pm 0,012$ log cfu/ml na $6,74 \pm 0,03$ log cfu/ml. V fazo upočasnjene rasti bakterije preidejo po 22 urah, po približno 30 urah inkubacije pa lahko govorimo o stacionarni fazi, kjer je število bakterij konstantno vse do 48 ure inkubacije (Slika 28).



Slika 28: Rast bakterij vrste *E. coli* v gojišču TSB, modelnem gojišču 1, modelnem gojišču 2 in izpirku zelene solate *Lactuca sativa* L. INT3

Legenda: N: število bakterij; TSB: gojišče triptični sojin bujon; MOD1: modelno gojišče 1: ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze; MOD2: modelno gojišče 2: ddH₂O raztopina z 1 g/l peptona; 0,5 g/l NaCl; 1g/l galaktoze, 5 mg/l glukoze; 5 mg/l fruktoze izpirek solate: sterilni izpirek površine solatnega lista 200 cm² z 100 ml ddH₂O; INT3: solata kristalka, Oddelek za agronomijo-Biotehniška fakulteta, integrirana pridelava, n = 3

Zanimivo je, da so bakterije rasle tudi v izpirku solate. Rasna krivulja (Slika 28) kaže, da je solatni izpirek dober medij za rast bakterij vrste *E. coli*. Brandl in Amundson (2008) sta tudi *in vitro* raziskovala rast bakterij v solatnem izpirku. Zbrala sta izpirke sredinskih solatnih listov solat zraslih v topli gredi. Izpirke so skoncentrirali ter jih inokulirali z bakterijami vrste *E. coli* O157:H7 ($N_0 = 10^4$ celic/ml raztopine izpirka). Bakterije so v solatnem izpirku rastle zelo dobro. Po 10-urni inkubaciji so iz začetne koncentracije 4 log cfu/ml dosegle koncentracijo 5 log cfu/ml, po 18 urah pa kar 7 log cfu/ml. Boljšo rast bakterij vrste *E. coli* kot v naši raziskavi, lahko pripišemo uporabi koncentriranega izpirka. Brandl in Amundson (2008) sta solatne liste poškropila z bidestilirano vodo. Zbrala sta 100 ml izpirka iz 10 do 20 solatnih listov, ki sta ga nato posušila z liofilizacijo in razredčila z 2 ml kalijevega fosfatnega pufra 10 mmol.

Določila sta tudi vpliv dušika in ogljika na rast bakterij, tako da sta nekatere izpirke obogatili z dodatkom glukoze ali amonijevega klorida. Po 18-urni inkubaciji bakterij v izpirkih obogatenih z amonijevim kloridom kot virom dušika (brez dodane glukoze) ($P < 0,05$), je bila njihova koncentracija višja kot pri neobogatenem izpirku. Pri neobogatemu izpirku je koncentracija znašala 7 log cfu/ml, pri izpirku obogatenim z 10 mmol NH₄Cl pa 7,7 log cfu/ml. Dodatek glukoze (0,2 %) ni imel vpliva na večjo rast bakterij v primerjavi s kontrolo (neobogaten izpirek). Zanimivo je, da je imel

dodatek glukoze celo rahel inhibitorni učinek na rast bakterij po 28-urni inkubaciji (Brandl in Amundson, 2008). Podoben trend in rahel inhibitorni učinek dodatka glukoze na rast bakterij vrste *E. coli* se pri nas kaže *in vivo* ko smo na solatno površino aplicirali majhne količine enostavnih sladkorjev (glukoze in fruktoze) (4.2.4.4.).

Sklepamo lahko, da izpirek solate vsebuje določena hranila, ki omogočajo rast bakterij na solatni površini. Prisotnost hranilnih snovi in rast bakterij pa je verjetno eden od ključnih pogojev za obstanek in adhezijo bakterij na solatnem listu. V nadaljevanju raziskovanja smo se zato odločili da preverimo količine enostavnih sladkorjev (vir ogljika), nitratnega in amonijevega dušika (vir dušika) na površini solate.

4.3.2 Sočasna rast bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*

Bakterije vrste *E. coli* in *L. monocytogenes* smo najprej posamično namnožili do koncentracije 10^8 cfu/ml. Nato smo v 4 ml gojišča TSB prenesli po 1 ml vsakega bakterijskega seva ($N_0 = 10^8$ cfu/ml). Bakterije vrste *E. coli* so v gojišču TSB po 24 h inkubaciji pri 37 °C, ob sočasni prisotnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* dosegle število $9,36 \pm 0,31$ log cfu/ml, število bakterij vrste *L. monocytogenes* pa je bilo le $7,56 \pm 0,36$ log cfu/ml (Preglednica 14).

Preglednica 14: Sočasna rast bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* v gojišču TSB

Bakterije	N_0 (log cfu/ml)	N_{24} (log cfu/ml) $\pm$ SD
<i>E. coli</i>	1 ml približno 10^8 cfu/ml (prekonočna kultura) dodamo v 4 ml TSB	$9,36 \pm 0,31$
<i>L. monocytogenes</i>	1 ml približno 10^8 cfu/ml (prekonočna kultura) dodamo v 4 ml TSB	$7,56 \pm 0,36$

Legenda: N_0 : število bakterij ob času 0 ur ; N_{24} : število bakterij ob času 24 ur; TSB: gojišče triptični sojin bujon; SD: standardna deviacija

Rezultati kažejo, da pri sočasni rasti bolje rastejo bakterije vrste *E. coli*. Očitno so glede na dane okoljske dejavnike pri tekmovanju oz. kompeticiji za hranila gojišča TSB z bakterijami vrste *L. monocytogenes* uspešnejše. Gehring in sod. (2012) so 18 ur sočasno kultivirali bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. enterica* in *Y. enterocolitica* v gojišču TSB pri 30 °C. Začetna koncentracija bakterijskih celic vsake vrste je znašala 50 celic/ml v 100 ml obogatitvenega gojišča. Bakterije vrste

E. coli so dosegle koncentracijo približno 10^9 cfu/ml, bakterije vrste *L. monocytogenes* pa manjšo koncentracijo približno 10^6 cfu/ml. Nekaj manj razlik med koncentracijo bakterijskih celic ob sočasni rasti bakterij vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* navajajo v raziskavi Mellefont in sod. (2008). Bakterije enakih začetnih koncentracij (10^4 cfu/ml), so sočasno inkubirali 25–60 ur. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so maksimalno dosegle $8,61 \pm 0,04$ log cfu/ml, bakterije vrste *E. coli* pa $9,88 \pm 0,11$ log cfu/ml. Bakterije vrste *E. coli* rastejo hitreje in imajo krajši generacijski čas kot bakterije vrste *L. monocytogenes*. Poročajo, da imajo ob enaki začetni koncentraciji bakterije vrste *E. coli* krajši generacijski čas kot bakterije vrste *L. monocytogenes* (gojišče TSB pri 25 °C). Pri bakterijah vrste *E. coli* znaša generacijski čas 0,77 ure; pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* pa 1,08 ure.

Moramo poudariti, da v naši raziskavi nismo spremljali spremembe pH tekom inkubacije ter akumulacije produktov metabolizma inkubiranih bakterij, kar lahko vpliva na boljšo/slabšo sočasno rast določenih bakterij. pH solate se giblje med 6 in 7. Bakterije vrste *L. monocytogenes* pa lahko rastejo v rangi pH od 4,2 do 9,6; medtem ko bakterije vrste *E. coli* v rangi 4,5 do 9,0 (Stopar, 2007). Določen bakterijski sev lahko proizvaja snovi, ki zaviralno delujejo na rast drugih bakterij. Za zaviranje rasti enega bakterijskega seva z drugim bakterijskim sevom pa ni nujna prisotnost specifičnih inhibitorjev, ampak gre lahko za vpliv začetnega števila, lag-faze rasti, različno prilagojenost na pH gojišča. Zaviranje rasti različnih bakterijskih vrst z enim dominantnim sevom je v literaturi naveden kot »Jameson Effect« (Jameson, 1962). Do takega učinka pogosto pride, ko dominantni sev proizvaja specifične zaviralce rasti drugih bakterijskih vrst ali pa gre za kompeticijo sevov za iste hranilne snovi danega gojišča. Pri tem je eden od sevov uspešnejši (Mellefont in sod., 2008). V našem primeru so bakterije vrste *E. coli* uspešnejše ob sočasni rasti in kompeticiji z bakterijami vrste *L. monocytogenes*.

4.4 OGLJIKOVE IN DUŠIKOVE SPOJINE ZELENE SOLATE (*Lactuca sativa* L.)

4.4.1 Vsebnosti enostavnih sladkorjev v zeleni solati med skladiščenjem

Vzorci solate INT1 smo skladiščili do 9 dni pri 12 °C v temi, in jim določili vsebnost enostavnih sladkorjev: glukoze, fruktoze in saharoze. Vzorci solatnih listov smo pred zunanjimi vplivi zavarovali tako, da jih dali v plastične vrečke. Rezultati so pokazali, da se med skladiščenjem solate zmanjšujejo vsebnosti glukoze, fruktoze, saharoze v solati ($P < 0,05$) (Preglednica 15).

Preglednica 15: Vsebnost enostavnih sladkorjev v vzorcih zelene solate (*Lactuca sativa* L.) INT1

Povprečna vsebnost sladkorja $\pm$ SD (g/100 g) po različnih časih skladiščenja								
Fruktoza			Glukoza			Saharoza		
2 dni	7 dni	9 dni	2 dni	7 dni	9 dni	2 dni	7 dni	9 dni
0,71 $\pm$ 0,08 ^a	0,43 $\pm$ 0,11 ^b	0,36 $\pm$ 0,15 ^c	0,55 $\pm$ 0,10 ^a	0,28 $\pm$ 0,07 ^b	0,27 $\pm$ 0,10 ^b	0,19 $\pm$ 0,04 ^a	0,08 $\pm$ 0,02 ^b	0,08 $\pm$ 0,06 ^b

Legenda: n: število vzorcev; INT1: solata kristalka, BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave, n = 8; a, b, c: rezultati z različno oznako za posamezen sladkor se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P < 0,05$); SD: standardna deviacija

Po 2 dneh skladiščenja je bilo največ fruktoze ($0,71 \pm 0,08$ g/100 g), sledila je glukoza ($0,55 \pm 0,10$ g/100 g), najmanj pa smo določili saharoze in sicer $0,19 \pm 0,04$ g/100 g. Podobne količine enostavnih sladkorjev v solati so določili tudi Lopez in sod., (2014). Saharoze je bilo 2- do 3- krat manj kot glukoze. Vsebnost saharoze je bila odvisna od vzorca solate in se je gibala med 0,19 in 0,26 g/100 g solate (v povprečju 0,22 g/100 g). Vsebnost glukoze je variirala med 0,36 in 0,53 g/100 g solate (v povprečju 0,46 g/100 g), največ pa je bilo fruktoze in sicer med 0,45 in 0,65 g/100 g (v povprečju 0,57 g/100 g).

Vsebnost fruktoze je po 2 dneh skladiščenja znašala $0,71 \pm 0,08$ g/100 g, po 7 dneh pa je bila ta vrednost že nižja $0,43 \pm 0,11$ g/100 g, najnižja vrednost pa je bila po 9 dneh skladiščenja pri 12 °C. Povprečna vrednost fruktoze po 9 dneh je znašala $0,36 \pm 0,15$ g/100 g. Podoben trend se kaže tudi pri glukozi. Po 2-dnevnem skladiščenju skladiščenja je v solati še $0,55 \pm 0,10$ g glukoze/100 g. Sedem dni kasneje je vrednost glukoze padla na $0,27 \pm 0,10$ g/100 g. Tudi saharoza se je zmanjšala in sicer iz $0,19 \pm 0,04$ g/100 g po 48 urah na $0,08 \pm 0,06$ g/100 g po 9 dneh skladiščenja pri 12 °C.

Na zmanjševanje količine sladkorjev tekom skladiščenja verjetno vpliva predvsem metabolizma solate, ko pride do pretvorbe sladkorjev v druge produkte. Tekom skladiščenja solate predvidevamo, da je bilo v plastičnih vrečkah dovolj kisika in zato so se enostavni sladkorji (saharoza, glukoza, fruktoza) razgrajevali po aerobni poti razgradnje. Glavna pot razgradnje glukoze je njena razgradnja do piruvata v desetih encimsko-kataliziranih reakcijah v procesu glikolize. Poleg glukoze se do piruvata razgradijo tudi drugi monosaharidi, kot je fruktoza, posredno pa tudi saharoza, ki se hidrolizira do glukoze in fruktoze. V naslednji stopnji metabolizma se piruvat oksidira v acetil-CoA, potem pa le-ta vstopa v citratni cikel in celično dihanje (ob prisotnosti kisika se glukoza pretvori do CO_2 in H_2O , sprosti pa se tudi energija. CO_2 je končni produkt aerobnega metabolizma ogljika) (Boyer, 2002). Domnevamo, da je zaradi metabolizma in skladiščenja v temi prišlo do delne pretvorbe enostavnih sladkorjev v druge produkte. Toledo in sod. (2003) so preiskovali razlike v zmanjšanju celotnih topnih sladkorjev listov špinače tekom skladiščenja v temi ali na svetlobi. Celotni

topni sladkorji so se na svetlobi $20\text{--}25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fotosintetska gostota toka fotonov, ang. Photosynthetic Photon Flux Density- PPFD) zmanjšali za 37 % v 8 dneh, v temi pa kar za 54 %. Podoben trend so dokazali tudi pri glukozi. Glukoza predstavlja primarni substrat, ki se porablja pri respiraciji oz. celičnem dihanju rastlinskega tkiva, po drugi strani pa je direkten produkt fotosinteze. Vzorce smo skladiščili v temi, zato fotosinteza ni bila mogoča. Zato je smiselno, da pride v temi do večje razgradnje oz. katabolizma glukoze in drugih enostavnih sladkorjev, kakor pri skladiščenju rastlin pri svetlobi, kjer rastline proizvajajo glukozo. Mbong in sod. (2017) so raziskali vpliv temperature na zmanjševanje vsebnosti glavnih sladkorjev (glukoza, glukoza-6-fosfat, fruktoza, fruktoza-6-fosfat in saharoza) med skladiščenjem solate. Zmanjševanje vsebnosti sladkorjev je bilo minimalno pri nizki temperaturi (1°C), medtem ko je višja temperatura (18 in 25°C) povzročila večje zmanjšanje. Nižja temperatura je upočasnila metabolne procese tekom skladiščenja solate. Zmanjševanje sladkorjev je imelo tudi vpliv na povečanje vsebnosti aminokislin in maščobnih kislin. Agüero in sod. (2011) poročajo tudi, da se na račun respiracije oz. celičnega dihanja zmanjšuje tudi teža solate tekom skladiščenja, saj se ogljikovi hidrati razgradijo do CO_2 in H_2O . Na težo solate med skladiščenjem pa vpliva predvsem izhlapevanje vlage s solatne površine ter dehidracija, zaradi razlike v parnem tlaku v atmosferi in parnem tlaku solate.

4.4.2 Vsebnosti enostavnih sladkorjev na površini zelene solate

Na površini solatnih listov smo pri določanju enostavnih sladkorjev določili največ saharoze, sledili sta glukoza in fruktoza. Povprečna vsebnost saharoze je bila $0,438 \pm 0,223 \text{ mg}/100 \pm 5 \text{ cm}^2$ na INT3 in $0,422 \pm 0,025 \text{ mg}/100 \pm 5 \text{ cm}^2$ na KON4; povprečna vsebnost glukoze je bila $0,143 \pm 0,068 \text{ mg}/100 \pm 5 \text{ cm}^2$ na INT3 in $0,287 \pm 0,177 \text{ mg}/100 \pm 5 \text{ cm}^2$ na KON4; povprečna vsebnost fruktoze $0,070 \pm 0,018 \text{ mg}/100 \pm 5 \text{ cm}^2$ na INT3 in $0,172 \pm 0,118 \text{ mg}/100 \pm 5 \text{ cm}^2$ na KON4 (Preglednica 16).

Preglednica 16: Vsebnosti enostavnih sladkorjev na površini vzorcev zelene solate (*Lactuca sativa* L.) INT3 in KON4

Vzorci solate	Povprečna vsebnost sladkorjev (mg/100±10 cm ² solatnega lista) ± SD			Preračunana povprečna vsebnost sladkorjev (mg/g solatnega lista) ± SD		
	Glukoza	Fruktoza	Saharoza	Glukoza	Fruktoza	Saharoza
INT3	0,143 ±0,068	0,070 ±0,018	0,438 ±0,223	0,014 ±0,007	0,007 ±0,002	0,044 ±0,022
KON4	0,287 ±0,177	0,172 ±0,118	0,420 ±0,025	0,029 ±0,018	0,017 ±0,012	0,042 ±0,002

Legenda: n: število vzorcev; INT3: solata kristalka, BF, Oddelek za agronomijo, integriran način pridelave, n = 3; KON4: solata kristalka, trgovina C, konvencionalni način pridelave, n = 3; SD: standardna deviacija

Razlog večjih nihanj količin enostavnih sladkorjev na površini solatnega lista gre pripisati dokaj heterogeni sestavi solatne površine. Glede na navedbe različnih avtorjev (Hallmann in sod., 2001; Lima in sod., 2013; Karamanoli in sod., 2012; Seo in Frank, 1999) je površina solate dokaj različna, različno je število listnih rež in število poškodb, kjer se lahko v večji meri izločajo hranila na površino listov. Solato poškodujejo tudi listne uši ali drugi predatorji. Mikro-poškodbe oz. poškodbe, ki s prostim očesom niso vidne, lahko pripomorejo k iztekanju hranilnih snovi (tudi enostavnih sladkorjev) na samo površino.

Dobljene količine sladkorjev na površini solate lahko primerjamo z dobljenimi količinami enostavnih sladkorjev v raziskavi Mercier in Lindow (2000), ki sta določila količine skupnih sladkorjev in količine glukoze na fižolovem listu. V študiji so določili okoli 2,5 µg skupnih sladkorjev in okoli 1,4 µg glukoze na površini enega grama listov fižola. Prevladujoči sladkorji na listih so bili glukoza, fruktoza in saharoza. Teh rezultatov neposredno z našimi ne moremo primerjati, saj gre za sladkorje na drugi rastlini, so pa uporabili podobno metodo odstranjevanja sladkorjev z listne površine kot v naši raziskavi. Če pretvorimo naše dobljene vrednosti (ob upoštevanju, da ima solatni list površine 10 cm² približno maso 1 g in predpostavki, da so spirali liste z enako količino vode 100 ml ddH₂O/200 ±10 cm², smo na površini solatnih listov določili 14 ± 7 µg/g (INT3) in 29 ± 18 µg/g (KON4) glukoze, kar je mnogo več kot na površini fižolovih listov. Kot slabost pri metodi, ki sta jo uporabila Mercier in Lindow (2000), je potapljanje celotnih listov v vodo, kar lahko privede do lažno pozitivnih rezultatov, saj na delih, kjer je list odrezan, lahko iztekajo hranila (tudi enostavni sladkorji) iz notranjosti v vodo. Rastlina pa običajno vsebuje več sladkorjev v notranjih tkivih listov, kot na sami površini (Mercier in Lindow, 2000; Lopez in sod., 2014), kar so pokazali tudi rezultati naših analiz (Preglednici 15 in 16). Brandl in Amunson (2008) pa sta določala celokupno vsebnost sladkorjev v izpirku solate. Največ sladkorjev so na površini vsebovali notranji (mlajši) listi, najmanj pa

zunanji (starejši) listi. Sredinski listi so na površini vsebovali 61 μg sladkorjev/g lista, kar je nekako primerljivo z našo analizo. Če predpostavljamo, da saharoza, fruktoza in glukoza predstavljajo večinski del sladkorjev potem je v našem primeru povprečna vsota določenih sladkorjev 65,1 $\mu\text{g/g}$ lista (INT3) in 88,1 $\mu\text{g/g}$ lista (KON4). Brandl in Amunson (2008) sta dokazala da je na površini notranjih listov večja vsebnost celokupnih sladkorjev in sicer v povprečju 89 $\mu\text{g/g}$ lista, na zunanjih listih pa le 30 $\mu\text{g/g}$ lista. Kakor pri naših preiskavah, tudi Brandl in Amundson (2008) poročata o večji variabilnosti vsebnosti sladkorjev, saj so le-ti heterogeno razporejeni na posameznem listu in med posameznimi listi iste solatne glave.

4.4.3 Nitratni dušik in amonijev dušik na površini zelene solate

Na površini solate smo določili tudi v vodi topne dušikove snovi. V izpirku solate smo določili vsebnost nitratnega dušika in amonijevega dušika. Dušik je eden pomembnejših elementov v prehrani rastlin. Rastline sprejemajo dušik v obliki nitratnega (NO_3^-) ali amonijevega (NH_4^+) iona (Kmecl, 2017). Amonijev ali nitratni dušik predstavljata ugoden vir ogljika za rast bakterij.

Pri določanju nitratnega dušika na površini solate KON4, smo določili 0,019 mg nitratnega dušika/100 $\pm$ 5 cm^2 površine solate. Določali smo tudi vsebnost amonijevega dušika na površini zelene solate, katerega vsebnost je znašala 0,003 mg/100 $\pm$ 5 cm^2 površine solate.

Prisotni nitratni dušik in amonijev dušik na površini zelene solate kažeta na to, da imajo bakterije na površini solate na voljo poleg virov ogljika (npr. glukoza, fruktoza, saharoza) tudi dušikove snovi, kot sta amonijev dušik in nitratni dušik, ki lahko za bakterije predstavljata uporaben vir dušika. Bren in sod. (2016) navajajo, da je za bakterije vrste *E. coli* najboljši vir dušika amonijak (NH_3). Bakterije pa lahko, vendar bolj počasi rastejo tudi na drugih virih dušika, ki vsebujejo več aminokislin. Brandl in Amundson (2008) sta v izpirkih solatnih listov tudi določila celokupno vsebnost elementarnega dušika. Na sredinskih listih so določili več elementarnega dušika kot na zunanjih, starejših listih. Največ dušika pa sta določila na notranjih, najmlajših listih. V sredinskih listih sta določila 0,782 μg dušika/g lista, v zunanjih listih 0,708 μg dušika/g lista, v notranjih pa 2,290 μg dušika/g lista. Če naše rezultate pretvorimo, dobimo približno 1,9 μg nitratnega dušika/g lista in približno 0,3 μg amonijevega dušika/g lista. V našem poskusu smo izbirali sredinske, nepoškodovane liste in smo določili večje vrednosti dušika kot Brandl in Amundson (2008) na sredinskih listih. Vzrok za večje vsebnosti nitratov je lahko tudi drugačno oz. večje gnojenje solate med pridelavo.

Organske in anorganske snovi lahko prehajajo na površino rastlin in služijo kot hranila za bakterije (Morris in Lucotte, 1993). Bakterije ob prisotnosti hranil lahko rastejo in se glede na rezultate naše raziskave tudi dobro adherirajo. Na površino solatnih listov lahko hranilne snovi izhajajo z gutacijo (izločanje tekočine, predvsem vode skozi liste) (Curtis, 1943). Gutacijske tekočine poleg vode vsebujejo tudi številne snovi, kot so ogljikovi hidrati, aminokisline, anorganske snovi, vključno z znatnimi vsebnostmi NH_4^+ in NO_3^- . Poleg gutacije pa dušik lahko pride na površine solatnih listov direktno pri gnojenju, kjer se uporabljajo z dušikom bogata gnojila. Brandl in Amundson (2008) sta dodala vir dušika v izpirek solatnih listov. Ugotovila sta, da je prišlo do večje rasti bakterij vrste *E. coli* O157:H7 v izpirku z dodanim dušikom (10 mmol NH_4Cl), kot v izpirku brez dodanega dušika. Po 20-urni inkubaciji pri 28 °C v plastičnih vrečkah, se je število bakterij vrste *E. coli* ($N_0 = 10^4$ cfu/ml) povečalo na 8,1 log cfu/ml ob dodatku vira dušika, kjer pa dušika nista dodala pa je število bakterij znašalo 6,9 log cfu/ml ($P < 0,05$). Prav tako pa sta vir dušika (6 mmol NH_4NO_3) dodala v inokulum bakterij, s katerimi sta inokulirala sredinske solatne liste. V dveh ponovitvah eksperimenta je bila večja rast bakterij na solati ob dodatku vira dušika glede na kontrolo. Ob dodatku dušika se je bakterijska populacija povečala na 5,5 log cfu/g, pri kontroli (brez dušika) pa le na 4,7 log cfu/g ($P < 0,05$).

Amonijev dušik predstavlja makro-nutrient, ki se uporablja za sintezo sestavin bakterijske biomase, vključno z beljakovinami, RNA in DNA (Folsom in Carlson, 2015). Sklepamo lahko, da je dušik na listni površini pomemben element, ki vpliva na rast bakterij vrste *E. coli*. V primeru rasti bakterij na solatni površini pa je smiselno govoriti tudi o adheziji, saj se bakterije ko so prisotne na listni površini nanjo tudi dobro adherirajo.

5 SKLEPI

Glede na opravljeno raziskovalno delo lahko zaključimo:

Sklep 1: Skupno število bakterij na solati je bilo odvisno od: časa skladiščenja (daljši čas - večje število), temperature (višja temperatura - večje število), in spiranja (spiranje - manjše število).

Sklep 2: V vzorcih zelene solate ni bilo naravno prisotnih bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.

Sklep 3: Adhezija bakterij vrste *E. coli* na solatni list je bila odvisna od: vrste prisotnih bakterij (večja adhezija pri bakterij vrste *E. coli* kot pri bakterijah vrste *L. monocytogenes*.), začetnega števila (večja adhezija pri višjem številu) in pranja solatnega lista z vodo (večja adhezija na nespranem solatnem listu)

Sklep 4: Vsebnost enostavnih sladkorjev (glukoze, fruktoze in saharoze) v solatnem listu se je tekom skladiščenja solate zmanjševala.

Sklep 5: Enostavni sladkorji in dušikove spojine na površini solatnega lista omogočajo rast in adhezijo bakterij vrste *E. coli*.

6 POVZETEK

V zadnjem času je veliko izbruhov obolenj s patogenimi bakterijami povezanih z uživanjem kontaminirane zelenjave. Zelenjavo se ponavadi uživa surovo, zato je v tem primeru zelo pomembno upoštevanje dobre proizvodne prakse in ustreznega rokovanja "od vil do vilic", da ohranimo ustrezno mikrobiološko varnost. Magistrsko delo temelji na študiju rasti in adhezije dveh najpogostejše omejenih patogenih bakterij, bakterij vrste *E. coli* in *L. monocytogenes* na zeleni solati (*Lactuca sativa* L.), kjer imajo omenjene bakterije ugodne razmere za rast.

V mikrobiološkem delu naloge smo raziskali, kaj se dogaja z bakterijami tekom skladiščenja solate. Solato ($n = 3$) smo kontaminirali z bakterijami vrste *L. monocytogenes* ($N_0 = 10^6$ cfu/ml), po skladiščenju solate pri 12 °C je znašalo število adheriranih bakterij $4,33 \pm 0,11$ log cfu/g po 1-dnevnom skladiščenju, po 9 dneh pa se je število povečalo na $5,31 \pm 0,15$ log cfu/g, podoben trend se kaže pri kontaminaciji solate z bakterijami vrste *E. coli*, kjer je bilo po 1 dnevu $5,10 \pm 0,04$ log cfu/g adheriranih bakterij, po 12 dneh pa kar $6,46 \pm 0,07$ log cfu/g. Adhezijo bakterij vrste *E. coli* smo določali tudi v mikrotiterski plošči ($n = 32$). V gojišču TSB se je adheriralo največ bakterij ($\Delta\bar{A}_{584nm} = 0,094 \pm 0,040$), sledila je adhezija v modelnem gojišču 2 ($\Delta\bar{A}_{584nm} = 0,083 \pm 0,015$) ter adhezija v modelnem gojišču 1 ($\Delta\bar{A}_{584nm} = 0,052 \pm 0,007$). Tudi v solatnem izpirku so se bakterije adherirale ($\Delta\bar{A}_{584nm} = 0,00022 \pm 0,004$). Adhezijo bakterij vrste *E. coli* smo preverjali tudi na različno pripravljenih površinah solate ($n = 3$) tekom 7-dnevnega skladiščenja pri 12 °C. Rezultati so pokazali, da se je na neoprano solato se je adheriralo največ bakterij, sledi neoprana solata z dodatkom nizkih koncentracij sladkorja, najmanj bakterij pa se je adheriralo na oprano solato ter na oprano solato z dodano nizko koncentracijo sladkorja (5 mg/l glukoze in 5 mg/l fruktoze). Ugotovili smo tudi, da pranje solate (10 min, 5 l H₂O) pred kontaminacijo (10^6 cfu/ml) vpliva na manjšo adhezijo bakterij vrste *E. coli* po 7-dnevnom skladiščenju solate ($n = 3$) pri 12 °C v temi. S predhodnim pranjem solate izperemo v vodi topne hranilne snovi (enostavne sladkorje, nitrato in amonij), kar vpliva na manjšo stopnjo rasti in adhezije. Po 1 dnevu smo na neoprani solati določili $5,10 \pm 0,04$ log cfu/g, na oprani solati pa $4,66 \pm 0,03$ log cfu/g ($P = 0,00054$). Po 7 dneh smo na oprani solati določili $6,18 \pm 0,02$ log cfu/g, na neoprani solati pa $6,40 \pm 0,07$ log cfu/g adheriranih bakterij vrste *E. coli* ($P = 0,016$). Poleg adhezije smo raziskali tudi samo rast bakterij vrste *E. coli* v solatnem izpirku, poleg tega pa smo rast določali tudi v modelnem gojišču 1 in modelnem gojišču 2, ter gojišču TSB. V gojišču TSB pride do dokaj idealne in dobre rasti, saj se začetna koncentracija bakterij iz $5,42 \pm 0,01$ cfu/ml po 48 urah pri 37 °C, poveča na $9,34 \pm 0,01$ cfu/ml. Bakterije pa dobro rastejo tudi v solatnem izpirku, saj se začetna koncentracija 5,35 cfu/ml poveča po 2 dneh na $7,15 \pm 0,03$ cfu/ml ($P = 0,00024$). Rezultati rasti kažejo da je solatni izpirek dober medij za rast bakterij vrste *E. coli*.

S HPLC smo določili enostavne sladkorje v zeleni solati tekom skladiščenja pri 12 °C. Tudi sladkorje v notranjosti lahko bakterije izkoriščajo, saj so znani dokazi prehajanja (listne reže, poškodbe listov) in preživetja bakterij v notranjih tkivih solatnih listov. Vsi določani enostavni sladkorji se tekom skladiščenja solate v vrečki zmanjšujejo, fruktoza se je $0,71 \pm 0,08$ g/100 g po 2 dneh, po 9 dneh zmanjšala na $0,36 \pm 0,15$ g/100g; zmanjšala se je tudi glukoza $0,55 \pm 0,10$ g/100g (2 dni) in $0,27 \pm 0,10$ g/100g (9 dni) in saharoza $0,19 \pm 0,04$ g/100g (2 dni) in $0,08 \pm 0,06$ g/100g (9 dni). Na zniževanje sladkorjev solate verjetno vpliva predvsem metabolizem solate tekom skladiščenja v temi. Večina bakterij pa lahko direktno izkorišča enostavne sladkorje in dušikove spojine na površini solatnega lista. Analize površine solate so pokazale prisotnost enostavnih sladkorjev (glukoze, fruktoze in saharoze) in dušikovih spojin (amonijev dušik in nitratni dušik), katere lahko bakterije izkoriščajo za svojo rast. Na sveži solati smo z GC določili enostavne vodotopne sladkorje na površini sveže solate ($n = 6$). Povprečna vrednost fruktoze je znašala $0,121 \pm 0,086$ mg/ 100 ± 5 cm², glukoze je bilo $0,215 \pm 0,131$ mg/ 100 ± 5 cm², in saharoze $0,430 \pm 0,130$ mg/ 100 ± 5 cm². Med vzorci je velika standardna deviacija, kljub temu da smo izbirali le zdrave, sredinske, nepoškodovane in na videz podobne solatne liste ($P = 0,0026$). V solatnem izpirku smo določili tudi dušikove spojine, na površini solate smo določili $0,019$ mg nitratnega dušika/100 ± 5 cm² ter $0,003$ mg amonijevega dušika/100 ± 5 cm².

V našem delu smo se osredotočili na površino solatnih listov, veliko bolj pa so s hranili bogata notranja tkiva solate, kamor bakterije verjetno lahko prehajajo in se tam razmnožujejo - ustvarijo svoj habitat. S preprostim pranjem potrošnik lahko zmanjša število bakterij in nekatere hranilne snovi na površini zelene solate, bakterij v notranjosti pa zlahka ne more odstraniti. V prihodnje bi bilo dobro raziskati načine prehoda, prisotnost in rast bakterij v notranjosti rastlinskega tkiva. Pri sami adheziji na zunanjih listnih površinah pa bi bilo dobro določiti in podrobneje raziskati kompleksne mehanizme same adhezije patogenih bakterij in kako le-to uspešno preprečiti.

7 VIRI

- Abadias M., Usall J., Anguera M., Solsona C., Viñas I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 1–2: 121–129
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19–21
- Adamič Š. 1989. *Temelji biostatistike*. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za biomedicinsko informatiko: 195 str.
- Adams R. M., Moss M. O., McClure P. 2016. *Food microbiology*. 4th ed. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 546 str.
- Agüero M. V., Ponce A. G., Moreira M. R., Raura S. I. 2011. Lettuce quality loss under conditions that favor the wilting phenomenon. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 2: 124–131
- Asora-Finau K., Pele S., Nukuro A., Tagoai M., Hunter D. 2015. Analysis of microbiological risks for selected leafy green vegetable chains in Samoa. Technical report. Rome, Food and Agriculture Organisation: 15 str.
- Back K. H., Ha J. W., Kang D. H. 2014. Effect of hydrogen peroxide vapor treatment for inactivating *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *Food Control*, 44: 78–85
- Bae D., Seo K. S., Zang T., Wang C. 2013. Characterization of a potencial *Listeria monocytogenes* virulence factor associated with attachment to fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 22: 6855–6861
- Barbosa I. M., Costa Medeiros Y. A., Rimá de Oliveira K. A., Gomes-Neto N. J., Tavares J. F., Magnani M., Souza E. L. 2016. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. *Food Control*, 59: 468–477
- Beattie G. A., Lindow, S. E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum strategies. *Phytopathology*, 89, 5: 353–359
- Berger C. N., Shaw R. K., Brown D. J., Mather H., Clare S., Dougan G., Pallen M. J., Frankel G. 2009. Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *The ISME Journal*, 3, 2: 261–265
- Berger C. N., Sodha S. V., Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12, 9: 2385–2397

- Beuchat L. R., Farber J. M., Garrett E. H., Harris L. J., Parish M. E., Suslow T. V. 2001. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *Journal of Food Protection*, 64, 7: 1079–1084
- Beuchat L. R., 2006. Report from IAFP's rapid response symposium: fresh leafy greens-are they safe enough? *Food Protection Trends*, 26: 942–944
- Blair K. M., Turner L., Winkelman J. T., Berg H. C., Kearns D. B. 2008. A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science*, 320, 5883: 1636–1638
- Botticella G., Russo P. 2013. *Listeria monocytogenes*, biofilm formation and fresh cut produce. V: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Méndez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Formatex Research Center: 114–123
- Boyer R. 2002. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Boyer R. R., Sumner S.S., Williams R.C., Pierson M.D., Popham D.L., Kniel K.E. 2007. Influence of curli expression by *Escherichia coli* 0157:H7 on the cell's overall hydrophobicity, charge, and ability to attach to lettuce. *Journal of Food Protection*, 70, 6: 1339–1345
- Brandl M. T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 367–392
- Brandl M. T., Mandrell R.E. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 7: 3614–3621
- Brandl M. T., Amundson R. 2008. Leaf age as a risk factor in contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8: 2298–2306
- Bren A., Park J. O., Towbin B. D., Dekel E., Rabinowitz J. D., Alon U. 2016. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor N – sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Report*, 6: e2484, doi: 10.1038/srep24834: 10 str.
- Carpentier B., Cerf O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 6: 499–511
- Carrasco E., Perez-Rodriguez F., Valero A., Garcia-Gimeno R. M., Zurera G. 2008. Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Control*, 19, 5: 487–494
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 5418: 1318–1322
- Curtis L. C. 1943. Deleterious effects of guttated fluids on foliage. *American Journal of Botany*, 30, 10: 778–782

- Das T., Sharma P. K., Busscher J. H., Van der Mei H. C., Krom B. P. 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 10: 3405–3408
- Delaquis P., Bach S., Dinu L. D. 2007. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *Journal of Food Protection*, 70, 8: 1966–1974
- Domenech E., Botella S., Ferrus M. A., Escriche I. 2013. The role of the consumer in the reduction of *Listeria monocytogenes* in lettuces by washing at home. *Food Control*, 29, 1: 98–102
- Doyle M. P., Erickson M. C. 2008. Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2: 317–330
- Dunne W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2: 155–166
- EFSA, ECDC. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14, 12: e4634, doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634: 231 str.
- Ells T. C., Hansen L. T. 2006. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp. Attachment to intact and cut cabbage. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 2006: 34–42
- Folsom J. P., Carlson R. P. 2015. Physiological, biomass elemental composition and proteomic analyses of *Escherichia coli* ammonium-limited chemostat growth, and comparison with iron- and glucose-limited chemostat growth. *Microbiology*, 161, 8: 1659–1670
- Franz E., Tromp S. O., Rijgersberg H., van der Fels-Klerx H. J. 2010. Quantitative microbial risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in leafy green vegetables consumed at salad bars. *Journal of Food Protection*, 73, 2: 274–285
- Gehring G. A., Albin D. M., Bhunia K. A., Kim H., Reed, S. A., Tu S. I. 2012. Mixed culture enrichment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Yersinia enterocolitica*. *Food Control*, 26, 2: 269–273
- Germendia J., Frankel G., Crepin V. F. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infection and Immunity*, 73, 5: 2573–2585
- Goatley J. L., Lewis R. W. 1966. Composition of guttation fluid from rye, wheat, and barley seedlings. *Plant Physiology*, 41, 3: 373–375
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Miller W. G., Sikora R. A., Lindow S.E. 2001. Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etil* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathology*, 91, 4: 415–422
- Hassan A. N., Frank J. F. 2003. Influence of surfactant hydrophobicity on the detachment of *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 1–2: 145–152

- Hord G. N., Tang Y., Bryan N. S. 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 1: 1–10
- Islam M., Doyle M. P., Pharak S. C., Millner P., Jiang S. 2004. Persistence of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 in soil and leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection*, 67, 7: 1365–1370
- ISO 4831. Microbiology – General guidance for the enumeration of coliform – most probable number technique. 1991: 11 str.
- ISO 4833. Microbiology – General guidance for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C. 2002: 4 str.
- ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions of microbiological examination. 1999: 5 str.
- ISO 7954. Microbiology – General guidance for the enumeration of yeast and moulds – Colony count technique at 25 °C. 1987: 3 str.
- ISO 11290. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. 1996: 16 str.
- ISO 11732. Water quality – determination of ammonium nitrogen by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection. 1997: 18 str.
- ISO 13395. Water quality – determination of nitrite nitrogen and nitrate nitrogen and the sum of both by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection. 1996: 18 str.
- Jameson J. E. 1962. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *Journal of Hygiene*, 60: 193–207
- Jeddi M. Z., Yunesian M., Gorji M. E., Noori N., Pourmand M. R., Khaniki G. R. J. 2014. Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 32, 3: 391–399
- Jefferson K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236, 2: 163–173
- Karamanoli K., Thalassinou G., Karpouzas D., Bosabalidis A. M., Vokou D., Constantinidou H. I. 2012. Are leaf glandular trichomes of oregano hospitable habitats for bacterial growth? *Journal of Chemical Ecology*, 38, 5: 476–485
- Kawashima L. M., Soares L. M. V. 2003. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 5: 605–611
- Kmecl V. 2017. Mineralne oblike dušika. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 1 str.
http://www.kis.si/Mineralne_oblike_dusika/ (26. jun. 2017)
- Knutton S. 1995. Electron microscopical methods in adhesion. *Methods in Enzymology*, 253: 145–158

- Kokare C. R., Chakraborty S., Khopade A.N. 2009. Biofilm: importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 2: 159–168
- Konstantopoulou E., Kapotis G., Salachas G., Pteropoulos S. A., Karapanos I.C., Passam H.C. 2010. Nutritional quality of greenhouse lettuce at harvest and after storage in relation to N application and cultivation season. *Scientia Horticulturae*, 125, 2: 1–5
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. dopolnjena izd.. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni.lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (23. dec. 2016)
- Kristkova E., Doležalova I., Lebeda A., Vinter V., Novotna A. 2008. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Horticultural Science*, 35, 3: 113–129
- Kroupitski Y., Pinto R., Belausov E., Sela S. 2011. Distribution of *Salmonella typhimurium* in romaine lettuce leaves. *Food Microbiology*, 28, 5: 990–997
- Lapidot A., Römling U., Yaron S. 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 3: 229–233
- Laus M. C., Van Brussel A. A., Kijne J. W. 2005. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Molecular Plant – Microbe Interactions*, 18, 6: 533–538
- Leveau J. H., Lindow S. E. 2001. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6: 3446–3453
- Liao C. H., Fett W. F. 2001. Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*, 64, 8: 1110–1115
- Li-Cohen A. E., Bruhn C. M. 2002. Safety for consumer handling of fresh produce from time to purchase to the plate: a comprehensive consumer survey. *Journal of Food Protection*, 65, 8: 1287–1296
- Lima M. P., Sao Jose J. F. B., Andrade N. J., Pires A. C. S., Ferreira S. O. 2013. Interaction between natural microbiota and physicochemical characteristics of lettuce surfaces can influence the attachment of *Salmonella* Enteritidis. *Food Control*, 30, 1: 157–161
- Lindow S. E., Brandl M. T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4: 1875–1883
- Lopez A., Garcia-Alonso J., Fenoll J., Hellin P., Flores P. 2014. Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 1: 39–48

- Macarisin D., Patel J., Bauchan G., Giron J. A., Ravishankar S. 2013. Effect of spinach cultivar and bacterial adherence factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7 on spinach leaves. *Journal of Food Protection*, 76, 11: 1829–1837
- Matthews K. R. 2006. *Microbiology of fresh produce*. Washington, ASM Press: 239 str.
- Mbong M. B. V., Ampofo-Asiama J., Hertog L. A. T. M. M., Greeraerd A. H., Nicolai M. B. 2017. The effect of temperature on the metabolic response of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*, (L), Laterr.) cells to sugar starvation. *Postharvest Biology and Technology*, 125: 1–12
- Mellefont L. A., McMeekin T. A., Ross T. 2008. Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 2008: 157–168
- Mercier J., Lindow S. E. 2000. Role of leaf sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 369–374
- Miller W. G., Brandl M. T., Quiñones B., Lindow S. E. 2001. Biological sensor for sucrose availability: relative sensitivities of various reporter genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3: 1308–1317
- Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaioli S., Campoccia D., Speziale P., Arciola C. R. 2011. Extracellular DNA in biofilms. *The International Journal of Artificial Organs*, 34, 9: 824–831
- Morris C. E., Lucotte T. 1993. Dynamics and variability of bacterial population density on leaves of field-grown endive destined for ready-to-use processing. *International Journal of Food Science and Technology*, 28, 2: 201–209
- Mou B. 2012. Nutritional quality of lettuce. *Current Nutrition & Food Science*, 8, 3: 177–187
- Nastou A., Rhoades J., Smirniotis P., Makri I., Kontominas M., Likotrafiti E. 2012. Efficacy of household washing treatments for the control of *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 3: 247–253
- Olmez H., Temur S. D. 2010. Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 6: 964–970
- Oliveira M., Usall J., Viñas I., Solsona C., Abadias M. 2010. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27, 5: 679–684
- Oliveira M., Usall J., Viñas I., Solsona C., Abadias M. 2011. Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. *Food Microbiology*, 28, 3: 590–596
- Patel J., Sharma M. 2010. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 1–2: 41–47

- Patel J., Sharma M., Ravishakar S. 2011. Effect of curli expression and hydrophobicity of *Escherichia coli* O157:H7 on attachment to fresh produce. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 3: 737–745
- Perera M. N., Abuladze T., Li M., Woolston J., Sulakvelidze A. 2015. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiology*, 52, 2015: 42–48
- Pinto E., Almeida A., Aguiar A., Ferreira I. 2013. Changes in macrominerals, trace elements and pigment content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: influence of soil composition. *Food Chemistry*, 152, 1: 603–611
- Rastogi G., Sbodio A., Tech J. J., Suslow T. V., Coaker G. L., Leveau J. H. J. 2012. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *The ISME Journal*, 2012, 6: 1812–1822
- Reina L. D., Fleming H. P., Bredit Jr. F. 2002. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. *Journal of Food Protection*, 65, 12: 1881–1887
- Rivas L., Dykes G. A., Fegan N. 2007. A comparative study of biofilm formation by Shiga toxinogenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 1: 44–51
- Rodríguez-Caturla M. Y., Valero A., García-Gimeno R. M., Zurera G. 2012. Development of a risk-based methodology for estimating survival and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* on iceberg-lettuce exposed at short-term storage in foodservice centers. *Journal of Microbiological Methods*, 90, 3: 273–279
- Rumeza H., Zafar I., Mudassar I., Shaheena H., Masooma Rasheed. 2006. Use of vegetables as nutritional food: role in human health. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1, 1: 18–22
- Saggers E. J., Waspe C. R., Parker M. L., Waldron K. W., Brocklehurst T. F. 2008. *Salmonella* must be viable in order to attach to the surface of prepared vegetable tissues. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 5: 1239–1245
- Sagoo S. K., Little C. L., Ward L., Gillespie I. A., Mitchell R. T. 2003. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishment uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, 66, 3: 403–409
- Sagong H. G., Lee S. Y., Chang P. S., Heu S., Ryu S., Choi Y. J., Kang D. H. 2011. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1: 287–292
- Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1: 10–17

- Seo K. H., Frank J. F. 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *Journal of Food Protection*, 62, 1: 3–9
- Shaw R. K., Berger C. N., Feys B., Knutton S., Pallen M. J., Frankel G. 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits EspA filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 9: 2908–2914
- Shaw R. K., Berger C. N., Pallen M. J., Sjöling A., Frankel G. 2011. Flagella mediate attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to fresh salad leaves. *Environmental Microbiology Reports*, 3, 1: 112–117
- Shirron N., Yaron S. 2011. Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella* Typhimurium. *PloS ONE*, 6, 4: e18855, doi: 10.1371/journal.pone.0018855: 12 str.
- Solomon B. E., Brandl M. T., Mandrell R. E. 2006. Biology of foodborne pathogens on produce. V: *Microbiology of fresh produce*. Matthews K. R. (ed.). Washington, AMS Press: 55–83
- Stopar D. 2007. Priročnik iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 430 str.
- Tan M. S., Wang Y., Dykes G. A. 2013. Attachment of bacterial pathogens to a bacterial cellulose-derived plant cell wall model: a proof of concept. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, 11: 992–994
- Toledo M. E. A., Ueda Y., Imahori Y., Ayaki M. 2003. L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biology and Technology*, 28, 1: 47–57
- Torres A. G., Jeter C., Langley W., Matthyse A. G. 2005. Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8008–8015
- Tournas V. H. 2005. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 1: 71–77
- Trdan K. 2015. Mikrobiološka kakovost in varnost zelene solate (*Lactuca sativa* L.). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 55 str.
- Tukey H. B. 1970. The leaching of substances from plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 21: 305–324
- Ukuku D. O., Fett W. F. 2002. Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. *Journal of Food Protection*, 65, 7: 1093–1099
- Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila. 2005. Uradni list Evropske unije, 48, L338: 1–26
- Van Tassell M. L., Angela D. M., Kim J. S., Miller M.J. 2016. Creative lysins: *Listeria* and the engineering of antimicrobial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 37: 88–96

- Wang H., Feng H., Liang W., Luo Y., Malyarchuk V. 2009. Effect of surface roughness on retention and removal of *Escherichia coli* O157:H7 on surfaces of selected fruits. *Journal of Food Science*, 74, 1: 8–15
- Wei H., Wolf G., Hammes W. P. 2006. Indigenous microorganisms from iceberg lettuce with adherence and antagonistic potential for use as protective culture. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 7, 4: 294–301
- Watnick P., Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 10: 2675–2679
- Xicohtencatl-Cortes J., Sánchez Chacón E., Saldaña Z., Freer E., Girón J. A. 2009. Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *Journal of Food Protection*, 72, 7: 1531–1537.
- Yaron S. 2014. Microbial attachment and persistence in plants. V: The produce contamination problem: causes and solutions. 2nd ed. Matthews K. R., Sapers G.M., Gerba C.P. (eds.). Amsterdam, Elsevier/Academic press: 21–58
- Yaron S., Römling U. 2014. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology*, 7, 6: 496–516

ZAHVALA

Iskreno se zahvalujem mentorici prof dr. Barbki Jeršek za vodenje, vse nasvete in pomoč pri eksperimentalnem in teoretičnem delu ter za strokoven in hiter pregled celotne naloge. Hvala tudi za vso pomoč, vodenje in zaupanje tekom celotnega študija.

Zahvala gre tudi somentorju prof dr. Rajku Vidrihu za natančen, hiter pregled naloge in vse napotke ter za priskrbljene vzorce za izvedbo eksperimentalnega dela. Recenzentki prof. dr. Nini Kacjan Maršič se zahvaljujem za hiter in natančen pregled.

Zahvala tudi dr. Emilu Zlatiču za vse napotke in pomoč pri izvedbi kemijskih analiz ter Mii Ličen za pomoč pri izvedbi mikrobioloških preiskav.

Hvala Barbari Slemenik za natančen pregled naloge.

Za spodbudo in zaupanje se zahvaljujem svojim staršem in babici, ki so mi tekom celotnega študija stali ob strani in me podpirali. Zahvala tudi bratoma Juretu in Roku za vzpodbudo.

Kolegom in prijateljem, s katerimi smo skupaj preživljali študijska leta - najlepše trenutke naše mladosti.