

# MIKROBIOLOŠKO KVARENJE VOĆNIH SOKOVA IZ KONVENCIONALNE I EKOLOŠKE PROIZVODNJE

---

**Košuta, Chiara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:535797>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Chiara Košuta

MIKROBIOLOŠKO KVARENJE VOĆNIH SOKOVA  
IZ KONVENCIONALNE I EKOLOŠKE PROIZVODNJE

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Chiara Košuta

MIKROBIOLOŠKO KVARENJE VOĆNIH SOKOVA  
IZ KONVENCIONALNE I EKOLOŠKE PROIZVODNJE

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing.

Komentor: Dr.sc. Valentina Marečić, mag. sanit. ing.

Diplomski rad obranjen je dana 5. 7. 2022. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Darinka Vučković, dr. med.
2. Doc. dr. sc. Mateja Ožanič, dipl. sanit. ing.
3. Izv. prof. dr. sc. Marin Tota, mr. ph.

Rad ima 50 stranica, 13 slika, 4 tablice, 47 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

Prvenstveno, zahvaljujem se mojoj mentorici doc. dr. sc. Mateji Ožanič, dipl. sanit. ing. na nesebičnoj pomoći, strpljenju te pristupačnosti i komentorici dr. sc. Valentini Marečić, mag. sanit. ing. na podršci te stručnim savjetima koje su mi prenijele tijekom izvedbe i pisanja diplomskog rada.

Također zahvaljujem se osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju na Medicinskom fakultetu na omogućenim materijalima i pomoći tijekom izvedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Na kraju, zahvaljujem se mojim roditeljima, sestri, rodbini te prijateljima na pruženoj ljubavi, podršci te razumijevanju tijekom cijelog mog obrazovanja.

## SAŽETAK

Kvarenje hrane je svaka promjena u hrani kojom se ona pretvara iz zdravstveno ispravne u neprihvatljivu te opasnu za čovjeka. Usljed rasta i razmnožavanja mikroorganizama u hrani dolazi do promjene boje, mirisa, okusa i sastava hrane. Cilj ovog istraživanja, koje je provedeno u svrhu diplomskog rada, bio je ispitati mikrobiološku ispravnost četiri uzorka voćnih sokova ispravnog roka trajanja. Prvi uzorak je voćni sok miješanog voća iz koncentriranog soka sa sladilima obogaćen vitaminima iz konvencionalne proizvodnje. Drugi uzorak je sok multivitamin ekološke proizvodnje. Treći uzorak voćnog soka predstavlja sok od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100% iz konvencionalne proizvodnje, dok je četvrti uzorak voćnog soka organski sok od jabuke iz ekološke proizvodnje. U svim uzorcima ispitivana je prisutnost ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Enterococcus* te prisutnost kvasaca i plijesni. S obzirom da niti u jednom uzorku nije došlo do pozitivnog porasta ovih mikroorganizama, zaključeno je da su ispitivani uzorci mikrobiološki ispravni. Nakon što je dokazana mikrobiološka ispravnost voćnih sokova, cilj je bio odrediti kinetiku rasta *S. aureus*, soj ATCC 29213 *S. aureus*, odnosno bakterije *E. coli*, soj ATCC 25922. Kinetika rasta ispitivana je pri tri različite temperature (4 °C, 25 °C, 37 °C) tijekom vremenskog razdoblja od dvanaest dana, a broj bakterija određivan je trećeg, sedmog, devetog te dvanaestog dana od dodatka bakterija u voćne sokove. Baird Parker je podloga korištena je za određivanje broja bakterija *S. aureus*, dok je TBX agar podloga na kojoj rastu bakterije *E. coli*. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su svi ispitani uzorci voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje mikrobiološki ispravni te da bakterije *E. coli* pokazuju bolju sposobnost preživljavanja u voćnim sokovima u odnosu na *S. aureus*. Bakterije *S. aureus* imaju sposobnost preživljavanja u voćnom soku multivitamin ekološke proizvodnje pri 4 °C, 25 °C i 37 °C. Dokazano je da bakterije *E. coli* preživljavaju u uzorku voćnog soka mješovitog voća multivitamin ekološkog podrijetla pri 4 °C te 25 °C i uzorcima sokova od jabuke konvencionalne i ekološke proizvodnje pri 4 °C te 25 °C. Nadalje, dokazano je da bakterije *S. aureus* i *E. coli* nemaju sposobnost rasta i razmnožavanja u uzorcima voćnih sokova koji su korišteni tijekom istraživanja.

Ključne riječi: *S. aureus*, *E. coli*, voćni sokovi, kinetika rasta, mikrobiološka ispravnost

## SUMMARY

Food spoilage is considered as a change in food that turns it from healthy to unacceptable and dangerous for humans. Growth and replication of microorganisms in food could lead to changes in color, smell, taste and composition of food. The aim of this research, which was conducted for the purpose of the master thesis, was to examine the microbiological correctness of four samples of fruit juices. The first sample is fruit juice of mixed fruit composed of concentrated juice with sugars and sweeteners enriched with vitamins from conventional production. The second sample is multivitamin juice of organic production. The third sample of fruit juice is an apple juice made from concentrated apple juice with a 100% fruit content from conventional production, while the fourth sample of fruit juice is an apple juice from organic production. The presence of total aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Enterococcus* and yeasts and molds was examined in all samples. All samples were negative for tested microorganisms, so we concluded that the tested samples are microbiologically correct. Further, the aim was to analyse the growth kinetics of *S. aureus* and *E. coli* in all juice samples. Growth kinetics were tested at three different temperatures (4 °C, 25 °C, 37 °C) over a period of twelve days, and the number of bacteria was determined on the third, seventh, ninth and twelfth day from the addition of bacteria to fruit juices. Baird Parker is the medium used to determine the number of *S. aureus*, while TBX agar is the selective medium for *E. coli* determination. All together, the results of this study showed that all tested samples of fruit juices from conventional and organic production are microbiologically correct and that *E. coli* shows a better ability to survive in fruit juices compared to *S. aureus*. *S. aureus* has the ability to survive in fruit juice multivitamin from organic production at 4 °C, 25 °C and 37 °C. *E. coli* has been shown to survive in a sample of mixed fruit juice of multivitamin of organic origin at 4 °C and 25 °C and samples of apple juice of conventional and organic production at 4 °C and 25 °C. However, both *S. aureus* and *E. coli* showed no ability to grow and reproduce in fruit juice samples used during the study.

Keywords: *S. aureus*, *E. coli*, fruit juices, growth kinetics, microbiological correctness

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1 Voćni sok.....	1
1.2 Kvarenje hrane.....	4
1.2.1 Kvarenje biljnih proizvoda.....	4
1.3 Mikrobno kvarenje voća.....	4
1.3.1 Kvasci.....	5
1.3.2 Plijesni.....	6
1.3.3 Bakterije.....	7
1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
1.4.1 Trovanje hranom uzrokovano <i>S. aureus</i> .....	9
1.4.2 Utjecaj okolišnih uvjeta na rasta i razmnožavanje <i>S. aureus</i> .....	10
1.4.3 Antimikrobna rezistencija.....	10
1.5 <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.5.1 Sojevi <i>E. coli</i> .....	12
1.5.2 Utjecaj okolišnih uvjeta na rast i razmnožavanje <i>E. coli</i> .....	13
1.5.3 Antimikrobna rezistencija.....	14
1.6 Pravna regulativa vezana uz voćne sokove.....	14
1.6.1 Pravna regulativa vezana uz ekološke proizvode.....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	17
3. MATERIJALI I POSTUPCI.....	18
3.1 Uzorci voćnih sokova.....	18
3.2 Baird Parker agar.....	20
3.3 TBX agar.....	21
3.4 Mikrobiološka ispravnost voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje .....	22
3.5 Priprema bakterijske suspenzije.....	23
3.6 Inokulacija bakterija u uzorke voćnih sokova.....	24
3.7 Kinetika rasta bakterija u uzorcima voćnih sokova.....	24
3.8 Statistička obrada podataka.....	24
4. REZULTATI.....	25
4.1 Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti voćnih sokova.....	25



4.2 Kinetika rasta <i>S. aureus</i> u voćnim sokovima.....	26
4.3 Kinetika rasta <i>E. coli</i> u voćnim sokovima.....	32
5. RASPRAVA.....	39
6. ZAKLJUČAK.....	43
7. LITERATURA.....	44
8. ŽIVOTOPIS.....	50

## 1.UVOD

### 1.1 Voćni sok

Voćni sok je proizvod koji se proizvodi od jestivih dijelova voća koji moraju biti zdravi, svježiji ili konzervirani smravanjem ili hlađenjem jedne ili više vrsta voća. Voćni sok mora imati boju, aromu te okus koji je karakterističan za sok od onog voća od kojeg potječe. Prema Pravilniku o voćnim sokovima i njima sličnim proizvodima namijenjenim za konzumaciju (NN 48/2013), ako se sokovi proizvode iz voća koje sadrži koštice, sjemenke i koru, navedeni dijelovi ne smiju se nalaziti u voćnim sokovima (1).

Matični sok je poluproizvod koji se dobiva prešanjem svježeg odnosno zamrznutog voća, a sok se konzervira pasterizacijom te se primjenjuje u proizvodnji bistrih i mutnih sokova (2).

Voćni sokovi ubrajaju se u jednu od najznačajnijih preradivina od voća te se prema tehnološkom postupku dijele u bistre, mutne, kašaste te koncentrirane voćne sokove (2).

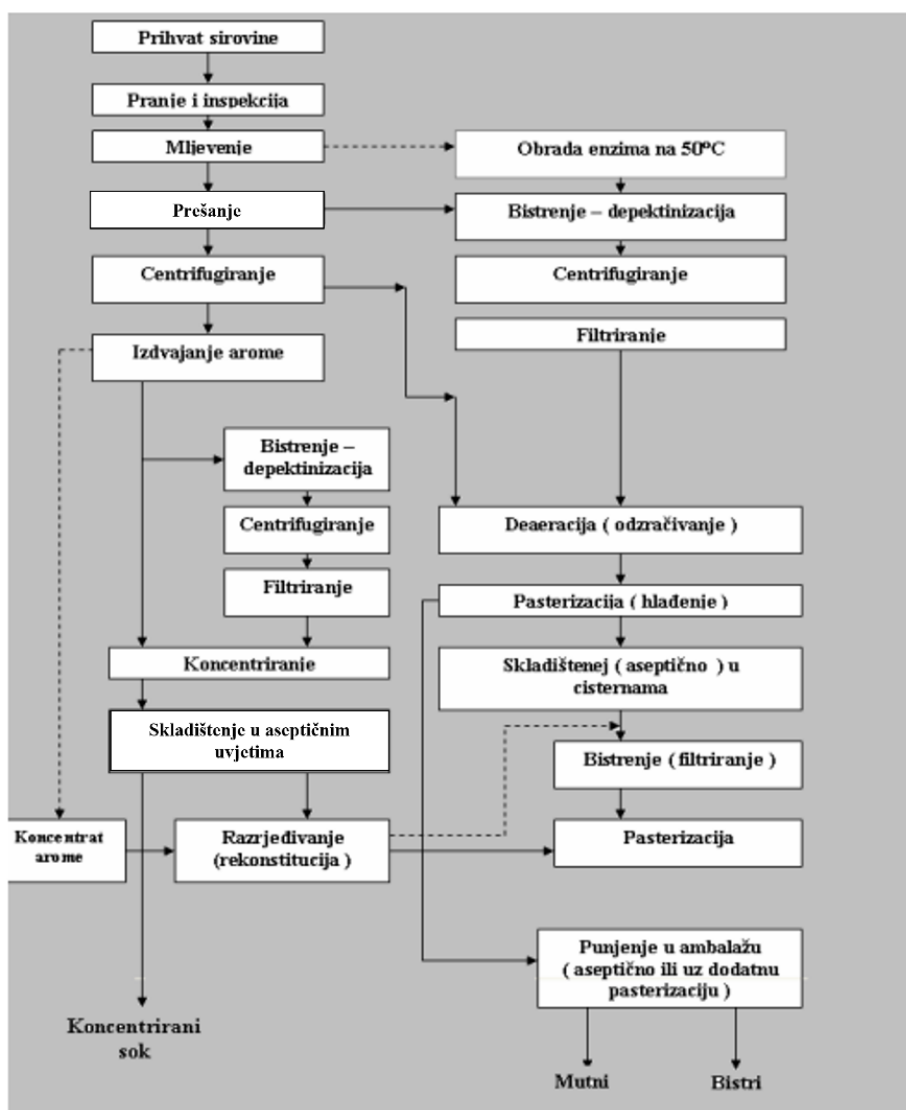
Bistri voćni sokovi dobivaju se cijedenjem ili difuzijom do faze dok se ne postigne stabilni bistri sok. Bistri voćni sokovi proizvode se iz različitih vrsta voća te je prije procesa proizvodnje potrebno odabrati one vrste voća koje su namijenjene za proizvodnju bistrog soka. Tehnološki postupak proizvodnje bistrih sokova obuhvaća procese prihvata voća, pranja, mljevenja, cijedenja, centrifugiranja, pasterizacije u pripreмноj fazi, bistrenja, filtriranja, deaeracije, pasterizacije te punjenja u ambalažu. S obzirom da se svaka vrsta voća razlikuje, procesi u tehnološkom postupku se razlikuju ovisno o vrsti voća pa stoga se tijekom procesa proizvodnje koristi različita oprema, namijenjana za određenu vrstu voća. Primjerice, za proces mljevenja jabučastog voća najčešće se koriste mlinovi tipa čekićara, dok se za proces mljevenja jagodastog voća koriste uređaji s valjcima. U pripreмноj fazi provodi se toplinska obrada pri temperaturi 85 °C s ciljem postizanja boljeg prešanja i za što potpuniji prijelaz boje te za kasniju stabilnost soka. Pasterizacija u pripreмноj fazi povezana je i s kasnijim uklanjanjem enzima. Nakon pasterizacije provodi se postupak bistrenja tj. depektinizacije sa svrhom uklanjanja čestica mutnoće kako bi se dobio bistri stabilan voćni sok. Bistrenje podrazumijeva obradu pektolitičkim, proteolitičkim te amilolitičkim enzimima i tako dobiveni bistri sok može se

koncentrirati i skladištiti. Daljnji procesi uključeni u proizvodnju bistrih voćnih sokova su: filtracija, deaeracija, pasterizacija te punjenje u ambalažu. Primjer bistrog soka je sok od jabuke (2,3).

Mutni voćni sokovi predstavljaju skupinu voćnih sokova između bistrih i kašastih sokova. U mutnom soku čestice se obično ne talože ili stvaraju minimalan talog te je promjer čestica manji nego kod čestica kašastog soka. Ova skupina voćnih sokova se najčešće dobiva iz citrusa voća kao što su naranča, limun te grejp. Postupak proizvodnje mutnih sokova razlikuje se od postupka u proizvodnji bistrih i kašastih sokova. Primjerice, razlike u postupku proizvodnje odnose se na način kojim se izdvaja sok iz ploda. Uslijed proizvodnje voćnih sokova na ovakav način, toplinska obrada se ne primjenjuje u početnoj fazi. U procesu proizvodnje mutnih sokova izostavljen je proces bistrenja, a krupne čestice se izdvajaju centrifugiranjem. Primjer mutnog soka je sok od naranče (2,3).

Proces proizvodnje kašastih sokova razlikuje se od procesa proizvodnje bistrih sokova. Međuproizvod u procesu proizvodnje je voćna kaša tj. netopljivi dijelovi mezokarpa ploda koji se dobivaju pasiranjem voća uz toplinsku obradu koja se provodi sa svrhom inaktivacije enzima i omekšavanja tkiva voća. Pripremljena voćna kaša može se sačuvati konzerviranjem na način da se voćna kaša pasterizira te čuva u aseptičnim uvjetima ili se voćna kaša smrzava u blokove i čuva pri -18 °C. Proizvodnja kašastih voćnih sokova obuhvaća procese prihvata voća, pranja, mljevenja, toplinske obrade, hlađenja, pasiranja, deaeracije kaše, pasterizacije kaše, hlađenja kaše, zamrzavanje kaše, skladištenje zamrznute kaše, odmrzavanje kaše, mješanja dobivene voćne kaše s vodom, šećerom, limunskom kiselinom, stabilizaciju pektinom ili alginatom, homogenizaciju, deaeraciju, pasterizaciju te punjenje u prikladnu ambalažu. Tijekom ovog proizvodnog procesa izostavljeni su procesi centrifugiranja, bistrenja i filtriranja. Primjer kašastog soka je sok od marelice (2,3).

Voćni sok od koncentriranog voćnog soka je proizvod koji se dobiva dodatkom one količine vode koja je bila izdvojena tijekom koncentriranja. Voćni sok od koncentriranog voćnog soka proizvodi se obradom koncentriranog voćnog soka s vodom za piće koja mora odgovarati propisanim kriterijima iz Pravilnika o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće. Tijekom navedenog procesa moraju se zadržati fizikalne, kemijske te senzorske karakteristike onog voća od kojega je voćni sok proizveden. Koncentrirani voćni sokovi se osim za proizvodnju gotovih voćnih sokova mogu koristiti i za proizvodnju voćnih želea te sirupa (1,3).



Slika 1. Shematski prikaz proizvodnje voćnih sokova

Preuzeto i prilagođeno s : Tehnička uputa [ Internet ] Sektor prerade voća i povrća , Sarajevo 2008. ; 10.5.2022. ; Dostupno na : [https://www.fmoit.gov.ba/upload/file/okolisne-dozvole/Prerada\\_voca\\_i\\_povrca.pdf](https://www.fmoit.gov.ba/upload/file/okolisne-dozvole/Prerada_voca_i_povrca.pdf)

## 1.2 Kvarenje hrane

Pojam kvarenje hrane predstavlja svaku promjenu u hrani kojom se ona pretvara iz zdravstveno ispravne u neprihvatljivu te opasnu za čovjeka. Rast mikroorganizama u hrani je samo jedan od procesa kojim je uzrokovano kvarenje hrane. Promjena boje, okusa, mirisa te sastava hrane je posljedica rasta i razmnožavanja mikroorganizama u hrani (4,5,6).

### 1.2.1 Kvarenje biljnih proizvoda

Na biljnim proizvodima moguća su tri tipa kvarenja. Prvi tip predstavlja aktivno kvarenje koje je uzrokovano biljnim patogenima koji mogu uzrokovati infekcije zdravih biljnih proizvoda. Drugi tip kvarenja biljnih proizvoda čini pasivno kvarenje odnosno kvarenje koje je potaknuto ulaskom mikroorganizama kroz oštećeno epidermalno tkivo (ljuska, kora) u unutrašnjost voća. Ovaj se tip kvarenja najčešće pojavljuje nakon oštećenja ploda. Treći tip kvarenja predstavlja također pasivno kvarenje koje se javlja kada pojedini mikroorganizmi dospijevaju u unutarnja tkiva biljnih proizvoda kroz oštećenja prouzročena biljnim patogenima (6).

## 1.3 Mikrobno kvarenje voća

Voće se za razliku od povrća razlikuje po tome što ima kiseli pH te veću koncentraciju šećera. Nadalje, voće ima djelotvornije obrambene mehanizme kao što su debeli sloj epidermalnog tkiva te višu koncentraciju antimikrobnih organskih kiselina (6).

Normalna mikroflora voća je vrlo raznolika te uključuje bakterije, kvasce i plijesni. Prvi korak kod obrade voća je pranje ili ispiranje. Jedno istraživanje dokazalo je kako procesi četkanja i pranja smanjuju mikrobnu populaciju na površini jabuka za više od 99,99%. Nadalje, rezanjem te sjeckanjem voća uklanja se zaštita koju daje kora ili lupina te se uslijed tih procesa visoke koncentracije šećera u tekućinama istiskuju iz unutrašnjih tkiva narezanog voća. Na taj način pospješeno je rast mikroorganizama (6).

Poznato je da se neki voćni plodovi suše zbog dobivanja poluproizvoda. U tom slučaju niska vrijednost aktiviteta vode ( $a_w$ ) predstavlja glavni mehanizam zaštite od kvarenja voća. Poznato je da kod većine dehidriranog voća vrijednosti  $a_w$  budu dovoljno niske da se na taj način

inhibira veći broj bakterija, dok se mikrobno kvarenje događa uslijed rasta osmofilnih kvasaca ili kserotolerantnih plijesni. Nedavno istraživanje je dokazalo da je broj kvasaca i plijesni na suhom voću manji od  $10^3$  CFU/g, a od najčešće zastupljenih vrsta kvasaca koji uzrokuju kvarenje na sušenim voćnim plodovima ističu se *Zyosaccharomyces rouxii*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Candida* te *Pichia*, dok se neke vrste plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* te *Wallemia* smatraju uzročnicima kvarenja (6).

Kod voćnih koncentrata, džemova, želea i voćnih sirupa također je prisutna otpornost prema kvarenju zbog nižih  $a_w$  vrijednosti, ali za razliku od dehidriranog voća kod navedenih proizvoda smanjena vrijednost  $a_w$  je postignuta dodavanjem određene količine šećera do razine da se postigne  $a_w$  vrijednost od 0,82 do 0,94. Nadalje, uz nizak aktivitet vode, kod ovih proizvoda mikrobiološko kvarenje je inhibirano i zbog činjenice da se tijekom procesa proizvodnje navedeni proizvodi zagrijavaju do temperature od 82 °C pa se kvarenje kod njih događa kad ambalaža nije zatvorena na ispravan način ili je tijekom distribucije otvorena od strane potrošača (6).

### 1.3.1 Kvasci

Kvasci imaju sposobnost rasta pri niskom pH, niskoj vrijednosti aktiviteta vode te visokoj koncentraciji šećera. Voćni su sokovi bogati jednostavnim ugljikohidratima te složenim izvorima dušika pa stoga predstavljaju idealan supstrat za kvasce. Rodovi kvasaca koji su odgovorni za kvarenje voćnih sokova su *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* te *Rhodotorula*. Iz voćnih sokova većinom se izoliraju vrste *Pichia membranifaciens*, *Candida maltosa*, *Candida sake*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bayanus*, *Brettanomyces intermedius*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis holmii* i *Zygosaccharomyces microellipsoides* (6).

Istraživanje koje je provedeno na području Washingtona obuhvatilo je 65 uzorka pasteriziranih voćnih sokova uzetih iz lokalnih supermarketa (sok od jabuke, mrkve, grejpa, grožđa i naranče) te je u njima ispitivana moguća kontaminacija kvascima. Od navedenih uzoraka 20% sokova je bilo kontaminirano nekom vrstom kvasaca. Kvasci su bili dominantni kontaminantni mikroorganizmi u rasponu od  $< 1,0$  do  $6,83 \log_{10}$  CFU/ml, a najčešće vrste kvasaca koje su bile identificirane u uzorcima voćnih sokova su: *C. lambica*, *C. sake*, *Rhodotorula rubro* te

*Geotrichum* spp., a u soku od grejpa bio identificiran manji broj kvasaca vrste *Penicillium* spp. i *Fusarium* spp (7).

Jedan od razloga prisutnosti kvasaca u voćnim sokovima može biti neuspješna provedba postupka pasterizacije. U voćnim sokovima kvarenje kvascima je karakterizirano stvaranjem CO<sub>2</sub> i alkohola, no izuzev ovih produkata kvasci proizvode i pektinesteraze koje mogu razgraditi pektin (6).

Otpornost na konzervanse predstavlja veliku prijetnju stabilnosti voćnih sokova. *Candida krusei*, *Zygosacchomyces bailli*, *Saccharomyces bisporus*, *Pichia membranifaciens* te *Schizosaccharomyces pembe* su primjeri kvasaca koji se smatraju otpornima na konzervanse. Otpornost na konzervanse odnosi se na sposobnost stanica da podnose pad unutarstanične pH vrijednosti zahvaljujući enzimu fosforfruktokinazi. *P. membranifaciens* se smatra ciljnim organizmom za optimizaciju termalne pasterizacije jer je *P. membranifaciens* otporan na toplinu, SO<sub>2</sub>, benzojevu, sorbinsku, octenu kiselinu te umjerenu količinu soli (6,8).

### 1.3.2 Plijesni

Plijesni su aerobni mikroorganizmi koji mogu rasti pri niskim pH vrijednostima te visokoj koncentraciji šećera. Kvarenje voća plijesnima u većini slučajeva ne predstavlja rizik po zdravlje čovjeka već su značajniji ekonomski gubici koji nastupe prilikom kontaminacije voća plijesnima. Najznačajnije plijesni koje mogu biti povezane s kvarenjem svježeg voća su *Rhizopus* i *Mucor* od kojih neke plijesni mogu proizvoditi mikotoksine koji predstavljaju opasnost za ljudsko zdravlje. Glavni mikotoksini koji se povezuju s voćnim sokovima su patulin kojeg proizvodi *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea* i *Penicillium expansum*, ohratoksin produkt *Aspergillus carbonarius* te citrinin produkt *Penicillium expansum* (9). Dominantne plijesni koje su zabilježene u voćnim sokovima pripadaju rodovima *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis* spp. i *Aureobasidium pullulans* (6). Prisutnost patulina u voćnim sokovima smatra se pokazateljem loše kvalitete voća (10).

### 1.3.3 Bakterije

Bakterije su u svježem voću prisutne u malom broju, a razlog tome je nizak pH voća. U bakterije dokazane u voćnim sokovima ubrajaju se one koje su otporne na kiselinu kao što su heterofermentativne bakterije mliječne kiseline, bakterije octene kiseline, *Erwinia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Clostridium*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Propionibacterium cyclohexanicum*, *Pseudomonas spp.* i *Bacillus spp.* (6).

Bakterije mliječne kiseline smatraju se najčešćom skupinom mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje u voćnim sokovima. Bakterije mliječne kiseline su gram pozitivne, štapićaste i katalaza negativne. *Lactobacillus* i *Leuconostoc* su dva najučestalija roda bakterija koji se često izoliraju iz voća te pokvarenih voćnih sokova. Navedeni rodovi bakterija proizvode mliječnu kiselinu u voćnim sokovima uz manju količinu octene i glukonske kiseline, etanola te CO<sub>2</sub>.

Nadalje, neke vrste bakterija mliječne kiseline kao što je *L. mesenteroides cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides* te *Leuconostoc dextranicum* proizvode diacetil i acetil metil karbinol kao metabolite u pokvarenim voćnim sokovima (6,11).

U bakterije octene kiseline koje se izoliraju iz voćnih sokova ubrajaju se *Acetobacter*, *Gluconobacter* i *Gluconacetobacter*. To su aerobne, gram negativne, elipsoidne do štapićaste bakterije koje se mogu pojaviti u lancima, pojedinačno ili u parovima. Ove bakterije ubrajaju se među glavne kvaritelje voćnih sokova jer imaju sposobnost rasta pri relativno niskom pH i pri niskim razinama hranjivih tvari. Prisutnost kiselog okusa u voćnim sokovima posljedica je stvaranja octene kiseline od strane ovih bakterija (6).

Posljednjih nekoliko godina bakterija *Alicyclobacillus* predstavlja opasnost u industriji voćnih sokova. *Alicyclobacillus* je termoacidofilna bakterija koja ima sposobnost stvaranja visoko rezistentnih endospora (6). Budući da neke vrste *Alicyclobacillus* žive u tlu, tijekom berbe bakterije dopijaju na voće. Do sada je izolirano preko 20 vrsta *Alicyclobacillus* od kojih su najpoznatije *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*, *A. acidophilus*, *A. cyclohexanicus*, *A. hesperidium* te *A. fastidiosus* (6). Kvarenje voćnih sokova bakterijom *Alicyclobacillus* teško je otkriti jer ne dovodi do vidljivih promjena kao što je bubrenje ambalaže te produkcija plinova (12,13). Novije istraživanje navodi da *A. acidoterrestris* predstavlja opasnost u komercijalnim voćnim sokovima jer može preživjeti pasterizaciju od 95 °C tijekom 2 minute te u termički obrađenim voćnim sokovima bakterija stvara spojeve kao što su gvajakol i halofenol (11,14). Patogenost soja *A. acidoterrestris* očituje se u tome što bakterije sadrže ω- alicikličke masne



kiseline u staničnoj membrani koje su odgovorne za toplinsku otpornost tvoreći na taj način zaštitnu prevlaku s jakim hidrofobnim vezama koje stabiliziraju smanjenu propusnost membrane pri visokim temperaturama. S druge strane toplinskoj stabilnosti pridonose endospore uz prisutnost proteina koji su stabilni na toplinu te mineralizaciju dvovalentnim kationima (15,16).

Bakterije *Propionibacterium* također su izolirane iz voćnih sokova. *P. cyclohexanum* je najčešća vrsta koja je otporna na kiselinu i toplinu. Prvi put je izolirana iz soka od naranče 1993. godine. Od faktora virulencije ističu se  $\omega$  – masne kiseline i  $\omega$  - cikloheksil undekanske kiseline, ali ova bakterija za razliku od *Alicyclobacillus* nema sposobnost stvaranja endospora. Jedno je istraživanje pokazalo da bakterije *P. cyclohexanum* imaju sposobnost rasta i razmnožavanja kod temperaturnog raspona od 4 °C do 40 °C. Rast *P. cyclohexanicum* bio je praćen u sokovima od rajčice, grejpa, brusnice, ananasa i jabuke na 30 °C i 35 °C preko 29 dana. Bakterija je početno bila prisutna u sirovinama, a s obzirom na otpornost preživjela je standardne postupke pasterizacije koji se koriste u industriji voćnih sokova te posljedično dovela do kvarenja konačnog proizvoda. Sokovi od brusnice, grejpa i jabuke nisu podržali rast *P. cyclohexanicum* (17).

Nadalje, rezultati istraživanja koje je obuhvatilo 120 uzoraka konvencionalnih pasteriziranih voćnih sokova pokazali su da su bakterije izolirane iz 51 uzorka (42,5%), a kvasci iz 78 uzorka voćnog soka (65 %). Enterohemoragična *E. coli* otkrivena je u četiri analizirana uzorka (3,34 %), također bakterija *S. aureus* je identificirana u četiri uzorka (3,34%). U 11 uzorka voćnih sokova (9,1%) ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija je iznosio čak 125 CFU/ml. Nadalje, acidofilni mikroorganizmi izolirani su iz 26 uzorka (21,7%). Niti u jednom uzorku nisu identificirane bakterije *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *L. monocytogenes* te ostali sojevi *E. coli* (18).

#### 1.4 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je gram pozitivni, oksidaza negativni, koagulaza pozitivni asporogeni fakultativno anaerobni kok. Iako je moguće da stafilokoki rastu pojedinačno, najčešće se povezuju u parove, kratke lance ili strukture slične grozdovima. Bakterija je promjera od 0,5 do 1,5  $\mu\text{m}$ , a stanična stijenka je građena od peptidoglikana i teikoične kiseline. Na površini stijenke prisutan je protein A za koji je karakteristično da se veže za Fc – fragment IgG – a zbog

čega postane neprepoznatljiv imunomnom sustavu čovjeka. *S. aureus* producira toksine kao što su: alfa-toksin, eksfolijatin te TSST-1. Do sada je otkriveno više od 40 vrsta stafilokoka te su istraživanja dokazala da desetak vrsta bakterija kod ljudi može izazvati bolest. Najznačajnije vrste stafilokoka su: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* te *S. saprophyticus* (19).

Istraživanja su dokazala da se *S. aureus* kod oko 30% ljudi nalazi na vlažnim dijelovima kože, nosnom vestibulu i probavnom sustavu te je uzročnik brojnih infekcija kod imunokompromitiranih osoba (19). *S. aureus* uzrokuje široki raspon bolesti, od umjereno teških kožnih infekcija do fatalne upale pluća i sepse, a samo liječenje je komplicirano s obzirom na otpornost na antibiotike (20). Dokazano je kako bakterijemija uzrokovana ovom bakterijom uzrokuje veći broj smrtnih slučajeva od onih koji su uzrokovani tuberkulozom, AIDS-om te virusnim hepatitisom zajedno (21). Također je dokazano kako je *S. aureus* povezan s razvojem atopijskog dermatitisa (22).

#### 1.4.1 Trovanje hranom uzrokovano *S. aureus*

Do stafilokoknog trovanja hranom dolazi prilikom konzumacije hrane koja sadrži enterotoksin. Za izazivanje infekcije enterotoksinom *S. aureus* potrebni su određeni uvjeti. Prvi uvjet je izvor koji sadrži stafilokoke koji proizvode enterotoksin, zatim je za razvoj infekcije potreban prijenos stafilokoka s izvora na hranu, primjerice kontaminiranim priborom za hranu. Nadalje, kako bi se infekcija pojavila, hrana mora imati sastav s povoljnim fizikalno – kemijskim karakteristikama za rast mikroorganizama i toksogenezu. Povoljna temperatura i vrijeme za razmnožavanje nužni su za razvoj dovoljnih količina enterotoksina. Poznato je da je glavni uzrok prisustva ove bakterije u hrani loša higijenska praksa tijekom obrade, kuhanja ili distribucije hrane što naposljetku rezultira trovanju hranom. Stafilokokni enterotoksini su toplinski stabilni te mogu izdržati toplinu od 121 °C tijekom 10 minuta pa stoga ukoliko su enterotoksini proizvedeni u hrani, zagrijavanjem se ne uništavaju. Dokazano je da stafilokokni enterotoksini nastaju uslijed temperaturnog raspona od 10 °C do 40 °C te da povećanje temperature nije nužno povezano s povećanjem koncentracije enterotoksina. Također je dokazano kako na proizvodnju enterotoksina osim temperature i hranjivih tvari utječu i svojstva pojedinih sojeva *S. aureus* (23,24).

#### 1.4.2 Utjecaj okolišnih uvjeta na rast i razmnožavanje *S. aureus*

Za bakteriju *S. aureus* je poznato da posjeduje sposobnost prilagodbe na različite uvjete okoline. Stafilokoki su sveprisutni u okolišu te je moguće njihovo prisustvo u zraku, prašini, vodi te kanalizaciji. Dokazano je kako se bakterije mogu razmnožavati uslijed visokog postotka soli te visoke koncentracije šećera. Ovi mikroorganizmi su relativno otporni na toplinu jer preživljavaju temperaturu od 50 °C tijekom 30 minuta te sušenje i 9 % - tnu koncentraciju NaCl, međutim inhibirani su 3% - tnom heksaklorfenom (19,25).

Poznato je da *S. aureus* raste i razmnožava se u temperaturnom rasponu od 7 °C do 48 °C te da je optimalna temperatura za razvoj od 35 °C do 40 °C, no brojna istraživanja su dokazala da utjecaj temperature ovisi o ispitivanom soju te vrsti medija za rast (24,26). Minimalna temperatura koja je potrebna za proizvodnju manjih količina enterotoksina je od 7 °C do 13 °C te je produkcija toksina dokazana za 3-4 dana nakon inficiranja. Maksimalna temperatura pri kojoj je moguća produkcija toksin *S. aureus* je od 40 °C do 48 °C (24).

Jedna od najučinkovitijih mjera za inaktivaciju *S. aureus* u hrani je zagrijavanje. Primjerice u mlijeku se pravilnom termičkom obradom *S. aureus* ubija te je bakterija potpuno inaktivirana nakon primjene pasterizacije pri 62,8 °C tijekom 6,8 minuta ili nakon termičke obrade pri 71,7 °C tijekom 0,14 minuta. Dokazano je da *S. aureus* ne raste dobro u prisutnosti kompetitivne flore te da rast bakterija može biti inhibiran zbog sniženja pH, kiselih produkata metabolizma makromolekula te vodikovog peroksida i antibiotika (24).

#### 1.4.3 Antimikrobna rezistencija

Bakterija *S. aureus* se lako prilagođava te ima sposobnost stjecanja rezistencije na antibiotike. Dokazano je da je do sada oko 90% izolata rezistentno na penicilin. *S. aureus* producira penicilazu koja razara beta laktamski prsten, a kodirana je genom na plazmidu. Osnova rezistencije na meticilin predstavlja promjenu u ciljnom mjestu djelovanja beta – laktama penicilin vezajućeg proteina, a mehanizam prijenosa gena je horizontalni transfer (19). Infekcije *S. aureus* problematične su zbog rezistencije na antibiotike od kojih je meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA) najčešći uzročnik bolničkih infekcija uzrokovanih sojevima *S. aureus* (27). Vankomicin je antibiotik koji se primjenjuje kod infekcija kada ostali antibiotici ne djeluju, no

iako postoje sojevi *S. aureus* koji su otporni na vankomicin, ti se sojevi bakterija za sada nisu proširili u značajnoj mjeri (28).

Bakterija ima sposobnost tvorbe složene strukture ekstracelularnog polimernog biofilma koji osigurava sigurno okruženje za stvaranje mikrokolonija. Biofilm *S. aureus* štiti bakterije od nepovoljnih uvjeta okoline kao što su promjena temperature, nedostatak hranjivih tvari te dehidracija. Najveću opasnost uslijed razvoja biofilma *S. aureus* predstavlja zaštita bakterija od antimikrobnih lijekova. Samim time, s vremenom su lijekovi postali sve manje učinkoviti protiv ove bakterije (19,23).

### 1.5 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je najčešća te najznačajnija vrsta bakterija koja se ubraja u rod *Escherichia* unutar porodice *Enterobacteriaceae*. Bakterija je gram negativni, oksidaza negativni, katalaza pozitivni pokretni bacil širine od 1 do 1,5  $\mu\text{m}$  te duljine od 2 do 6  $\mu\text{m}$ . Posjeduje važnu ulogu kao dio normalne crijevne mikroflore čovjeka i nekih životinja te je zajedno s ostalim bakterijama crijevne mikroflore zaslužna za stimulaciju imunog sustava domaćina. Na taj način inhibira se kolonizacija crijeva patogenim mikroorganizmima, a bakterije crijevne mikroflore sudjeluju i u stvaranju vitamina K (19). Bakterija se u većini slučajeva smatra bezopasnim mikroorganizmom koji ne uzrokuje bolest kod ljudi, no neki sojevi *E. coli* uzročnici su infekcija gastrointestinalnog, mokraćnog te središnjeg živčanog sustava (19). Poznato je da se *E. coli* često koristi u istraživanjima primjerice prilikom kloniranja u DNA rekombinantnoj tehnologiji (29).

Pojedini sojevi *E. coli* smatraju se uzročnicima ekstraintestinalnih ili intestinalnih infekcija. Prilikom razvoja infekcije bakterije koriste opće te specifične čimbenike virulencije. U intestinalne tipove *E. coli* ubrajaju se enterotoksična *E. coli* (ETEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC), enteropatogena *E. coli* (EPEC), enterohemoragična *E. coli* (EHEC), enteroagregativna *E. coli* (EAEC) te difuzno adhezivna *E. coli* (DAEC) (30). Ovisno o čimbenicima virulencije koje imaju bakterije, sojevi *E. coli* mogu biti uzročnici vodenastih proljeva ili upale crijeva koju karakterizira krvavo sluzavi proljev (31). Ekstraintestinalna *E. coli* smatra se uzročnikom infekcija mokraćnog sustava, meningitisa kod novorođenčadi te abdominalne sepse. Uropatogena *E. coli* je uzročnik oko 80% infekcija mokraćnog sustava (32).

### 1.5.1 Sojevi *E. coli* koji uzrokuju infekcije probavnog sustava

Enterotoksična *E. coli* uzročnik je putničke dijareje te dijareje kod djece koja su mlađa do 5 godina (33). ETEC se prenosi kontaminiranom vodom i hranom, a infektivna doza značajna za razvoj infekcije iznosi  $1 \times 10^8$  bakterija. Poznato je da se imunost prema ETEC razvije kod većina osoba koje žive u zemljama u kojima su infekcije ovim sojem *E. coli* dominantne (19). Najznačajniji čimbenici virulencije ETEC su termolabilni te termostabilni egzotoksini i faktori kolonizacije koji napadaju stanice crijeva. ETEC nakon kolonizacije počinje lučiti toksine koji dovode do povećanog izlučivanja vode te iona klora iz epitelnih stanica crijeva (34). Bolest uzrokovanu ovim sojem *E. coli* prati vodenasti proljev (31).

Enteroinvazivna *E. coli* najčešće uzrokuje infekcije u zemljama u razvoju. Infekcije uzrokovane ovim sojem *E. coli* slične su infekcijama koje uzrokuje patogena bakterija *Shigella* spp. Invazivni antigen koji je kodiran plazmidom smatra se glavnim čimbenikom virulencije Enteroinvazivne *E. coli* te kod razvoja bolesti dolazi do upale te stvaranja ulkusa na sluznici crijeva (19). Za razliku od ostalih sojeva *E. coli*, EIEC posjeduje ipaH-gen koji je prisutan samo kod EIEC te *Shigella* spp. (36).

Enteropatogena *E. coli* smatra se prvim sojem *E. coli* za koji je dokazano da uzrokuje proljeve. Specifični pili kodirani genima koji su smješteni na plazmidima smatraju se glavnim čimbenikom virulencije te kod čovjeka EPEC uzrokuje umjerenu do tešku dijareju (19). Infekcija uzrokovana ovim sojem *E. coli* najčešće je praćena povišenom temperaturom (31).

Enterohemoragična *E. coli* je za razliku od ostalih sojeva *E. coli* uzročnik proljeva u razvijenim zemljama te uzrokuje infekcije kod svih dobnih skupina, ali se djeca te starije imunokompromitirane osobe smatraju rizičnom skupinom za razvoj bolesti. Serotip EHEC O157: H7 najčešće uzrokuje bolest kod ljudi, a Shiga toksin čini glavni čimbenik virulencije EHEC (19,31). Infektivna doza je izrazito niska te iznosi od 10 do 100 bakterija (19). Klinička slika infekcije započinje vodenastim proljevom te grčevima u trbuhu, no već nakon početne faze bolesti proljev prelazi u krvavi proljev (19). Dosadašnja istraživanja su pokazala da se kod otprilike 15% oboljelih javlja hemolitičko-uremički sindrom koji predstavlja najtežu komplikaciju i kod 3-5% pacijenata dolazi do smrtnog ishoda (19,37). Nakon crijevne infekcije Shiga toksini mogu migrirati crijevnu barijeru te oštetiti endotelne i tubularne stanice što naposljetku može voditi k zatajenju bubrega (38).

### 1.5.2 Utjecaj okolišnih uvjeta na rast i razmnožavanje *E. coli*

*E. coli* preživljava u zemlji, vodi te na različitim predmetima tijekom određenog vremenskog razdoblja (19). Na rast i razmnožavanje *E. coli* utječu abiotički i biotički čimbenici. U abiotičke čimbenike ubrajaju se temperatura, dostupnost vode i hranjivih tvari, pH te sunčevo zračenje. Biotički čimbenici predstavljaju prisutnost drugih mikroorganizama i sposobnost bakterije da dobije hranjive tvari te se natječe s drugim mikroorganizmima. Temperatura se smatra glavnim čimbenikom koji utječe na rast bakterija u okolišu. *E. coli* se ubraja u mezofilne mikroorganizme jer je dokazano da se uspješno razmnožava pri temperaturama od 20 °C do 40 °C. Dokazano je da u prirodi *E. coli* može dulje preživjeti na nižim nego na višim temperaturama, stoga u okolišu *E. coli* najčešće raste na temperaturama nižim od 30 °C. Nadalje, istraživanja su dokazala da *E. coli* posjeduje sposobnost prilagodbe na temperaturne amplitude. Nekim sojevima *E. coli* za rast i razmnožavanje više odgovaraju fluktuirajuće temperature nego temperature u okruženju konstantno viših temperatura, dok primjerice enterohemoragična *E. coli* serotip O157:H7 raste najbolje u okruženju konstantnih temperatura. Vrijednost pH također utječe na rast i razmnožavanje bakterija *E. coli* te razina otpornosti prema pH ovisi o soju *E. coli*. Primjerice soj *E. coli* serotip O157:H7 bolje preživljava u okruženju niskog pH u usporedbi s ostalim sojevima *E. coli*. Nadalje, dokazano je da *E. coli* posjeduje sposobnost fleksibilnosti i svestranosti u prikupljanju energije i ugljika što pomaže bakteriji da preživi i razmnožava se u okolišu (29). Bakterija *E. coli* je osjetljiva na uobičajene dezinficijense (19).

Istraživanjem je ispitivan utjecaj temperature na preživljavanje određenih sojeva *E. coli* u mesnom bujonu te obranom mlijeku. Dokazano je da su bakterije *E. coli* unutar mesnog bujona bile inaktivirane prilikom izlaganja temperaturi od 55 °C nakon 60-120 minuta, dok su u obranom mlijeku bakterije bile inaktivirane nakon 180 minuta pri temperaturi 55 °C (39).

Tijekom istraživanja u kojem su u komercijalne sokove od manga te šparoga inokulirane *E. coli* (ATCC 43889, ATCC 43895) te potom inkubirane pri temperaturama od 7 °C te 25 °C dokazano je da su niže temperature te adaptacija bakterija na kiselinu poboljšali preživljavanje *E. coli* O157:H7 u oba komercijalna soka (40).

### 1.5.3 Antimikrobna rezistencija

Slično kao *S. aureus* i *E. coli* posjeduje sposobnost razvoja rezistencije prema određenim antibioticima (41). Novija istraživanja su dokazala da je *E. coli* posljednjih godina razvila sve veću rezistenciju na antibiotike. Razlog tome, osim mutacija u genima su višestruke crpke AcrAB-To/C i Mex crpke koje sinergistički djeluju s drugim mehanizmima (42). Nadalje, istraživanje kojemu je cilj bio ispitati mikrobnu ispravnost s obzirom na prisutnost *E. coli* te ispitati profil antimikrobne rezistencije *E. coli* u 86 uzoraka voćnih sokova dokazalo je da je 20 uzoraka (3,26 %) bilo pozitivno na *E. coli*. Izolirane *E. coli* bile su vrlo otporne na klindamicin (80 %), ampicilin (70 %), sulfametoksazol – trimetoprim (60 %), eritromicin (60 %) te kloramfenikol (50 %) te je zaključeno kako se voćni sok može smatrati potencijalnim izvorom patogene *E. coli* ukoliko postupci konzerviranja nisu provedeni na ispravan način (43).

### 1.6 Pravna regulativa vezana uz voćne sokove

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja je temeljem Zakona o hrani u lipnju 2008. godine donijelo Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Pravilnik je usklađen s zakonodavstvom Europske unije, odnosno s Uredbom (EZ-a) 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu utvrđeni su mikrobiološki kriteriji za pojedine mikroorganizme i pravila kojih se subjekt u poslovanju s hranom mora pridržavati. Prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu za nepasterizirane sokove od voća i povrća (gotova hrana) mikroorganizam koji se utvrđuje je *Salmonella* spp. U tom slučaju propisan je broj elementarnih jedinica koje čine uzorak te on mora iznositi 5. Granična vrijednost označava da u 25 grama uzorka se mora dokazati odsutnost mikroorganizma kako bi proizvod zadovoljio mikrobiološki kriterij. U ovom slučaju faza u kojoj se primjenjuje kriterij je faza u kojoj je proizvod stavljen na tržište tijekom valjanog roka trajanja, a ispitna referentna metoda je HRN EN ISO 6579. S obzirom na kriterije higijene u procesu proizvodnje, prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu za nepasterizirane sokove od voća i povrća (gotova hrana) mikroorganizam čija se prisutnost ispituje je *E. coli*. U ovom slučaju broj elementarnih jedinica koje čine uzorak je 5, dok je 2 dozvoljeni broj elementarnih jedinica uzorka koje daju vrijednost između m i M. Vrijednost m označava graničnu vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućom, dok se vrijednost M odnosi na graničnu dopuštenu vrijednost iznad koje se rezultati ne smatraju zadovoljavajućim. Granična vrijednost za m iznosi 100 CFU/g, dok je 1000 CFU/g propisana

granična vrijednost za M. Faza u kojoj se ovaj mikrobiološki kriterij primjenjuje je proizvodni proces, a ispitna referentna metoda je HRN ISO 16649-1 ili HRN ISO 16649-2. Prema Pravilniku mjere koje su propisane u slučaju nezadovoljavajućih rezultata su poboljšanje higijene proizvodnje i izbora sirovina (44).

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu pruža nadležnim tijelima smjernice i upute o primjeni kriterija iz Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu u cilju provođenja službenih kontrola. Nadalje, Vodič objašnjava subjektima u poslovanju s hranom kako moraju ispravno primjenjivati odredbe Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu sadrži mikrobiološke kriterije za hranu te mikrobiološke kriterije za osiguranje higijenskih uvjeta prilikom rada s hranom kao dio verifikacije HACCP plana. Prema Vodiču mikrobiološki parametri koji se utvrđuju u voćnim sokovima, gaziranim voćnim sokovima te osvježavajućim voćnim sokovima su: aerobne mezofilne bakterije, *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae* te kvasci i plijesni. Za sve navedene parametre broj elementarnih jedinica koje čine uzorak iznosi 5, dok se jedino za aerobne mezofilne bakterije gleda i broj jedinica uzorka gdje se broj bakterija može nalaziti između vrijednosti m i M te c u ovom slučaju iznosi 1. Mikrobiološki kriteriji za aerobne mezofilne bakterije iznose  $m=10$  CFU /ml te  $M = 10^2$  CFU /ml. Za *Salmonella* spp. mikrobiološki kriterij iznosi  $M=0$  CFU/25 ml, za *Enterobacteriaceae* iznosi  $M \leq 1$  CFU/10 ml dok za kvasce i plijesni iznosi  $M \leq 1$  CFU/ml. Gledajući, mikrobiološke parametre koji se utvrđuju u nepasteriziranim voćnim sokovima i sokovima od povrća također se ispituje prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae* te kvasaca i plijesni. Za sve navedene parametre broj elementarnih jedinica koje čine uzorak također iznosi 5, dok za aerobne mezofilne bakterije broj jedinica uzorka gdje se broj bakterija može nalaziti između vrijednosti m i M za *Enterobacteriaceae* c iznosi 1, dok za kvasce i plijesni c iznosi 2. Mikrobiološki kriteriji kod nepasteriziranih sokova su viši za razliku od pasteriziranih voćnih sokova te je za aerobne mezofilne bakterije  $m = 10^3$  CFU/ml, a  $M = 10^4$  CFU/ml. Za *Salmonella* spp mikrobiološki kriterij iznosi  $M=0$  CFU/25 ml. Utvrđeni mikrobiološki kriteriji za *Enterobacteriaceae* iznose  $m=10$  CFU/ml odnosno  $M=10^2$  CFU/ml, dok su za kvasce i plijesni propisani kriteriji  $m=10^2$  CFU/ml te  $M = 10^3$  CFU/ml (45).



### 1.6.1 Pravna regulativa vezana uz ekološke proizvode

Prema pravilima Europske unije ekološka proizvodnja podrazumijeva poštivanje svih pravila o ekološkom uzgoju, a sva se pravila temelje na općim i konkretnim načelima s ciljem promicanja zaštite okoliša, zatim očuvanja bioraznolikosti te jačanja povjerenja potrošača u ekološke proizvode. Kod ekoloških proizvoda u svim fazama proizvodnje nije dopuštena uporaba genetički modificiranih organizama te ionizirajućeg zračenja. Uporaba umjetnih gnojiva, pesticida i herbicida je ograničena. Nadalje, upotreba hormona je zabranjena, a uporaba antibiotika dopuštena je isključivo zbog zdravlja životinja. Proizvođači ekoloških proizvoda obavezni su razviti alternativne načine održavanja plodnosti tla te zdravlja biljaka i životinja. Primjerice, proizvođači ekoloških proizvoda trebaju izbjegavati uporabu mineralnih dušičnih gnojiva, smanjiti utjecaj korova i štetočina primjenom otpornih sorti i pasmina te tehnika kojima se potiče prirodna kontrola štetnika. Nadalje, ekološki proizvođači dužni su što češće primjenjivati plodorede te uzgajati biljke koje vežu dušik za zelenu gnojidbu kako bi se na taj način obnovila plodnost tla. Navedena pravila moraju biti uključena u sve faze proizvodnje, pripreme te distribucije kako bi neki proizvod mogao biti obilježen kao ekološki. Nadalje, da bi neki proizvod bio označen znakom ekološke proizvodnje potrebno je da sadrži najmanje 95% ekološki uzgojenih sastojaka, a preostalih 5% sastojaka je proizvedeno uz stroge uvjete proizvodnje (46).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj diplomskog rada bio je ispitati mikrobiološku ispravnost voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje. Nadalje, cilj je bio odrediti kinetiku rasta bakterija *S. aureus* i *E. coli* u voćnim sokovima iz konvencionalne i ekološke proizvodnje pri različitim temperaturama (4 °C , 25 °C, 37 °C) tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana.

### 3. MATERIJALI I POSTUPCI

#### 3.1 Uzorci voćnih sokova

Prilikom određivanja mikrobiološke ispravnosti voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje korištena su četiri uzorka voćnih sokova. Svi su uzorci voćnih sokova bili ispravnog roka trajanja.

Prvi uzorak voćnog soka je osvježavajući, mutni, negazirani, bezalkoholni voćni sok miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom te obogaćen vitaminima. Udio voća u voćnom soku je najmanje 12% (naranča 8% , limun 2% te ostalo voće 2%). Sastojci voćnog soka su: voda, šećer, glukozno-fruktozni sirup, koncentrirani sok miješanog tropskog voća (naranča, limun, ananas, grožđe, mandarina, nektarina, marakuja, guava, marelica), limunska kiselina, vitamini C i E, provitamin A, stabilizatori E440 i E410, arome, sladilo sukraloza. Uzorak voćnog soka je iz konvencionalne proizvodnje.

Tablica 1. Nutritivne vrijednosti osvježavajućeg, mutnog, negaziranog, bezalkoholnog voćnog soka iz konvencionalne proizvodnje na 100 ml.

Energija	119 kJ / 28 kcal
Ugljikohidrati	7,0 g
od kojih šećeri	7,0 g
Masti	< 0,1 g
od kojih zasićene mk	< 0,01 g
Bjelančevine	< 0,1 g
Sol	< 0,01 g
Vitamin C	12 mg
Vitamin E	1,8 mg
Vitamin A	240 µg

Drugi uzorak voćnog soka je sok multivitamin ekološkog podrijetla. Sastojci voćnog soka su sok od naranče, jabuke, kruške, manga, mrkve biodinamičkog podrijetla te sok od marakuje, guave i nara kontroliranog organskog podrijetla.

Tablica 2. Nutritivne vrijednosti uzorka voćnog soka multivitamin ekološkog podrijetla na 100 ml.

Energija	184 kJ / 44 kcal
Ugljikohidrati	9,3 g
od kojih šećeri	8,8 g
Masti	0,1 g
od kojih zasićene mk	0,02 g
Bjelančevine	0,5 g
Sol	0,03 g
Vitamin C	12 mg
Vitamin A	160 µg

Treći uzorak voćnog soka je sok od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 %. Uzorak voćnog soka je iz konvencionalne proizvodnje.

Tablica 3. Nutritivne vrijednosti soka od jabuke iz konvencionalne proizvodnje na 100 ml.

Energija	189 kJ / 45 kcal
Ugljikohidrati	11,2 g
od kojih šećeri	11,2 g
Masti	0 g
od kojih zasićene mk	0 g
Bjelančevine	0 g
Sol	< 0,01 g

Četvrti uzorak voćnog soka je organski sok od jabuke. Voćni sok čini sok od jabuke iz ekološke proizvodnje.

Tablica 4. Nutritivne vrijednosti soka od jabuke iz ekološke proizvodnje na 100 ml.

Energija	193 kJ / 46 kcal
Ugljikohidrati	11 g
od kojih šećeri	10,5 g
Masti	0,5 g
od kojih zasićene mk	0,1 g
Bjelančevine	0,5 g
Sol	0,01 g

### 3.2 Baird Parker agar

Baird Parker je selektivna i diferencijalna hranjiva podloga koja se koristi prilikom nasađivanja bakterija *S. aureus* s ciljem pripreme bakterijske suspenzije te za određivanje broja bakterija *S. aureus* u uzorcima voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje. Baird Parker agar posjeduje selektivna svojstva zahvaljujući litijevom kloridu te 1 % -om kalijevom teluritu koji su zaslužni za inhibiciju rasta ostalih mikroorganizama. Diferencijalna svojstva očituju se zbog sadržaja kalij telurit te žumanjaka. Bakterije *S. aureus* su koagulaza pozitivne te posjeduju enzim lecitinazu koji razgrađuje žumanjak u podlozi. Na taj se način stvara prozirna zona oko kolonija. Također stafilokoki imaju sposobnost redukcije kalij telurita što rezultira karakterističnim crno – sivim kolonijama na podlozi.

Sastav Baird Parker agara – kazein (10 g/l)

-ekstrakt mesa (5 g/l)

-ekstrakt kvasca (1 g/l)

- Natrijev piruvat (10 g/l)

-L-glicin (12 g/l)

-Litijev klorid (5 g/l)

-agar (20 g/l)

\* pH  $7,2 \pm 0,2$

### 3.3 TBX agar

TBX agar je selektivna i diferencijalna hranjiva podloga koja se koristi za nasadivanja bakterija *E. coli* u svrhu pripreme bakterijske suspenzije te određivanje broja *E. coli* u uzorcima voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje. TBX agar ima selektivna svojstva zahvaljujući prisustvu kromogenog supstrata 5-brom-4-krom-3-indol beta-D-glukuronida (X-β-D-glukuronid), a *E. coli* posjeduje enzim β-glukuronidazu koji razgrađuje veze između kromogenog supstrata 5-brom-4-krom-3-indol te β-D-glukuronida što rezultira pojavom plavo-zelenih kolonija *E. coli* na TBX agaru.

Sastav TBX agara - Trypton (20,0 g/l)

-Žučne soli (1,5 g/l)

- X-Glukuronid (0,075 g/l)

- Agar (15,0 g/l)

\*pH  $7,2 \pm 0,2$

### 3.4 Mikrobiološka ispravnost voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje

Mikrobiološka ispravnost određivana je za četiri uzorka voćnih sokova. Svi su uzorci voćnih sokova bili ispravnog roka trajanja te im je ambalaža sterilno otvorena neposredno prije nasađivanja na hranjive podloge. U uzorcima voćnih sokova određivana je prisutnost ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* te prisutnost kvasaca i plijesni. Određeni volumeni voćnog soka sterilnom pipetom su nasađeni na površine agara te su potom razmazani sterilnim staklenim štapićem po površini podloge. Nasađene ploče ostavljene su 10 minuta na sobnoj temperaturi te su potom inkubirane na različitim temperaturama.

Prisutnost ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija određena je na način da je 1 ml svakog uzorka voćnog soka prenesen u Petrijevu zdjelicu te je potom dodano 12-15 ml rastopljenog i ohlađenog hranjivog agara s kvašćevim ekstraktom. Uzorci su inkubirani na 37 °C tijekom vremenskog razdoblja od 48 sati.

Prisutnost bakterija iz roda *Enterobacteriaceae* ispitivana je na način da je 100 µl svakog uzorka voćnog soka nasađeno na selektivnu i diferencijalnu hranjivu podlogu VRBG (engl. Violet Red Bile Glucose) koja se inkubira na 37 °C tijekom 24 sata. *Enterobacteriaceae* na VRBG agaru rastu kao tamno ljubičaste kolonije koje su okružene ružičastom halo zonom.

Prisutnost vrsta *Salmonella* dokazuje se na XLD (ksiloza – lizin – dezoksikolat) agaru na način da se 100 µl uzorka voćnog soka nasađuje na hranjivu podlogu koja se potom inkubira tijekom vremenskog razdoblja od 24 sata na 37 °C. Kolonije *Salmonella* na agaru su crvene boje s karakterističnim crnim centrom.

Prisutnost *E. coli* ispitivana je na način da je 100 µl svakog uzorka voćnog soka nasađeno na diferencijalnu i selektivnu podlogu TBX (Tryptone Bile X- glucuronide) koja se inkubira na 37 °C tijekom 24 sata. Porast *E. coli* na TBX agaru vidljiv je kao plavo-zelene kolonije.

Prisutnost *L. monocytogenes* dokazuje se porastom na ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti) agaru. Volumen od 100 µl uzorka voćnog soka nasadi se na hranjivu podlogu koja se inkubira na 37 °C tijekom 24 sata. Kolonije *L. monocytogenes* na hranjivoj podlozi su prepoznate po tirkiznoj boji s halo zonom.

Prisutnost *B. cereus* ispitivana je na način je 100 µl svakog uzorka voćnog soka nasađeno na selektivnu i diferencijalnu podlogu PEMBA (egg-yolk mannitol–bromothymol blue agar).

Hranjive podloge su inkubirane tijekom vremenskog razdoblja od 24-48 sati na 37 °C, a porast *B. cereus* očituje se u plavim kolonijama sa sivkastim središtem.

Prisutnost *S. aureus* dokazuje se porastom na podlozi Baird Parker te je po 100 µl svakog uzorka voćnog soka nasadeno na hranjive podloge koje su potom inkubirane tijekom 24 sata na 37 °C. Porast kolonija crno-sive boje s halo zonom ukazuje na prisutnost *S. aureus* u ispitivanim uzorcima.

Prisutnost *Enterococcus* ispitivana je na način da je 100 µl uzorka nasadeno na selektivnu i diferencijalnu hranjivu podlogu KEA (Kanamycin Esculin Azide) koja se inkubira na 37 °C tijekom 24 sata, a pozitivan porast očituje se kao prozirne kolonije s tamnosmeđom do crnom halo zonom.

Prisutnost kvasaca i plijesni određuje se na način da je 100 µl svakog uzorka voćnog soka nasadeno na Sabouraud agar te su hranjive podloge inkubirane na 37 °C tijekom 48 sati.

### 3.5 Priprema bakterijske suspenzije

Bakterijska suspenzija točno određene koncentracije priprema se spektrofotometrijski pomoću uređaja spektrofotometra koji se upotrebljava za određivanje optičke gustoće. Poznato je da optička gustoća 1 predstavlja koncentraciju od  $1 \times 10^9$  bakterija u ml suspenzije (CFU/ml). Sterilna voda je korištena kao slijepa proba kod određivanja optičke gustoće bakterijske suspenzije. Prilikom određivanja kinetike rasta korištena je bakterija *Staphylococcus aureus*, soj American Type Culture Collection (ATCC) 29213 te bakterija *Escherichia coli*, soj American Type Culture Collection (ATCC) 25922. Bakterija *S. aureus* je prethodno uzgajana na Baird Parker agaru, dok je *E. coli* uzgajana na TBX agaru. Nakon inkubacije pri temperaturi od 37 °C te porasta *S. aureus* na Baird Parker agaru, odnosno *E. coli* na TBX agaru bakterije su sterilnim brisnim štapićem pokupljene sa spomenutih agara te su potom umućene u 3 ml sterilne vode. Neposredno prije spektrofotometrijskog određivanja optičke gustoće bakterijske suspenzije bile su homogenizirane pomoću tresilice. Nadalje, u cilju mjerenja optičke gustoće 500 µl tako pripremljenih suspenzija pipetirano je u kivetu. Optička gustoća bakterijske suspenzije *S. aureus* iznosila je 1,086, dok je optička gustoća suspenzije *E. coli* iznosila 0,927. Optičke gustoće tako pripremljenih suspenzija znače da je približan broj bakterija u suspenziji  $1 \times 10^9$  CFU/ml.



### 3.6 Inokulacija bakterija u uzorke voćnih sokova

S obzirom da je nakon utvrđivanja mikrobiološke ispravnosti voćnih sokova, cilj bio pratiti kinetiku rasta bakterija *S. aureus* te *E. coli* u dva uzorka voćnih sokova iz konvencionalne proizvodnje te dva uzorka iz ekološke proizvodnje neposredno nakon sterilnog otvaranja ambalaže voćnih sokova pripremljene bakterijske suspenzije su inokulirane u 30 ml uzorka sokova. U cilju postizanja koncentracije  $1 \times 10^5$  bakterija *S. aureus* u mililitru uzorka soka, u 30 ml uzorka je dodano 3  $\mu$ l pripremljene bakterijske suspenzije *S. aureus*, dok je u cilju postizanja koncentracije  $1 \times 10^6$  bakterija *E. coli* u mililitru uzorka soka dodano 30  $\mu$ l bakterijske suspenzije *E. coli* u 30 ml uzorka. Nadalje, u cilju određivanja kinetike rasta *S. aureus* odnosno *E. coli* u četiri uzorka voćnih sokova tako pripremljeni uzorci inkubirani su na tri različite temperature 4 °C, 25 °C i 37 °C tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana.

### 3.7 Kinetika rasta bakterija u uzorcima voćnih sokova

Broj bakterija *S. aureus* i *E. coli* u dva uzorka voćnih sokova iz konvencionalne proizvodnje te dva uzorka sokova iz ekološke proizvodnje određen je treći, sedmi, deveti i dvanaesti dan nakon inokulacije. U cilju praćenja kinetike rasta bakterije *S. aureus* u uzorcima voćnih sokova, 100  $\mu$ l svakog uzorka nasađeno je na Baird Parker agar, dok je za određivanja kinetike rasta *E. coli* isti volumen voćnog soka nasađen na TBX agar. Nadalje, sve su nasađene podloge inkubirane na temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata. Isti postupak nasađivanja bakterija *S. aureus* na Baird Parker, odnosno nasađivanja *E. coli* na TBX hranjivu podlogu ponovljen je sedmog, devetog te dvanaestog dana od inokulacije. Broj bakterija *S. aureus* odnosno *E. coli* očitani su nakon inkubacije od 24 sata. Porast kolonija *S. aureus* prepoznat je po crno – sivoj boji kolonija s halo zonom, a porast *E. coli* na TBX agaru karakteriziraju karakteristično plavo-zelene kolonije.

### 3.8 Statistička obrada podataka

Statistička obrada dobivenih podataka provedena je programom Statistica 12 (StatSoft Inc., SAD). Normalnost distribucije svih parametara je utvrđena. Uzorci koji su pokazali normalnu distribuciju analizirani su parametrijskim Student t - testom, a razina od  $p < 0,05$  smatrana je statistički značajnom i označena zvjezdicom (\*).

## 4. REZULTATI

Cilj diplomskog rada bio je ispitati mikrobiološku ispravnost voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje. Mikrobiološka ispravnost određivana je u dva uzorka voćnog soka miješanog voća te dva uzorka soka od jabuke.

Nadalje, slijedeći cilj bio je odrediti kinetiku rasta bakterija *S. aureus* i *E. coli* u voćnim sokovima iz konvencionalne i ekološke proizvodnje pri različitim temperaturama (4 °C , 25 °C, 37 °C) tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana.

### 4.1 Ispitivanje mikrobiološke ispravnosti voćnih sokova

Kod četiri uzorka voćnih sokova unutar roka trajanja ispitivana je mikrobiološka ispravnost. U uzorcima voćnih sokova je određivana prisutnost ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija roda *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* te prisutnost kvasaca i plijesni. Određeni volumen voćnog soka nasaden je na površinu hranjive podloge i razmazan staklenim štapićem po površini, a potom su nasadene hranjive podloge inkubirane pri određenoj temperaturi tijekom određenog vremenskog perioda.

Prisutnost ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija određivana je na način da je po 1 ml svakog uzorka voćnog soka prelijet u Petrijevu zdjelicu te je zatim dodan rastopljen hranjivi agar s kvaščevim ekstraktom. Petrijeve zdjelice su inkubirane pri temperaturi od 37 °C. Nakon vremenskog razdoblja od 48 sati očitava se broj bakterija, no tijekom navedenog vremenskog razdoblja nije došlo do porasta kolonija. Kod četiri uzorka voćnih sokova nije dokazana prisutnost ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija.

Prisutnost bakterija *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus* dokazuje se porastom kolonija na određenoj hranjivoj podlozi na način da je 100 µl uzorka voćnih sokova nasadeno na hranjive podloge koje su inkubirane pri 37 °C tijekom 24 sata. Nakon propisanog vremenskog perioda također nije došlo do porasta kolonija na hranjivim podlogama te nije dokazana prisutnost bakterija *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus*

*cereus*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus* u uzorcima voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje.

Prisutnost kvasaca i plijesni ispitivana je na način da je 100 µl svakog uzorka voćnog soka nasadeno na Sabouraud agar. Hranjive podloge su inkubirane na 37 °C tijekom 48 sati te nije došlo do porasta kolonija kvasaca i plijesni u uzorcima voćnih sokova.

Istraživanjem je dokazana mikrobiološka ispravnost voćnog soka miješanog tropskog voća od koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje, zatim multivitamin soka ekološkog podrijetla, soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % konvencionalnog podrijetla te soka od jabuke ekološkog podrijetla jer nije došlo do porasta kolonija na hranjivim podlogama. Ovi su rezultati u skladu s zahtjevima iz Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu te Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu.

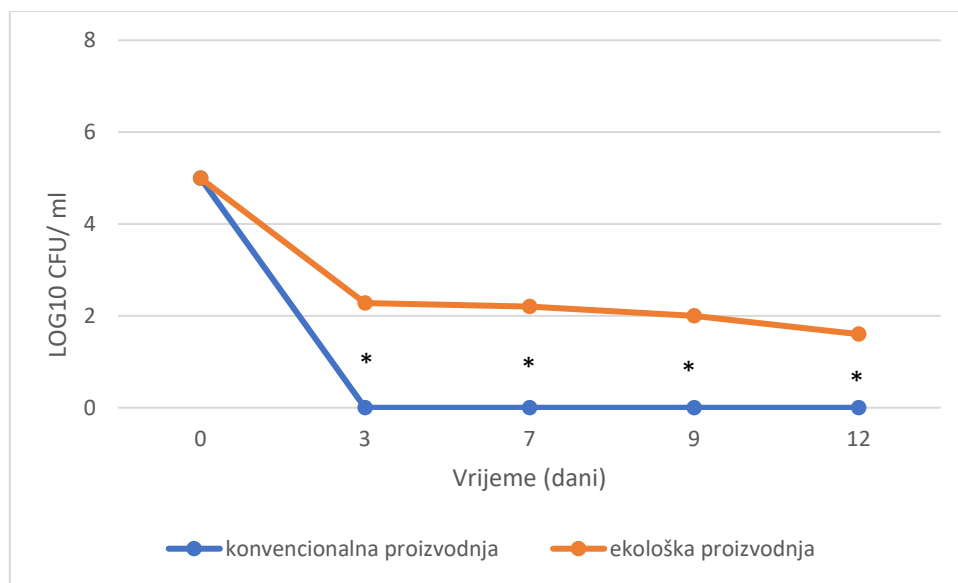
#### 4.2 Kinetika rasta *S. aureus* u voćnim sokovima

Bakterijske suspenzije *S. aureus* dodane su u dva uzorka voćnog soka iz konvencionalne proizvodnje te dva uzorka sokova iz ekološke proizvodnje. Neposredno nakon inokulacije, suspenzije su nasadene na Baird Parker agar s ciljem određivanja početne koncentracije bakterija u uzorcima voćnih sokova. Baird Parker se inkubira pri temperaturi od 37 °C tijekom vremenskog razdoblja od 24 sata, a nakon navedenog vremenskog razdoblja očitana je broj bakterija te je iznosio  $1 \times 10^5$  CFU/ml za sve uzorke voćnih sokova iz konvencionalne odnosno ekološke proizvodnje. Pripremljene bakterijske suspenzije voćnih sokova su inkubirane pri 4 °C, 25 °C te 37 °C, a isti postupak nasađivanja suspenzija na Baird Parker ponovljen je trećeg, sedmog, devetog te dvanaestog dana od inokulacije. Broj bakterija *S. aureus* očitava se nakon inkubacije od 24 sati pri 37 °C te je prepoznat po karakterističnoj crno – sivoj boji kolonija.

Treći dan nakon dodatka bakterija u uzorak voćnog soka konvencionalne proizvodnje od miješanog tropskog voća inkubiranog na 4 °C nije došlo do porasta kolonija na Baird Parker agaru. Također do porasta kolonija *S. aureus* nije došlo niti sedmog, devetog i dvanaestog dana od inokulacije.

Trećeg dana od dodatka bakterija u uzorak voćnog soka od miješanog voća ekološke proizvodnje inkubiranog na 4 °C očitana je broj bakterija od  $1,9 \times 10^2$  CFU /ml (Slika 2.). Sedmog dana od inokulacije broj bakterija je iznosio  $1,6 \times 10^2$  CFU/ ml, a broj bakterija devetog

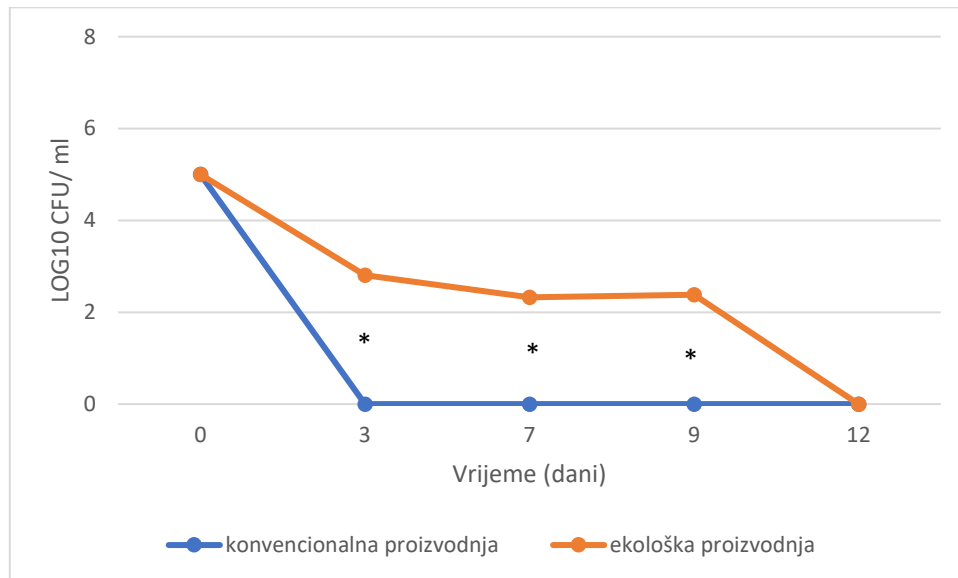
dana od dodatka bakterija broj je iznosio  $1 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 2.). Dvanaestog dana od inokulacije također je očitana pozitivan porast kolonija *S. aureus* te je broj bakterija iznosio  $4 \times 10$  CFU/ml (Slika 2.). Broj bakterija u uzorku voćnog soka ekološke proizvodnje se statistički značajno razlikuje u odnosu na uzorak voćnog soka konvencionalne proizvodnje trećeg, sedmog, devetog i dvanaestog dana od dodatka bakterija u uzorke.



Slika 2. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* u uzorku voćnog soka miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje i uzorku voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 4 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\* p< 0,05).

Na Baird Parker agaru, na kojeg je prethodno nasađen uzorak voćnog soka miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje i inkubiran na 25 °C, trećeg, sedmog, devetog, dvanaestog dana od dodatka bakterija nije došlo do porasta kolonija *S. aureus*. U uzorku soka multivitamin ekološkog podrijetla koji je također bio inkubiran pri temperaturi od 25 °C broj bakterija je očitana trećeg dana te je iznosio  $6,4 \times 10^2$  CFU/ml, dok je sedmog dana od dodatka bakterija broj bakterija iznosio  $2,1 \times 10^2$  CFU/ml, a devetog dana broj bakterija bio je  $2,4 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 3.). Dvanaestog dana od inokulacije nije očitana broj bakterija. Broj bakterija u uzorku voćnog soka ekološke proizvodnje se statistički značajno razlikuje u odnosu na uzorak voćnog soka

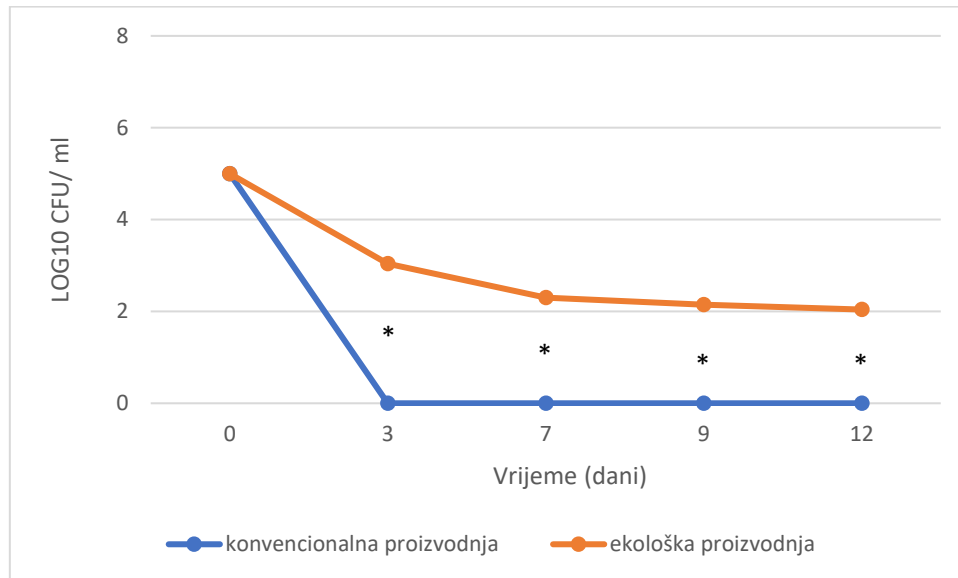
konvencionalne proizvodnje trećeg, sedmog i devetog dana od dodatka bakterija u uzorke voćnih sokova.



Slika 3. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* u uzorku voćnog soka miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje i uzorku voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 25 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\*  $p < 0,05$ ).

Isti postupak nasađivanja bakterijske suspenzije ponovljen je i s istim uzorcima voćnih sokova inkubiranih na temperaturi od 37 °C te trećeg, sedmog, devetog te dvanaestog dana od dodatka bakterija u voćni sok miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje nije došlo do porasta bakterija *S. aureus*. S druge strane, kod uzorka voćnog soka multi vitamin ekološkog podrijetla broj bakterija je očitao trećeg, sedmog, devetog te dvanaestog dana od dodatka bakterija. Trećeg dana broj bakterija je iznosio  $1,1 \times 10^3$  CFU/ml, sedmog dana broj bakterija je bio  $2 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 4.). Devetog dana očitao je broj bakterija od  $1,4 \times 10^2$  CFU/ml, dok je dvanaestog dana od inokulacije za isti uzorak broj bakterija iznosio  $1,1 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 4.). Broj bakterija u

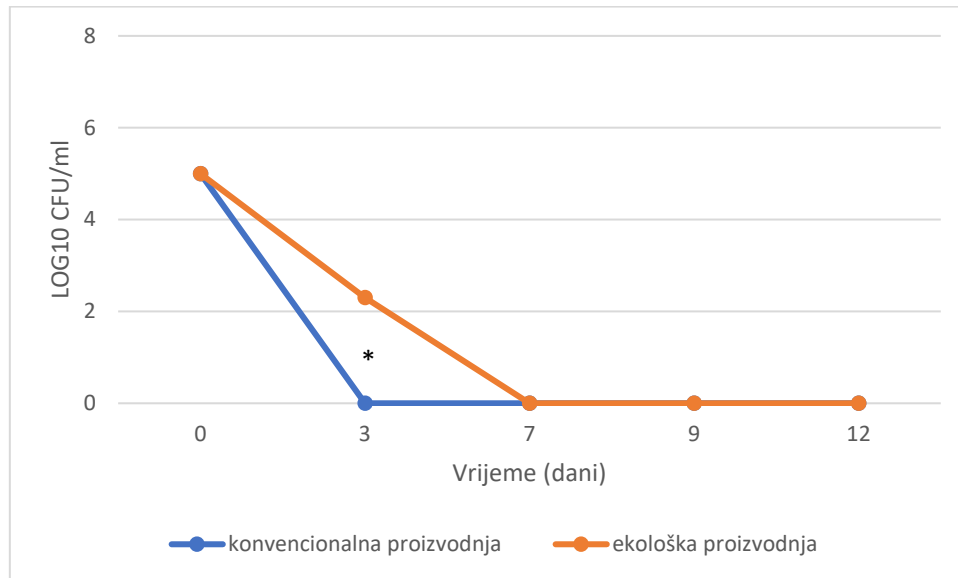
uzorku voćnog soka ekološke proizvodnje se statistički značajno razlikuje u odnosu na uzorak voćnog soka konvencionalne proizvodnje trećeg, sedmog, devetog i dvanaestog dana od dodatka bakterija u voćne sokove.



Slika 4. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* u uzorku voćnog soka miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje i uzorku voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 37 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\* p< 0,05).

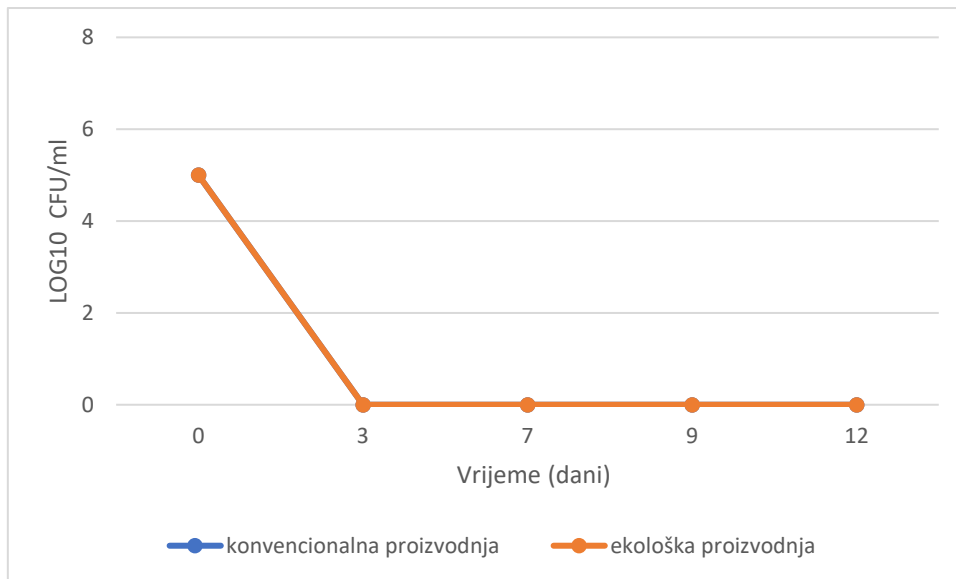
U cilju praćenja kinetike rasta *S. aureus* u uzorku soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje te soka od jabuke ekološke proizvodnje suspenzije su nasađivane na Baird Parker agar također nakon inkubacije pri tri različite temperature. Na Baird Parker agaru na kojeg je nasađena suspenzija soka od jabuke inkubiranog pri 4 °C konvencionalne proizvodnje nije očitao broj bakterija niti jednog dana tijekom istraživanja. Trećeg dana od inokulacije bakterija u uzorak soka od jabuke ekološkog podrijetla došlo je do porasta kolonija *S. aureus* te je broj bakterija iznosio  $2 \times 10^2$  CFU/ ml (Slika 5.). Nadalje, sedmog, devetog i dvanaestog dana od dodatka bakterija u isti uzorak voćnog soka

ekološkog podrijetla nije zabilježen porast bakterija. Broj bakterija u uzorku voćnog soka ekološke proizvodnje se statistički značajno razlikuje u odnosu na uzorak voćnog soka konvencionalne proizvodnje trećeg dana od dodatka bakterija u voćne sokove.



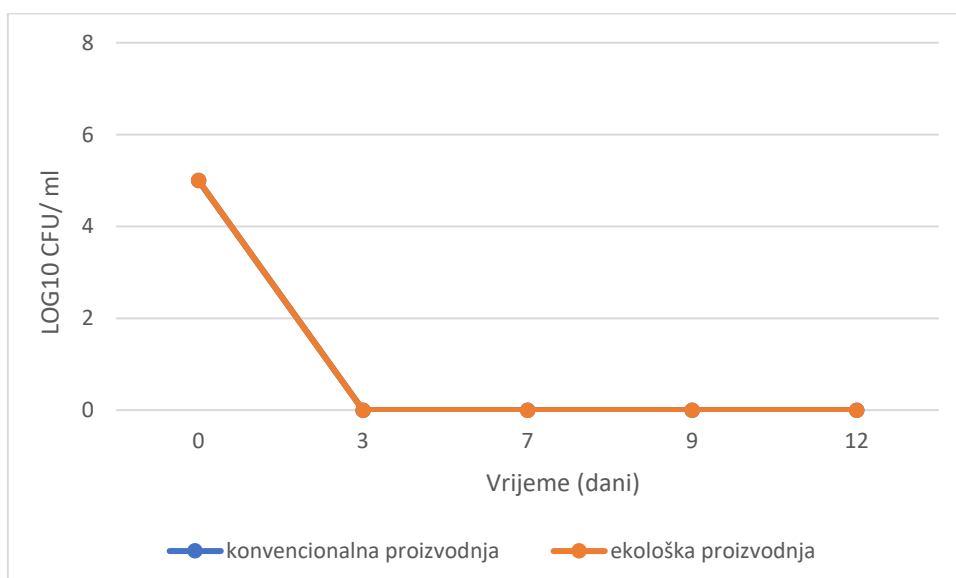
Slika 5. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* u uzorku soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje i uzorku soka od jabuke ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 4 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\*  $p < 0,05$ ).

Trećeg dana od dodatka bakterija u sok od jabuke konvencionalnog i ekološkog podrijetla inkubiranog pri 25 °C nije došlo do porasta broja bakterija na Baird Parker agaru, iako je istraživanje provedeno tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana do porasta kolonija nije došlo tijekom tog razdoblja pa možemo zaključiti kako *S. aureus* ne preživljava u sokovima od jabuke konvencionalne i ekološke proizvodnje pri 25 °C (Slika 6.).



Slika 6. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* u uzorku soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje i uzorku soka od jabuke ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 25 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\*  $p < 0,05$ ).

Kinetika rasta *S. aureus* praćena je i u suspenziji sokova od jabuke inkubiranih pri temperaturi od 37 °C te također kao i kod uzoraka sokova od jabuke inkubiranih na 25 °C tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana nije došlo do porasta kolonija (Slika 7.).



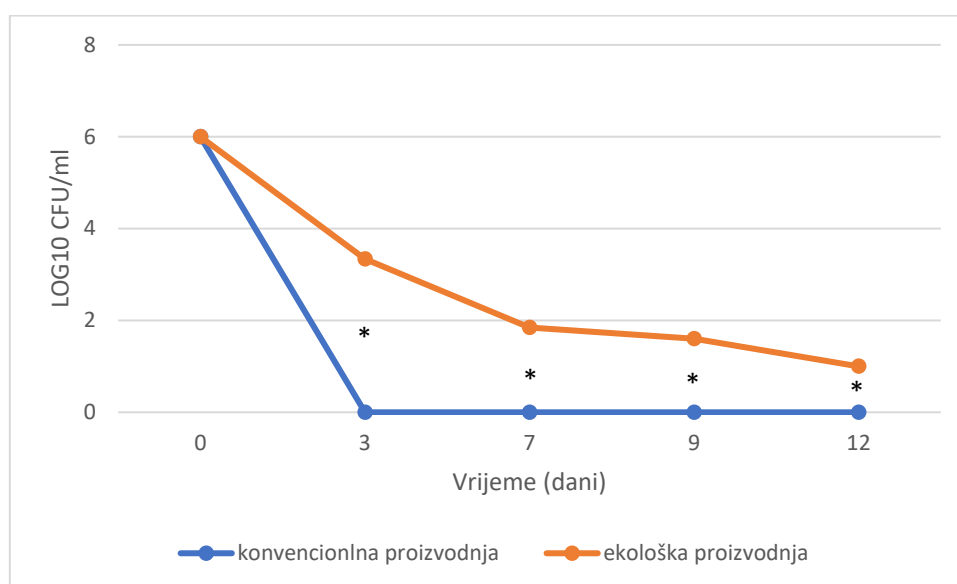


Slika 7. Kinetika rasta bakterije *S. aureus* u uzorku soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje i uzorku soka od jabuke ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 37 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\* p< 0,05).

#### 4.3 Kinetika rasta *E. coli* u voćnim sokovima

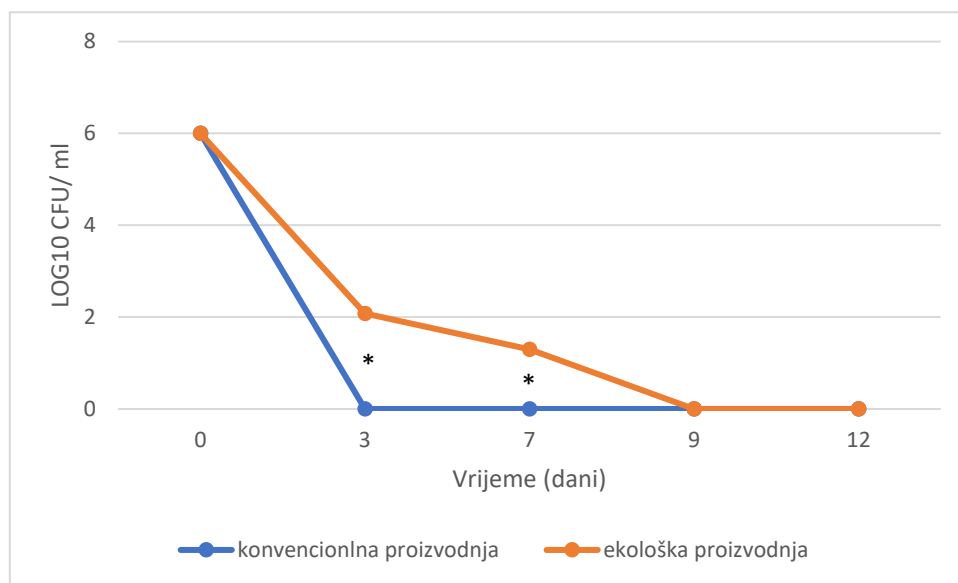
Pripremljene suspenzije bakterija *E. coli* inokulirane su u sve uzorke voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje te su nakon inokulacije suspenzije voćnih sokova nasadene na TBX agar kako bi se odredio početni broj bakterija u uzorcima voćnih sokova. TBX je potom inkubiran na temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata te je nakon toga razdoblja očitao broj bakterija. Broj bakterija iznosio je  $1 \times 10^6$  CFU/ml za sve uzorke voćnih sokova na kojima je provedeno istraživanje. Nadalje, nakon inokulacije sve su suspenzije voćnih sokova inkubirane na tri različite temperature, a isti postupak nasadivanja na hranjive podloge ponovljen je trećeg, sedmog, devetog i dvanaestog dana od dodatka bakterija u uzorke. Hranjive podloge su inkubirane pri 37 °C te je broj bakterija ukoliko je došlo do porasta kolonija očitao nakon 24 sata. Pozitivan porast *E. coli* rezultira plavo – zelenim kolonijama na TBX agaru.

Praćenje kinetike rasta *E. coli* u uzorcima voćnih sokova od miješanog voća inkubiranih pri 4 °C provedeno je tijekom dvanaest dana te već trećeg dana od dodatka bakterija u uzorke voćnog soka od miješanog tropskog voća konvencionalnog podrijetla na TBX agaru nije došlo do pozitivnog porasta kolonija *E. coli*. Nadalje, porast kolonija nije zabilježen niti u narednim danima istraživanja, dok je na TBX agaru na kojeg su nasadene suspenzije soka multivitamin ekološkog podrijetla pozitivan porast kolonija *E. coli* očitao u svim danima istraživanja. Trećeg dana od inokulacije broj bakterija je iznosio  $2,18 \times 10^3$  CFU/ ml, sedmog dana od dodatka bakterija broj bakterija spustio se je do  $7 \times 10$  CFU / ml, a devetog dana od inokulacije do  $4 \times 10$  CFU/ml (Slika 8.). Dvanaestog dana od dodatka bakterija izbrojeno je  $1 \times 10$  CFU/ ml (Slika 8.). Broj bakterija u uzorku voćnog soka ekološke proizvodnje se statistički značajno razlikuje u odnosu na uzorak voćnog soka konvencionalne proizvodnje trećeg, sedmog, devetog i dvanaestog dana od dodatka bakterija u uzorke.



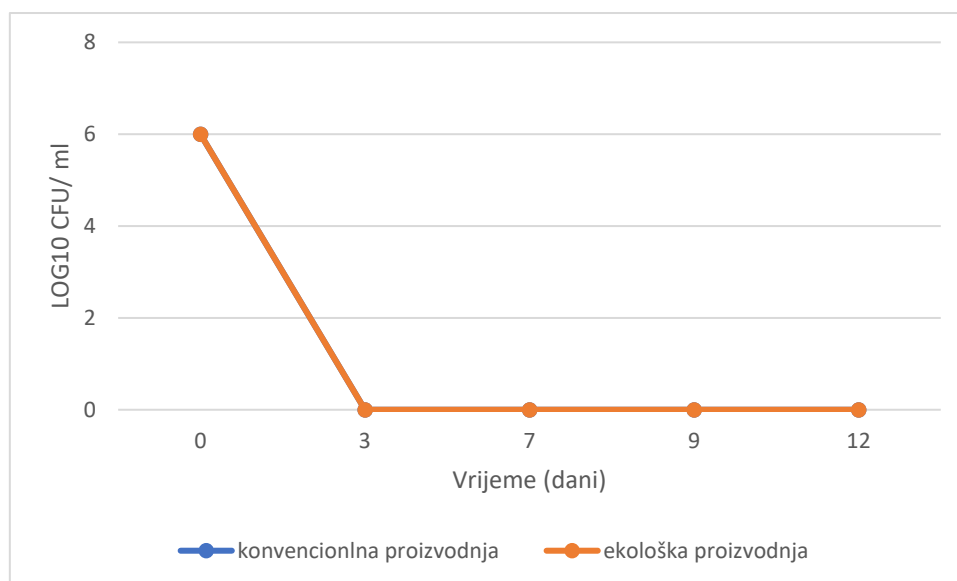
Slika 8. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u uzorku voćnog soka miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje i uzorku voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 4 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\* p < 0,05).

Suspencije sokova miješanog voća konvencionalne i ekološke proizvodnje koje su bile inkubirane na 25 °C također su u određenom volumenu nasađene na TBX agar te kao i kod uzorka soka miješanog voća konvencionalne proizvodnje inkubiranog pri 4 °C ni kod istog uzorka inkubiranog pri 25 °C već trećeg dana od dodatka bakterija u uzorak, na TBX agaru nije došlo do pozitivnog porasta kolonija *E. coli* te također pozitivan porast za isti uzorak nije očitao tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana koliko je trajalo istraživanje. Za razliku od uzorka voćnog soka konvencionalne proizvodnje, porast kolonija *E. coli* dodanih u voćni sok multivitamin ekološkog podrijetla pri 25 °C, zabilježen je porast trećeg i sedmog dana od dodatka bakterija. Trećeg dana od inokulacije broj bakterija je bio  $1,2 \times 10^2$  CFU / ml, dok je sedmog dana od inokulacije izbrojano  $2 \times 10$  CFU/ ml (Slika 9.). Devetog i dvanaestog dana od dodatka bakterija nije došlo do porasta kolonija. Broj bakterija u uzorku voćnog soka ekološke proizvodnje se statistički značajno razlikuje u odnosu na uzorak voćnog soka konvencionalne proizvodnje trećeg i sedmog dana od dodatka bakterija u uzorke.



Slika 9. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u uzorku voćnog soka miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje i uzorku voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 25 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\*  $p < 0,05$ ).

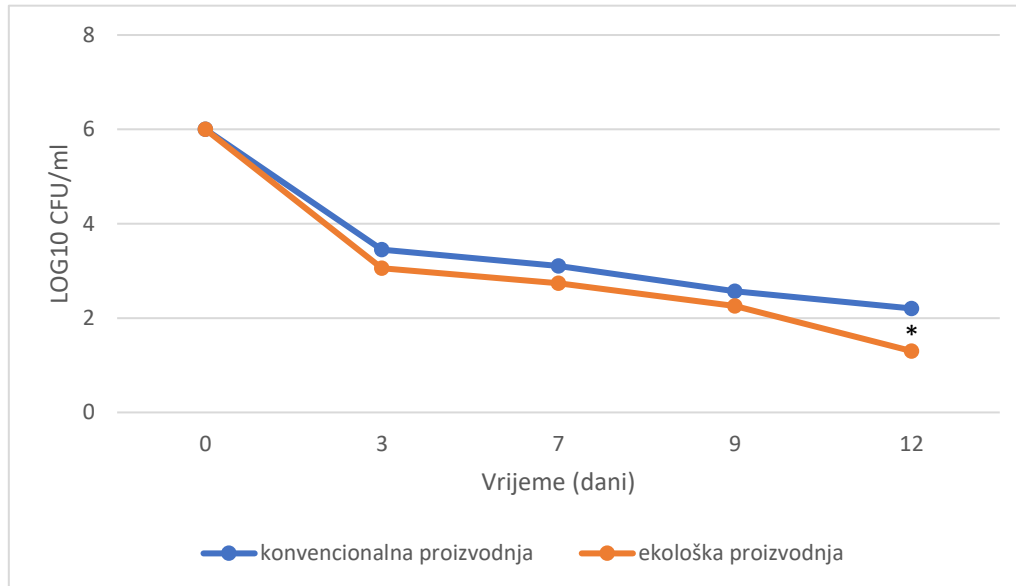
Trećeg dana od dodatka bakterija u uzorke soka od miješanog voća konvencionalnog te ekološkog podrijetla inkubiranih pri 37 °C nije došlo do pozitivnog porasta bakterija na TBX agaru (Slika 10.). S obzirom da je istraživanje provedeno tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana do porasta kolonija nije došlo tijekom navedenog vremenskog razdoblja pa možemo zaključiti kako *E. coli* ne preživljava u sokovima od miješanog voća konvencionalne i ekološke proizvodnje na temperaturi 37 °C.



Slika 10. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u uzorku voćnog soka miješanog tropskog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilom obogaćenog vitaminima iz konvencionalne proizvodnje i uzorku voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 37 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\*  $p < 0,05$ ).

Tijekom praćenja kinetike rasta *E. coli* u uzorcima soka od jabuke konvencionalne i ekološke proizvodnje inkubiranih na 4 °C uzorci su nasadeni na TBX agar s ciljem određivanja broja bakterija. Pozitivan porast kolonija zabilježen je tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana na hranjivim podlogama na kojima su bile nasadene suspenzije voćnih sokova konvencionalnog i ekološkog podrijetla. Trećeg dana od dodatka bakterija u uzorke soka od jabuke od koncentriranog soka od jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje, broj bakterija je iznosio  $2,8 \times 10^3$  CFU/ml (Slika 11.). Sedmog dana od inokulacije bakterija izbrojano je  $1,27 \times 10^3$  CFU/ml, dok je devetog dana za isti uzorak broj bakterija iznosio  $3,7 \times 10^2$  CFU/ml. Dvanaestog dana broj bakterija bio je  $1,6 \times 10^2$  CFU/ml (Slika 11.). Na TBX agaru, na kojeg je nasadena suspenzija soka od jabuke ekološkog podrijetla inkubirana na 4 °C, broj bakterija trećeg dana od inficiranja je iznosio  $1,14 \times 10^3$  CFU/ml. Sedmog dana od dodatka broj bakterija bio je  $5,5 \times 10^2$  CFU/ml, dok je devetog dana broj bakterija iznosio  $1,8 \times 10^2$  CFU/ml. Dvanaestog dana od inokulacije bakterija broj se spustio do  $2 \times 10$  CFU/ml (Slika 11.). Broj bakterija bio je statistički značajno viši u uzorku voćnog soka konvencionalne proizvodnje u

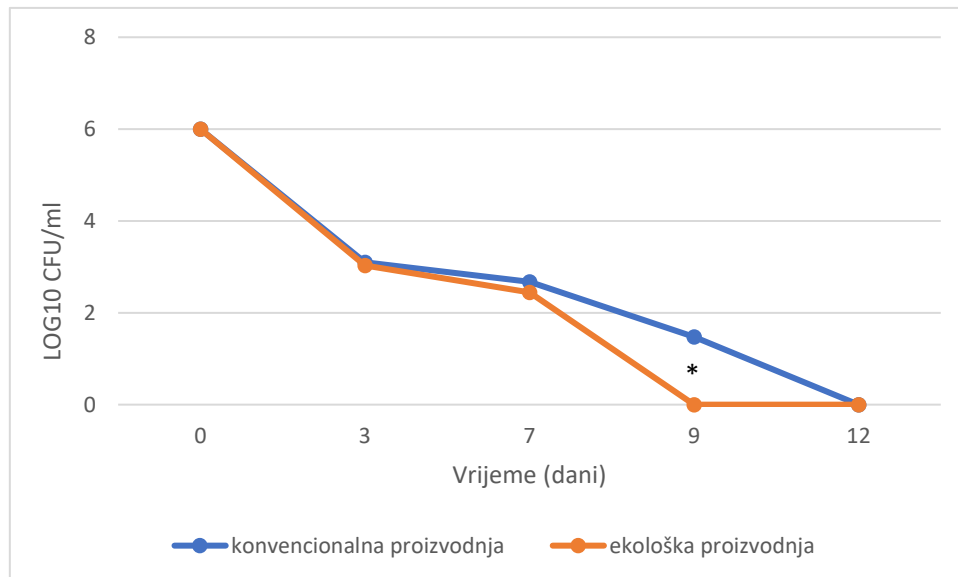
odnosu na uzorak voćnog soka ekološke proizvodnje dvanaestog dana od dodatka bakterija u uzorke voćnih sokova.



Slika 11. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u uzorku soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje i uzorku soka od jabuke ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 4 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\*  $p < 0,05$ ).

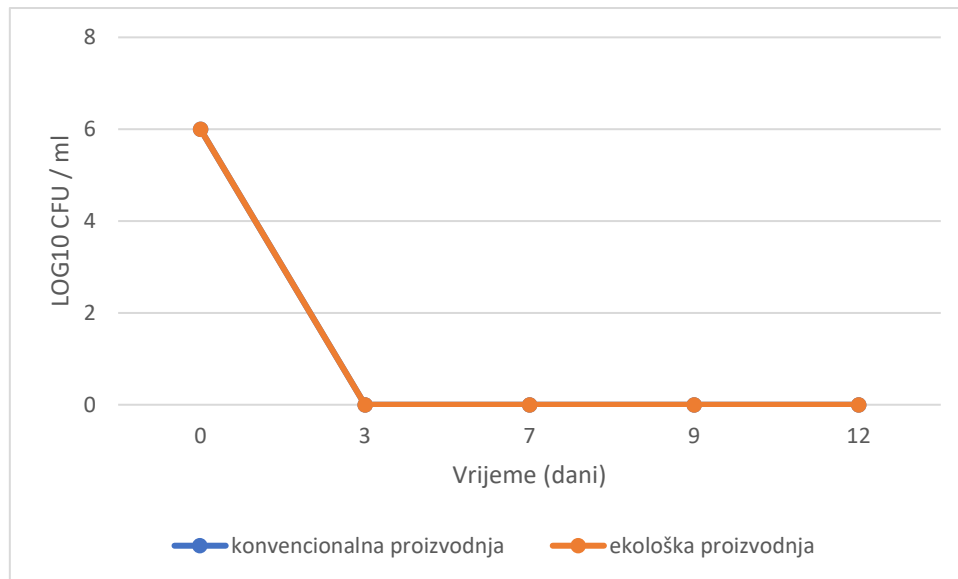
Praćenje kinetike rasta *E. coli* u uzorcima voćnih sokova od jabuke inkubiranih pri 25 °C također je provedeno tijekom dvanaest dana. Za uzorke voćnog soka od jabuke konvencionalne proizvodnje, broj bakterija trećeg dana od dodatka bakterija iznosio je  $1,26 \times 10^3$  CFU/ml. Sedmog dana broj bakterija se spustio do  $4,7 \times 10^2$  CFU/ml, dok se devetog dana od dodatka broj bakterija spustio do  $3 \times 10$  CFU/ml. Dvanaestog dana od inokulacije nije zabilježen porast kolonija *E. coli* na TBX agaru. Uspoređujući rezultate za uzorke voćnog soka od jabuke ekološke proizvodnje inkubiranih pri istoj temperaturi od 25 °C, trećeg dana od dodatka bakterija u sokove broj bakterija je iznosio  $1,08 \times 10^3$  CFU/ml (Slika 12.). Sedmog dana broj bakterija za isti uzorak inkubiran pri istoj temperaturi je iznosio  $2,8 \times 10^2$  CFU/ml. Devetog te dvanaestog dana nije uočen pozitivan porast kolonija na agaru (Slika 12.). Broj bakterija bio je

statistički značajno viši u uzorku voćnog soka konvencionalne proizvodnje u odnosu na uzorak voćnog soka ekološke proizvodnje devetog dana od dodatka bakterija u uzorke voćnih sokova.



Slika 12. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u uzorku soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje i uzorku soka od jabuke ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 25 °C. Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\*  $p < 0,05$ ).

Kinetika rasta *E. coli* praćena je i u suspenziji sokova od jabuke konvencionalne i ekološke proizvodnje inkubiranih pri temperaturi od 37 °C te tijekom vremenskog razdoblja od 12 dana nije došlo do porasta kolonija (Slika 13.). Prema rezultatima ovog istraživanja možemo zaključiti kako se *E. coli* ne razmnožava u navedenim sokovima pri 37 °C.



Slika 13. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u uzorku soka od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje i uzorku soka od jabuke ekološke proizvodnje nakon inkubacije pri temperaturi od 37 °C . Pokusi su ponovljeni tri puta, a na grafu je prikazana srednja vrijednost (\* p< 0,05).

## 5. RASPRAVA

Kvarenje hrane je svaka promjena u hrani kojom se ona pretvara iz zdravstveno ispravne u neprihvatljivu te opasnu za zdravlje čovjeka. Uslijed rasta i razmnožavanja mikroorganizama u hrani dolazi do promjene boje, mirisa, okusa i sastava hrane (4,5,6). Cilj ovog istraživanja koje je provedeno u svrhu diplomskog rada bio je ispitati mikrobiološku ispravnost četiri uzorka voćnih sokova ispravnog roka trajanja. Prvi uzorak voćnog soka je osvježavajući, mutni, negazirani, bezalkoholni voćni sok miješanog voća iz koncentriranog soka sa šećerima i sladilima obogaćen vitaminima iz konvencionalne proizvodnje. Drugi uzorak je sok multivitamin ekološke proizvodnje. Treći uzorak voćnog soka predstavlja sok od jabuke od koncentriranog soka jabuke s udjelom voća 100 % iz konvencionalne proizvodnje, dok je četvrti uzorak voćnog soka organski sok od jabuke iz ekološke proizvodnje. Sva četiri uzorka voćnog soka su podvrgnuta mikrobiološkom ispitivanju te je u uzorcima sokova ispitivana prisutnost ukupnih aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Enterococcus* te prisutnost kvasaca i plijesni. S obzirom da su rezultati bili negativni tj. do pozitivnog porasta kolonija nije došlo, može se zaključiti da su ispitivani uzorci voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje mikrobiološki ispravni. Ovi su rezultati s skladu s zahtjevima iz Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu i Pravilnika o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Rezultati prijašnjih istraživanja koje je obuhvatilo 120 uzoraka konvencionalnih pasteriziranih sokova pokazuju da su kvasci dokazani u 65 % uzoraka, dok je primjerice *S. aureus* identificiran u 3,34 % uzoraka. Također, provedeno istraživanje dokazalo je prisutnost EHEC. *Salmonella*, *Enterobacteriaceae*, *L. monocytogenes* te ostali sojevi *E. coli* nisu bili identificirani u ispitivanim uzorcima (18). S obzirom da rezultati našeg istraživanja na četiri uzorka dokazuju mikrobiološku ispravnost svih uzoraka, može se zaključiti da su svi koraci u proizvodnji voćnih sokova ispravno odrađeni te da tijekom distribucije nije došlo do oštećenja ambalaže. Međutim, s obzirom da je broj uzoraka bio četiri uslijed povećanja broja uzoraka postojao bi veći rizik od identificiranja bakterija te kvasaca i plijesni.

S obzirom da je dokazana mikrobiološka ispravnost voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje, cilj je bio odrediti kinetiku rasta bakterija *S. aureus* i *E. coli* u četiri uzorka voćnih sokova. Hipoteza istraživanja proizlazi iz činjenice da temperatura utječe na kvarenje sokova te s obzirom da se kod ekoloških proizvoda tijekom pripreme i proizvodnje moraju razviti alternativni načini održavanja plodnosti tla te zdravlja biljaka i životinja jer je



uporaba umjetnih gnojiva, pesticida i herbicida ograničena, moglo se pretpostaviti kako je mikrobiološko kvarenje učestalije u voćnim sokovima iz ekološke proizvodnje. Za određivanje kinetike rasta pripremljena je bakterijska suspenzija, a bakterija koja je korištena je soj ATCC 29213 *S. aureus*, odnosno soj ATCC 25922 *E. coli* te su potom pripremljene bakterijske suspenzije bile dodane u voćne sokove. Tako pripremljeni uzorci su bili inkubirani na tri različite temperature od 4 °C, 25 °C i 37 °C. Neposredno nakon dodatka bakterija u uzorke voćnih sokova, uzorci su nasadeni na Baird Parker hranjivu podlogu u cilju određivanja broja bakterija *S. aureus*, odnosno na TBX hranjivu podlogu u cilju određivanja broja bakterija *E. coli*. Broj bakterija očitani su nakon vremenskog razdoblja od 24 sata. Isti postupak nanošenja na hranjive podloge za sve uzorke je ponovljen trećeg, sedmog, devetog i dvanaestog, dana od dodatka bakterija. Porast kolonija *S. aureus* na Baird Parker hranjivoj podlozi prepoznat je po crno-sivoj boji kolonija s halo zonom, dok se porast *E. coli* na TBX hranjivoj podlozi očituje po karakteristično plavo-zelenim kolonijama.

*S. aureus* je gram negativni, koagulaza pozitivni, fakulativno anaerobni kok koji kod ljudi uzrokuje široki raspon bolesti, od kožnih infekcija do upale pluća i sepse, a liječenje je otežano s obzirom na otpornost ovog patogena prema antibioticima (19). *S. aureus* posjeduje sposobnost prilagodbe na različite uvjete okoline te su bakterije prisutne u zraku, prašini, vodi i kanalizaciji. Istraživanja su dokazala da se bakterije mogu razmnožavati uslijed visoke koncentracije šećera i visokog postotka soli (19,25). Nadalje, prethodno je dokazano da *S. aureus* raste i razmnožava se u temperaturnom rasponu od 7 °C do 48 °C, no dokazana optimalna temperatura za razmnožavanje je od 35 °C do 40 °C (24). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je bakterija *S. aureus* preživjela u uzorku voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje pri sve tri spomenute temperature i da je najveći broj bakterija očitani trećeg dana od dodatka bakterija u voćni sok te da nakon toga broj bakterija postupno pada. Bakterija *S. aureus* nije preživjela u voćnom soku miješanog voća konvencionalne proizvodnje tijekom ispitivanog razdoblja od dvanaest dana. Nadalje, tijekom praćenja kinetike rasta *S. aureus* u sokovima od jabuke, do preživljavanja bakterija došlo je samo u uzorku voćnog soka ekološke proizvodnje koji je bio inkubiran na 4 °C. Broj bakterija očitani su samo trećeg dana od dodatka bakterija u uzorke, dok tijekom ostatka vremenskog razdoblja u kojem je provedeno istraživanje porast bakterija nije zabilježen. Isto kao i za uzorke miješanog voćnog soka konvencionalne proizvodnje tako i za sok od jabuke konvencionalne proizvodnje nije došlo do preživljavanja *S. aureus* tijekom dvanaest dana istraživanja. Nadalje, prilikom praćenja kinetike rasta *S. aureus* u suspenziji sokova inkubiranih na 25 °C i 37 °C nije došlo do porasta kolonija. S obzirom na

rezultate dobivene uslijed praćenja kinetike rasta *S. aureus* u voćnim sokovima, možemo zaključiti da bakteriji za preživljavanje najviše odgovara sok multivitamin ekološke proizvodnje, dok do razmnožavanja navedene bakterije nije došlo u niti jednom uzorku voćnog soka. Razlozi tome mogu biti nizak pH te nedostatak hranjivih tvari koje su potrebne bakteriji *S. aureus* za razmnožavanje jer temperatura se smatra samo jednim od čimbenika nužnih uvjeta koji su potrebni bakterijama za razmnožavanje.

*E. coli* je gram negativni, katalaza pozitivni bacil koji čini dio normalne crijevne mikroflore čovjeka i nekih životinja (19). Neki sojevi *E. coli* poznati su uzročnici infekcija probavnog, mokraćnog te središnjeg živčanog sustava (30). Bakterija ima sposobnost preživljavanja u vodi, zemlji, hrani te na raznim predmetima i materijalima ako su zadovoljeni određeni uvjeti (19). Temperatura se smatra jednim od glavnih čimbenika koji utječu na razmnožavanje bakterija, a brojna prijašnja istraživanja dokazala su da je za razmnožavanje *E. coli* optimalna temperatura od 20 °C do 40 °C te da bakterija može dulje preživjeti na nižim nego na višim temperaturama u okolišu. Nadalje, dokazano je da *E. coli* ima mogućnost prilagodbe na temperaturne amplitude (29). Prilikom praćenja kinetike rasta *E. coli* u voćnim sokovima iz konvencionalne i ekološke proizvodnje rezultati ovog istraživanja su pokazali da *E. coli* preživljava pri temperaturi 4 °C i 25 °C u uzorcima voćnog soka multivitamin ekološke proizvodnje te uzorcima soka od jabuke ekološke i konvencionalne proizvodnje. Na TBX hranjivoj podlozi na kojoj su bile nasade suspencije soka multivitamin ekološke proizvodnje inkubiranog na 4 °C, do porasta kolonija je došlo tijekom cijelog razdoblja od 12 dana u kojem je praćena kinetike rasta, dok kod uzorka multivitamin ekološke proizvodnje inkubiranog na 25 °C do porasta je došlo u prvih sedam dana istraživanja te nakon toga na hranjivoj podlozi nije bilo pozitivnog porasta. Bakterije nisu preživjele u uzorku voćnog soka mješovitog voća konvencionalne proizvodnje. S druge strane, bakterije *E. coli* uspješno su preživjele i u uzorcima soka od jabuke i konvencionalne i ekološke proizvodnje inkubiranih pri 4 °C i 25 °C. Trećeg dana od dodatka bakterija u sok od jabuke konvencionalne proizvodnje inkubiranog na 4 °C na hranjivoj podlozi je očitani najveći broj bakterija od  $2,8 \times 10^3$  CFU/ml, dok je istog dana od dodatka bakterija u sok od jabuke ekološke proizvodnje također inkubiranog na 4 °C broj bakterija iznosio  $1,14 \times 10^3$  CFU/ml. U narednim danima istraživanja broj bakterija počeo se je smanjivati. Uslijed praćenja kinetike rasta *E. coli* u sokovima od jabuke inkubiranih na 25 °C također je došlo do porasta kolonija te je pozitivan porast *E. coli* na hranjivim podlogama za uzorke soka od jabuke konvencionalne proizvodnje očitani do devetog dana, dok je za uzorak soka od jabuke ekološke proizvodnje porast zabilježen

do sedmog dana. Nadalje, do pozitivnog porasta nije došlo kod uzoraka voćnih sokova inkubiranih na 37 °C.

Postupno izlaganje umjereno kiselim sredinama kao što su voćni sokovi, može poboljšati preživljavanje *E. coli* u kiseloj hrani. Primjerice, u istraživanju tijekom kojeg je praćeno preživljavanje serotipa *E. coli* O157:H7 sojeva C7927 i ATCC 43895 te *E. coli* O111 u soku od jabuke, dokazano je da je soj *E. coli* O111 najotporniji soj koji je preživio 23 dana pri temperaturi od 1 °C te 6 dana pri 24 °C (47). Usporedno s provedenim istraživanjem tijekom kojeg su bakterije *E. coli* preživjele svih dvanaest dana koliko je trajalo istraživanje pri temperaturi 4 °C u uzorcima voćnih sokova konvencionalne i ekološke proizvodnje te sedam dana pri temperaturi 25 °C u uzorku ekološkog soka od jabuke, odnosno devet dana u uzorku soka od jabuke konvencionalne proizvodnje.

Prema rezultatima provedenog istraživanja može se zaključiti da bakterije *S. aureus* i *E. coli* nisu značajni mikrobiološki kvaritelji voćnih sokova. Bakterije u uzorcima voćnih sokova nisu bile dokazane te čak i nakon dodatka bakterija u uzorke nije došlo do rasta i razmnožavanja bakterija.

Na temelju rezultata istraživanja može se zaključiti da uzorci voćnih sokova na kojima je istraživanje provedeno su pogodniji medij za preživljavanje *E. coli* za razliku od *S. aureus* te to potvrđuje dosadašnje rezultate istraživanja koji dokazuju da je bakterija *E. coli* sveprisutan mikroorganizam koji ima sposobnost prilagodbe na temperaturne amplitude te da se može bolje preživjeti na nižim nego na višim temperaturama. Nadalje, može se zaključiti kako bakterijama ukoliko je odgovarajući medij, one će preživljavati, no tijekom određenog vremenskog razdoblja dolazi do smanjenja hranjivih tvari koje su potrebne bakterijama te smanjenja pH koji je prouzročen povećanom koncentracijom kiselih produkata metabolizma koji nastaju tijekom kvarenja pa je stoga i to jedan od razloga zašto je sposobnost preživljavanja bakterija inhibirana. Može se zaključiti kako su uzorci voćnih sokova pogodan medij za preživljavanje bakterija pri određenim temperaturama, međutim u provedenom istraživanju korišteni su uzorci sokova za koje su dobiveni rezultati pokazali da nisu pogodan medij za razmnožavanje *E. coli* i *S. aureus*.

## 6. ZAKLJUČAK

Zaključci koji su doneseni tijekom izrada diplomskog rada „Mikrobiološko kvarenje voćnih sokova konvencionalne i ekološke proizvodnje“:

1. Svi ispitani uzorci voćnih sokova iz konvencionalne i ekološke proizvodnje mikrobiološki su ispravni
2. Bakterija *S. aureus* pokazala je sposobnost preživljavanja u voćnom soku multivitamin ekološke proizvodnje pri 4 °C, 25 °C i 37 °C
3. Bakterija *S. aureus* ne preživljava u uzorcima voćnih sokova od jabuke konvencionalne i ekološke proizvodnje pri 25 °C i 37 °C
4. Bakterija *E. coli* preživljava u uzorku voćnog soka mješovitog voća multivitamin ekološkog podrijetla pri 4 °C te 25 °C
5. Bakterija *E. coli* preživljava u uzorcima sokova od jabuke konvencionalne i ekološke proizvodnje pri 4 °C te 25 °C
6. Bakterija *E. coli* ne preživljava u uzorcima voćnih sokova pri temperaturi 37 °C
7. Bakterija *E. coli* pokazuje bolju sposobnost preživljavanja u voćnim sokovima u odnosu na *S. aureus*
8. Bakterije *S. aureus* i *E. coli* nemaju sposobnost rasta i razmnožavanja u uzorcima voćnih sokova koji su korišteni tijekom istraživanja

## 7. LITERATURA

- (1) Narodne novine službeni list Republike Hrvatske [ Internet ] Pravilnik o voćnim sokovima i njima sličnim namijenjenim za konzumaciju , [ ažurirano 24.4.2013. ; citirano 29.4.2022. ]. Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_04\\_48\\_941.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_04_48_941.html)
- (2) Obradović, V. Tehnologija konzerviranja i prerade voća i povrća (Interna skripta) Veleučilište u Požegi ; 2011. [ ažurirano ; 20.2.2020. ; citirano 9.5.2022. ] . Dostupno na : <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:112:432981>
- (3) Tehnička uputa [ Internet ] Sektor prerade voća i povrća , Sarajevo 2008. [ citirano ; 10.5.2022.] . Dostupno na : [https://www.fmoit.gov.ba/upload/file/okolisne-dozvole/Prerada\\_voca\\_i\\_povrca.pdf](https://www.fmoit.gov.ba/upload/file/okolisne-dozvole/Prerada_voca_i_povrca.pdf)
- (4) Rai Aneja K, Dhiman R, Kumar Aggarwal N, Aneja A. Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices . Int J Microbio. [ citirano 20.4.2022. ] 2014;2014:758942. Epub 2014 Sep 22. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190135/>
- (5) Duraković S. Primjenjena mikrobiologija: Znanstveno stručna biblioteka , Manualia Universitatis Studiorum Zagabiensis . Zagreb, 1996. ; str. 141-146
- (6) Duraković S, Delaš F, Stilinović B, Duraković L. Moderna mikrobiologija namirnica . 1.izd. Manualia Universitatis Studiorum Zagabiensis Zagreb : Kugler ; 2002. str. 178-180 ; 199-201
- (7) Tournas V H, Heeres J, Burgess L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices . Food Microbiol. [ citirano 22.4.2022. ] 2006 Oct;23(7):684-8 . Dostupno na : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002006000232?via%3Dihub>
- (8) Arias C R, Burns JK, Friedrich L M, Goodrich R M, Parish M E. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. Appl Environ Microbiol. . [ citirano 23.4.2022. ] 2002 Apr;68(4):1955-61 . Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC123878/>
- (9) M O Moss. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. J Appl Microbiol. . [ citirano 23.4.2022. ] 2008 May ;104(5):1239-43 . Dostupno na: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03705.x>

- (10) Sylos C M, Rodriguez- Amaya. Incidence of patulin in fruits and fruit juices marketed in Campinas, Brazil. *Food Addit Contam.* [ citirano 24.4.2022. ] 1999 Feb ;16(2):71-4 Dostupno na : <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/026520399284226>
- (11) Steyn C E, Cameron M, Witthuhn R C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment – a review. *Int J Food Microbiol.* [ citirano 23.4.2022. ] 2011 May 14;147(1):1-11. Dostupno na : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160511001413?via%3Dihub>
- (12) Silva FVM, Gibbs P. Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* . [ citirano 24.4.2022. ] 2004;44(5):353–360 Dostupno na: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490489251?journalCode=bfsn20>
- (13) Durak MZ, Churey JJ, Danyluk MD, Worobo RW. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. *International Journal of Food Microbiology.* [ citirano 24.4.2022. ] 2010;142(3):286–291. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160510003764?via%3Dihub>
- (14) Witthuhn RC, Duvenage W, Gouws PA. Evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus* . *Letters in Applied Microbiology* [ citirano 24.4.2022.] 2007;45(2):224–229. Dostupno na : <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2007.02182.x>
- (15) Smit Y, Cameron M, Venter P, Witthuhn RC. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation: a review. *Food Microbiology.* [ citirano 24.4.2022.] 2011;28(3):331–349. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074000201000290X?via%3Dihub>
- (16) Chang S-S, Kang D-H. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology.* [ citirano 25.4.2022.] 2004;30(2):55–74. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15239380/>
- (17) Walker M, Phillips CA. The growth of *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juices and its survival following elevated temperature treatments. *Food Microbiology.* [ citirano 26.4.2022.] 2007;24(4):313–318. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17189756/>

- (18) Vantarakis A, Affifi M, Kokkinos P, Tsibouxi M, Papapetropoulou M. Occurrence of microorganisms of public health and spoilage significance in fruit juices sold in retail markets in Greece. *Anarobe* Volume 17, Issue 6. [ citirano 26.4.2022.] December 2011, pages 288-291. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996411000564>
- (19) Kalenić S. i suradnici, *Medicinska mikrobiologija, Manualia Universitatis Studiorum Zagrabienensis Medicinska naklada*, Zagreb 2013, str. 117-124
- (20) Cheung G Y C, Bae J S, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* Review. *Virulence* [citirano 9.5.2022.] 2021 Dec;12(1):547-569. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7872022/>
- (21) van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, et al. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin Microbiol Rev.* [ citirano 9.5.2022.] 2012;25(2):362–386. Dostupno na : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346297/>
- (22) Nakamura Y, Oscherwitz J, Cease KB, et al. *Staphylococcus* delta-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. *Nature.* [citirano 9.5.2022.] 2013;503(7476):397–401. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4090780/>
- (23) Tsutsura S, Murata M. Temperature dependence of staphylococcal enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus*. *Nihon Rinsho.* [citirano 10.5.2022.] 2012 Aug;70(8):1323-8. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22894066/>
- (24) Hennekinne J A, Buyser M L, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation Review. *FEMS Microbiol. Rev.* [citirano 10.5.2022.] 2012 Jul;36(4):815-36. Dostupno na: <https://academic.oup.com/femsre/article/36/4/815/520403?login=false>
- (25) Jawetz, Melnick & Adelberg. *Medicinska mikrobiologija*, Mc Graw Hill, 26. izdavanje 1. hrv. Izdanje, Split 2015. str. 199-205
- (26) Schmitt M, Schuler-Schmid U, Schmidt-Lorenz W. Temperature limits of growth, TNase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food. *Int J Food Microbiol.* [citirano 11.5.2022.] 1990 Aug;11(1):1-19. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2223519/>
- (27) Tuner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA i suradnici. Methicilin - resizant *Staphylococcus aureus* : an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.*

- [citirano 11.5.2022.] 2019;17(4):203-218. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6939889/>
- (28) McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Yale J Biol. Med. [citirano 12.5.2022.] 2017;90(2):269-281. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5482303/>
- (29) Jang J, H-G Hur, Byappanahalli MJ, Yan T, Ishii S. Environmental *E. coli*: Ecology and Public Health Implications- A Review. J. Appl Microbiol. [citirano 2.5.2022.] 2017 Sep;123(3):570-581. Dostupno na: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13468>
- (30) Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *E. coli*, Clin. Microbiol. Rev. [citirano 3.5.2022.] 1998 Apr;11(2):403. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC121379/>
- (31) Evans DJ, Evans DG, Baron S. *E. coli* in Diarrheal Disease, In Medical Microbiology., 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 25. [citirano 3.5.2022.] Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7710/>
- (32) Tabasi M, Karam MR, Habibi M, Mostafavi E, Bouzaris. Genotype characterization of virulence factors in *E. coli* isolated from patients with acute cystitis, pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. J Clin Diagn [citirano 2.5.2022.] 2016;10(12) Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5296426/>
- (33) Iguchi A, Mentzer A, Kikuchi T, Thomson NR. An Untypeable Enterotoxigenic *E. coli* Represents One of the Dominant Types Causing Human Disease. Microb. Genom. [citirano 3.5.2022.] 2017 Jul 3;3(9) Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5643014/>
- (34) Vipin Madhavan TP, Sakellaris H. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Adv. Appl Microbiol. Review, [citirano 2.5.2022.] 2015;90:155-97 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25596032/>
- (35) Michelacci V, Prosseda G, Maugliani A, Tozzoli R, Sanchez S, Dallmann T, Jenkins C, Caprioli A, Morabito S. Characterization of an Emergent Clone of Enteroinvasive *E. coli* Circulating in Europe. Clin. Microbiol. Infect. [citirano 2.5.2022.] 2016 Mar;22(3):287 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26551840/>



- (36) Beld MJC, Reubsat FAG. Differentiation Between Shigella, Enteroinvasive *E. coli* and Noninvasive *E. coli*. Eur J Clin Microbiol. Infect Dis. [citirano 2.5.2022.] 2012 Jun ;31(6): 899-904 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21901636/>
- (37) Karch H. The Role of Virulence Factors in Enterohemorrhagic Escherichia Coli (EHEC)—associated hemolytic -uremic syndrom . Semin Thromb Hemost. [ citirano 4.5.2022.] 2001 Jun;27(3):207-13 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11446654/>
- (38) Karch H, Köhler B. New Knowledge of the Molecular Biology of Enterohemorrhagic Escherichia Coli. Gesundheitswesen [citirano 4.5.2022.]1999 Oct; 61 Spec No 1:546-51 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10593045/>
- (39) Usajewicz I, Nalepa B .Survival of *E. coli* O157:H7 in Milk Exposed to High Temperature and High Pressure. Food Techol. Biotechol. [citirano 5.5.2022.] 44(1)33-39 (2006.) Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/clanak/161705>
- (40) Hsin-Yi C, Chou CC. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. Int J Food Microbiol. [citirano 14.5.2022.] 2001 Oct 22;70(1-2):189-95 Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11759757/>
- (41) Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1992. April. [ citirano12.5.2022.] 36(4):695-703 Dostupno na : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC189356/>
- (42) Lixz , Plesiat P, Nikaido H. ,The challenges of efflux- mediated antibiotic resistance in Gram negative bacteria. Clin Micobiol. Rev. [ citirano12.5.2022.] 2015 Apr; 28(2):337-418 Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4402952/>
- (43) Tadesse HA, Gidey NB, Workelule K, Hailu H, Gidey S, Bsrat A, Taddele H. Antimicrobial Resistance Profile of *E. coli* Isolated from Raw Cow Milk and Fresh Juice in Mekelle,Tigray, Ethiopia. Vet Med Int. [ citirano12.5.2022.] 2018 Mar 19;2018:8903142. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5884018/>
- (44) Narodne novine službeni list Republike Hrvatske [ Internet ] Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu , [ ažurirano 27.6.2008. ; citirano 26.4.2022]. Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008\\_06\\_74\\_2454.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_06_74_2454.html)

(45) Agroklub [ Internet] Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, [ ažurirano lipanj 2009. ; citirano 27.4.2022.]. Dostupno na: <https://cdn.agroklub.com/upload/documents/vodic-za-mikrobioloske-kriterije-za-hranu.pdf>

(46) Eur-lex.europa.eu, [ Internet ]Uredba ( EU) 2018/848 Europskog parlamenta i Vijeća od 30.svibnja 2018. o ekološkoj proizvodnji i označavanju ekoloških proizvoda te stavljanju izvan snage Uredbe vijeća (EZ) br. 834/2007, [ ažurirano 30.5.2018. ; citirano28.4.2022.] Dostupno na:<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0848&from=NL>

(47) Usaga J, Worobo R W, Zakour O, Zakour P. Effect of acid adaptation and acid shock on thermal tolerance and survival of Escherichia coli O157:H7 and O111 in apple juice. J Food Prot. [ citirano 11.6.2022.] 2014 Oct;77(10):1656-63. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25285481/>

## 8. ŽIVOTOPIS

Chiara Košuta rođena je 27.5.1998. godine u Rijeci. Godine 2005. upisala se je u prvi razred Osnovne škole dr. Andrija Mohorovičić u Matuljima, a osnovnu školu je završila 2013. godine te je iste godine upisala opći smjer Gimnazije Eugena Kumičića u Opatiji. Nakon završetka srednje škole i uspješno položene državne mature godine 2017. upisala je preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Preddiplomski studij završila je 15.9.2020. obranom završnog rada „Utjecaj temperature na kinetiku rasta *E. coli* u mlijeku i jogurtu“ te je potom upisala diplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva pri istom fakultetu.