

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jana KRIŽANEC

**OCENJEVANJE ČISTOSTI DELOVNIH POVRŠIN V
ŠOLSKE KUHINJI Z MERJENJEM ATP-
BIOLUMINISCENCE IN MIKROBIOLOŠKIMI
PREISKAVAMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jana KRIŽANEC

**OCENJEVANJE ČISTOSTI DELOVNIH POVRŠIN V ŠOLSKI KUHINJI
Z MERJENJEM ATP-BIOLUMINESCENCE IN MIKROBIOLOŠKIMI
PREISKAVAMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EVALUATION OF SURFACE CLEANLINESS IN A SCHOOL
KITCHEN BY MEASURING ATP BIOLUMINESCENCE AND
MICROBIOLOGICAL ANALYSIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in v šolski kuhinji na celjskem območju.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič, za somentorico višja znanstvena sodelavka dr. Bojana Bogovič Matijašič in za recenzentko prof. dr. Barbara Jeršek.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Somentorica: višja znanstvena sodelavka dr. Bojana Bogovič Matijašič

Recenzentka: prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jana Križanec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 579.67.08:614.3:643.36(043)=163.6
KG	higiena živilskih obratov/šolske kuhinje/kontrola površin/mikrobiološke tehnike/ATP-bioluminiscenca/brisi površin/primerjava metod
AV	KRIŽANEC, Jana
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (somentorica)/JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2012
IN	OCENJEVANJE ČISTOSTI DELOVNIH POVRŠIN V ŠOLSKI KUHINJI Z MERJENJEM ATP-BIOLUMINISCENCE IN MIKROBIOLOŠKIMI PREISKAVAMI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 45 str., 6 preg., 19 sl., 37 vir.
IJ	SI
JJ	sl/en
AI	V sodobnem svetu okužbe s hrano predstavljajo velik problem. Na vseh stopnjah priprave hrane obstajajo številna tveganja za mikrobiološko kontaminacijo. Posebno pozornost je treba posvetiti hrani za otroke, saj so slednji še bolj dovzetni za mikrobiološke okužbe. Pomembno je, da se v kuhinjah izvaja pravilno čiščenje in njegov nadzor, kar sistem HACCP tudi zahteva. Postavitev sistema HACCP temelji na jasni definiciji principov in načel, ki si sledijo v postopku postavljanja sistema. Namen diplomske naloge je bil preverjanje čistosti delovnih površin v šolski kuhinji z metodo merjenja ATP-bioluminiscence ter z mikrobiološkimi preiskavami brisov. Na podlagi rezultatov meritev smo izračunali korelacijo med obema metodama (korelacija med RLU/100 cm ² in KE/cm ²). Čeprav je korelacija med metodama zelo nizka, pa posamezne vrednosti merjenj ATP-bioluminiscence in rezultati mikrobioloških preiskav brisov nakazujejo, da so dobljene vrednosti znotraj meja predpisanih in lahko zaključimo, da je čiščenje delovnih površin v šolski kuhinji v povprečju dobro.

KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 579.67.08:614.3:643.36(043)=163.6
CX hygiene of food premises/school kitchens/surface controles/microbiological techniques/ATP-bioluminescence/swab surfaces/comparison methods
AU KRŽANEC, Jana
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (somentorica)/JERŠEK, Barbara (recenzentka)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
PY 2012
TI EVALUATION OF SURFACE CLEANLINESS IN A SCHOOL KITCHEN BY MEASURING ATP BIOLUMINESCENCE AND MICROBIOLOGICAL ANALYSIS
TD Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 45 p, 6 tab., 19 fig., 37 ref.
LA SI
AL sl/en
AB Food poisoning presents a big problem in modern world. There are several risks of microbiological contamination on any level of food preparation. A lot of attention is needed especially at monitoring the food for children as they are more susceptible to microbiological infections. To reduce the possibility of contamination it is very important to have proper cleaning of kitchen and to have a control over it, which is demanded by HACCP. The formation of HACCP system is based on clear definition of principles which come after process of the formation of system. The purpose of the research was evaluation of surface cleanliness at a school kitchen by measuring ATP-bioluminescence and by microbiological analyses of swabs. Moreover, the correlation between methods was calculated (correlation between RLU/100 cm² and CFU/cm²). Although the correlation between the two methods was very low, individual results of ATP-bioluminescence and results of microbiological testing of swabs do not exceed prescribed values meaning that the cleaning of working areas in the school kitchen, on average, is well.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SISTEM HACCP V VELIKIH KUHINJAH	2
2.1.1 Definicije sistema HACCP	2
2.1.2 Faze uvajanja sistema HACCP	3
2.2 SPREMLJAJOČI HIGIENSKI PROGRAMI	4
2.2.1 Osebna higiena	5
2.2.2 Čiščenje	7
2.2.2.1 Osnovne lastnosti čiščenja	8
2.2.2.2 Vrsta in lastnosti čiščenja	8
2.2.2.3 Vrsta materiala	8
2.2.2.4 Vrsta in način čiščenja	9
2.2.2.5 Lastnosti čistilnega sredstva	9
2.2.2.6 Osnovne sestavine čistil	10
2.2.2.7 Vrste čiščenja	11
2.2.2.8 Čiščenje v velikih kuhinjah	12
2.3 ORGANIZACIJA DELA V VELIKIH KUHINJAH	13
2.3.1 Delovni procesi priprave hrane	13
2.4 DOBRA PROIZVODNA PRAKSA V VELIKIH KUHINJAH	14
2.4.1 Usposabljanje in higiena zaposlenih	14
2.4.2 Sprejem in skladiščenje živil	15
2.4.3 Higiena proizvodnih obratov	15
2.4.4 Nadzor pitne vode, meritve in analize	16
2.4.5 Zatiranje škodljivcev in škodljivih vplivov	16
2.4.6 Nadzor gradbenega stanja objekta	16
2.5 METODE VZORČENJA IN DOLOČANJA UČINKOVITOSTI ČIŠČENJA	16
2.5.1 Metodi vzorčenja	16
2.5.1.1 Brisi	16
2.5.1.2 Izpirki	17
2.5.2 Metode določanja učinkovitosti čiščenja	17
2.5.2.1 Metoda merjenja ATP-bioluminiscenca	17
2.5.2.2 Merjenje redukcije NAD/NADP	20
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 OPREDELITEV NALOGE	20
3.2 MERJENJE ATP-BIOLUMINISCENCE	27
3.2.1 Princip metode in material	27

3.2.2 Opis metode	27
3.3 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA BRISOV	29
3.3.1 Princip metode	29
3.3.2 Potrebna oprema in material	29
3.3.3 Opis postopka	30
3.3.4 Priprava fiziološke raztopine	30
3.3.5 Priprava gojišč	31
3.3.6 Odčitavanje rezultatov	31
3.3.7 Normativi	32
4 REZULTATI	33
4.1 ČISTOST DELOVNIH POVRŠIN	33
4.2 KORELACIJA MED METODO ŠTETJA KOLONIJ NA PLOŠČAH IN BIOLUMINISCENČNO METODO	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1 RAZPRAVA.....	38
5.2 SKLEPI.....	39
6 POVZETEK	40
7 VIRI	41
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Priporočene meje vrednosti RLU/100 cm ² oz. na enoto pribora za delovne površine s strani proizvajalca (V.I.A d.o.o, 2012).....	28
Preglednica 2: Velikost vzorčnih površin na odvzemnih mestih.	32
Preglednica 3: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena po nenapovedanem in napovedanem vzorčenju po čiščenju.	33
Preglednica 4: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena po napovedanih vzorčenjih.	34
Preglednica 5: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena po prvi in drugi fazi čiščenja.	35
Preglednica 6: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena pred in po generalnem čiščenju.	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Navodilo za pravilno umivanje rok (Knezić in sod., 2010: 36).....	7
Slika 2: Princip bioluminiscence (Sigma-Aldrich, 2012).....	18
Slika 3: OM1 – deska za pripravo zelenjave.....	21
Slika 4: OM2 – korito za pranje zelenjave.....	22
Slika 5: OM3 – rezalnik za kruh.....	22
Slika 6: OM4 – deska za pripravo kruha.....	23
Slika 7: OM5 – korito v centralnem delu kuhinje.....	23
Slika 8: OM6 – kotel za pripravo omak.....	24
Slika 9: OM7 – pladenj.....	24
Slika 10: OM8 – razdeljevalna posoda.....	25
Slika 11: OM9 – krožnik.....	25
Slika 12: OM10 – pribor.....	26
Slika 13: OM11 – nož za pripravo mesa.....	26
Slika 14: OM12 – deska za pripravo mesa.....	27
Slika 15: Prikaz poteka metode merjenja ATP-bioluminiscence (V.I.A d.o.o, 2012).....	28
Slika 16: Luminometer in bris za kontrolo površin (V.I.A d.o.o., 2012).....	28
Slika 17: Sterilni bris in prazna petrijevka.....	29
Slika 18: Površina, pobrisana z mokrim brisom.....	30
Slika 19: Korelacija med metodo štetja kolonij na ploščah z gojiščem PCA ter bioluminiscenčno metodo.....	37

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin tri-fosfat
DHP	dobra higienska praksa
DPP	dobra proizvodna praksa
HACCP	analiza kritičnih kontrolnih točk (ang. Hazard Analysis and Critical Control Point)
KE	kolonijska enota
KKT	kritična kontrolna točka
MK	maščobne kisline
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OM	odvzemno mesto
OM1	deska za pripravo zelenjave
OM2	korito za pranje zelenjave
OM3	rezalnik za kruh
OM4	deska za pripravo kruha
OM5	korito v centralnem delu kuhinje
OM6	kotel za pripravo omak
OM7	pladenj
OM8	razdeljevalna posoda
OM9	krožnik
OM10	pribor
OM11	nož za pripravo mesa
OM12	deska za pripravo mesa
PCA	gojišče Plate Count Agar za določanje skupnega števila mikroorganizmov
RLU	relativne svetlobne enote (ang. Relative Light Unit)
ssp.	subspecies
VRB	gojišče Violet Red Bile Agar za določanje koliformnih mikroorganizmov

1 UVOD

V sodobnem svetu je skrb za človekovo zdravje postala temeljno vodilo. Z zagotavljanjem varne hrane pridobimo zaupanje potrošnikov.

Še več pozornosti pa je potrebno posvetiti varnosti hrane za otroke, saj ti, poleg starejših ljudi, nosečnic in kroničnih bolnikov, predstavljajo eno najranljivejših skupin.

K zagotavljanju varne hrane zelo prispevata higiena prehranskega obrata na vsaki stopnji priprave hrane in higiena zaposlenih. Čiščenje in razkuževanje sta pomembna sestavna dela procesa proizvodnje in prometa z živili in ju mora vsebovati vsaka študija sistema HACCP (Analiza kritičnih kontrolnih točk, ang. Hazard Analysis and Critical Control Point System).

V nalogi smo preverjali čistost delovnih površin v šolski kuhinji na celjskem območju, v kateri pripravijo dnevno približno 800 obrokov, z merjenjem ATP-bioluminiscence ter mikrobiološko preiskavo brisov. Pomembno je, da po opravljenem čiščenju dobimo povratno informacijo o učinkovitosti čiščenja. To nam omogočajo različne metode, med katerimi sta tudi konvencionalna mikrobiološka analiza brisov in hitra metoda merjenja ATP-bioluminiscence.

Problematiko čiščenja smo predstavili s stališča zagotavljanja higiene pri izgradnji in vzdrževanju sistema HACCP.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil preverjanje čistosti delovnih površin v kuhinji z metodo merjenja ATP-bioluminiscence ter s konvencionalno mikrobiološko analizo brisov.

1.2 HIPOTEZA

- Metode merjenja ATP-bioluminiscence z luminometrom omogočajo ustrezno ovrednotenje čistosti delovnih površin.
- Rezultati merjenja ATP-bioluminiscence ter mikrobiološke preiskave brisov (skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov) bodo v korelaciji.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SISTEM HACCP V VELIKIH KUHINJAH

V velikih kuhinjah pripravljajo enkrat ali večkrat dnevno različne jedi za veliko število končnih uporabnikov naenkrat. Primeri takih kuhinj so:

- t.i. menze: prehrana na delovnem mestu
- javni zavodi: bolnišnice, domovi ostarelih, zapori, vojašnice, šole, vrtci
- zdravilišča, hoteli
- catering: organizacija ter gostinska oskrba različnih sprejemov, pogostitev, porok, športnih in javnih prireditev ...

Zaradi številnih različnih delovnih procesov z različnimi živili v istem dnevu in s tem povezanimi različnimi tveganji na relativno majhnem prostoru je izrednega pomena zagotavljanje dobre proizvodne prakse, dobre higienske prakse in nadzora nad postopki priprave jedi, saj lahko v nasprotnem primeru naenkrat oboli večje število ljudi. Glede na to, da nimamo kontinuiranih procesov, ki bi jih lahko avtomatizirali, je najpomembnejše področje pri vzpostavljanju in izvajanju sistema HACCP ozaveščanje in izobraževanje zaposlenih. Poleg tega je predpogoj tudi ustrezna sanitarno-tehnična in higienska ureditev prostorov (Raspor, 2002).

2.1.1 Definicije sistema HACCP

HACCP (ang. Hazard Analysis and Critical Control Point, slo. Analiza tveganja kritičnih kontrolnih točk)

Sistem HACCP je bil razvit v šestdesetih letih ob sodelovanju korporacije Pilsbury, vojaških laboratorijev ZDA in nacionalne aeronavtične vesoljske administracije (NASA), da so se astronautom zagotovila popolnoma varna živila (Pollak in Mehikić, 2002).

Sistem HACCP je mogoče opisati kot:

- instrument, ki pomaga nosilcem živilske dejavnosti, da dosežejo višji nivo varnosti hrane;
- preventivni sistem, ki omogoča prepoznavanje in ocenjevanje morebitnih prisotnih dejavnikov tveganja v živilih, ki lahko ogrožajo zdravje človeka, kakor tudi nadzor nad njimi in ustrezno ukrepanje, ko je to potrebno;
- sistem, ki je osredotočen na obvladovanje kritičnih kontrolnih točk (Pollak in Mehikić, 2002).

Evropska direktiva sveta o higieni živil (2004) opredeljuje sistem HACCP kot preventivni sistem, ki omogoča identifikacijo oziroma prepoznavanje, oceno, ukrepanje in nadzor nad morebitno prisotnimi dejavniki tveganja. Cilj vzpostavljenega sistema HACCP je zagotoviti varna živila na enostaven način; to je sistem, ki je osredotočen na obvladovanje kritičnih kontrolnih točk (Pollak in Mehikić, 2002).

Načrt HACCP je dokument izdelan na podlagi sedmih načel HACCP sistema, ki določa postopke, ki se morajo upoštevati in jim slediti, da se zagotovi nadzor nad tveganji, ki so pomembna za zagotavljanje varnosti živil v proizvodnem postopku ali obratu glede na vrsto in obseg dejavnosti (Mravljak in sod., 2005).

HACCP je kratica za sistematičen pristop, ki ugotavlja in ocenjuje dejavnike tveganja pri posameznih postopkih proizvodnje in prometa z živili in s tem zagotavlja varnost živil (Vanne in sod., 1996).

Varnost živil za potrošnika je v glavnem dosežena z dobro higiensko prakso oz. spremljajočimi higienskimi programi, zagotovljena pa je s sistemom HACCP. Zaposleni so odgovorni za zagotavljanje varnosti živil, morajo te povezave razumeti, da bi HACCP sistem čim bolj uspešno uporabili (Pollak in Mehikić, 2002).

Sistem HACCP – analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk je analitsko orodje, ki vodstvenemu osebju v podjetju omogoča, da uvede stroškovno učinkovit in kontinuiran program zagotavljanja neoporečnosti živil. Z njegovo uporabo sistematično oceni vse faze v procesih nabave, proizvodnje in prodaje ter ugotovi, katere so kritične točke za neoporečnosti živil (Peterman, 2006).

HACCP strategija ima sedem principov:

- vodenje analiz potencialnih tveganj (kemičnega, mikrobnega in fizikalnega)
- določitev kontrolnih točk za določena tveganja
- določitev kritičnih toleranc
- postavitve stalnega nadzornega sistema za doseg te toleranc
- določitev korektivnih ukrepov, če so tolerance prekoračene
- postavitve zapisovalnega in shranjevalnega sistema

postavitve sistema za preverjanje, ki dokumentira, da smo sledili programu HACCP (Pollak in Mehikić, 2002).

2.1.2 Faze uvajanja sistema HACCP

1. PREGLED OBSTOJEČEGA STANJA

- tehnična ustreznost
- izvajanje postopkov
- dokumentacija

2. IZDELAVA TERMINSKEGA PLANA TER DOKUMENTACIJE

- navodila
- obrazci
- načrti (čiščenja, vzdrževanja, izobraževanja)
- opisi živil
- diagrami poteka procesa

3. ANALIZA TVEGANJA TER IZDELAVA NAČRTA HACCP

- izvedemo analizo tveganja za posamezno živilo ali skupino živil
- določimo kritične kontrolne točke (KKT) v procesu
- določimo mejne vrednosti za KKT
- izdelamo načrt nadzora odstopanj od mejnih vrednosti
- določimo korekcijske postopke
- vzpostavimo in vodimo dokumentacijo

4. VERIFIKACIJA

- izvedemo verifikacijo sistema HACCP

5. VZDRŽEVANJE SISTEMA HACCP

- vodenje HACCP tima
- pregled stanja in svetovanje glede uskladitve z zahtevami predpisov
- vizualni mesečni pregled stanja
- analiza tveganja
- izobraževanje, usposabljanje zaposlenih
- obveščanje o novostih na področju predpisov
- svetovanje pri izdelavi ustreznosti navodil, obrazcev
- verifikacija sistema HACCP

(ZZV Novo mesto, 2009).

2.2 SPREMLJAJOČI HIGIENSKI PROGRAMI

Obstajajo higienski programi in dejavnosti, ki so potrebni za uspešno vključevanje in izvajanje sistema HACCP v notranjem nadzoru v živilski dejavnosti. Spremljajoči higienski programi sistema HACCP so neločljivo povezani.

Spremljajoči higienski programi se nanašajo na:

- OBRAT
- TRANSPORT/SKLADIŠČENJE
- OPREMO
- OSEBJE
- PROGRAM ČIŠČENJA IN KONTROLO GOLAZNI
- PROGRAM ODPOKLICA NEUSTREZNIH IZDELKOV (SISTEM SLEDENJA)

(ZZV Novo mesto, 2009).

2.2.1 Osebna higiena

Prenašalci povzročiteljev okužb in zastrupitev s hrano smo občasno tudi ljudje. Zato še posebej imajo veliko moralno in zakonsko/pravno odgovornost delavci v živilski dejavnosti. Pomembno je, da redno vzdržujejo ustrezen nivo osebne higiene kot enega od dejavnikov za zagotavljanje varnih živil/hrane, s katerimi pridejo v stik. Zaradi preprečevanja zdravstvenih posledic, kot posledice nehigienskega ravnanja s hrano/živili je osebna higiena še kako pomembna. Vsak, ki dela z živili, mora nositi primerna, čista in po potrebi zaščitna delovna oblačila, ki jih zagotavlja nosilec živilske dejavnosti (Mravljak in sod., 2005) in mora vzdrževati visoko raven osebne higiene. V kolikor se pojavi pri delavcu sum na bolezen oziroma je že zaslediti obolenje za boleznijo, ki se lahko prenaša z živili, je nosilec živilske dejavnosti odgovoren za to, da oboleli ne delajo na takih delovnih mestih, kjer prihajajo v stik z rizičnimi surovinami, polizdelki in živili. S tem v zvezi mora nosilec živilske dejavnosti izvajati izobraževanje osebja (Pollak in Mehikić, 2002).

Vse osebe, zaposlene v proizvodnji ali prometu z živili, se morajo držati določenih varnostnih ukrepov, da se prepreči kontaminacija živil oziroma hrane. Pomembni so zlasti naslednji dejavniki:

- Čistoča – vsi deli telesa, ki lahko pridejo v stik z živili (roke, podlakti, obraz, lasje) morajo biti čisti. Osebe se ne smejo dotikati nosu in ust.
- Obleka – vsa osebna in delovna obleka se mora vzdrževati čista.
- Rane in praske – vse odprte rane oziroma vreznine in praske morajo biti pokrite z obvezo, ki ne prepušča vodo.
- Zdravstveno stanje – osebe, ki delajo z živili, morajo opozoriti svojega delodajalca o morebitnih bolezenskih znakih (driska, bruhanje...) (Milohnoja in Tomašič, 1996).

Higiena rok je zelo pomemben ukrep pri preprečevanju prenosa okužb. Na zdravi koži rok prevladuje normalna mikrobna populacija kože, ki jo sestavljajo predvsem *Staphylococcus epidermidis*, drugi koagolazno negativni stafilokoki in praviloma nepatogene bakterije rodu *Corynebacterium*. To je stalna bakterijska populacija. Mikroorganizme, ki naseljujejo kožo rok, lahko razdelimo v tri ali štiri skupine:

- Stalno mikrobno populacijo, ki prebiva in se razmnožuje v povrhnjici. Odporna je na majhno količino vode na koži, na zaviralno delovanje prostih maščobnih kislin kožnih lipidov in na nižji pH (5,2-5,8), je pretežno grampozitivna in varuje kožo pred patogenih in oportunističnih mikroorganizmov.
- Prehodno ali začasno mikrobno populacijo na rokah. To so mikroorganizmi, ki se na roke prilepijo ob stiku z okoljem ali drugimi predeli lastnega telesa, zlasti s prenosom iz dihal ali prebavil.
- Prehodna populacija prevladujoče ene mikrobne vrste nastane, če je koža stalno izpostavljena isti mikrobni populaciji okolja z istočasnimi spremembami razmer na koži. Največkrat pride do spremembe v kakovostnih in količinskih odnosih v normalni mikrobni populaciji kože zaradi uničenja antagonistov in lokalnih razmer (spremembe vlažnosti, temperature in pH kože, uničenje normalne populacije na koži, okvare kože).
- Povzročitelji bolezni (Dragaš in Škerl, 2004).

Roke in koža morajo biti:

- brez vidnih gnojnih sprememb
- čiste
- brez nakita
- nohti kratki, prstriženi, nelakirani, brez umetnih nohtov

Koža rok mora biti brez vidnih gnojnih sprememb. V primeru poškodb (vreznine, opekline) je treba rano oskrbeti in jo neprepustno zaščititi.

Roke si je potrebno umiti:

- vedno pred začetkom dela
- med delom, ko se roke umažejo
- ob prehodu nečistih del k čistim
- pred uporabo rokavic in po njej
- pred rokovanju s surovinami, neobdelanimi živili (surovo meso, jajca, surova neočiščena zelenjava in sadje ...), z embalažo ter z odpadki in po njem
- pred rokovanjem s higiensko občutljivimi živili (slaščice, gotove jedi, delikatesna živila ...) in po njem
- po uporabi stranišča

- po kihanju, kašljanju, brisanju nosu, po dotikanju kože obraza in lasišča, po popravljanju las
 - pred jedjo in po jedi
 - po opravljenem čiščenju
 - preden zapustimo delovno mesto
- (ZZV Murska Sobota, 2011a).



Slika 1: Navodilo za pravilno umivanje rok (Knezić in sod., 2010: 36)

2.2.2 Čiščenje

Živilski obrati in njihova okolica morajo biti čisti in dobro vzdrževani, okolica pa protiprašno urejena. Čiščenje odstranjuje umazanijo z delovnih površin, posode in pribora, hkrati pa tudi večino mikroorganizmov. Pri čiščenju stremimo k temu, da ne poškodujemo površin, da postopek ni predrag in da po nepotrebem ne obremenjujemo okolja (Mravljak in sod., 2005).

Čiščenje je uvrščeno med spremljajoče higienske programe, ki so sestavni del notranjega nadzora v živilskih obratih in o katerih obvezno vodimo dokumentacijo. Obvezna dokumentacija o čiščenju je sestavljena iz načrta/plana in vodenja evidenc o čiščenju. V načrtu čiščenja še posebej opredelimo čiščenje tistih območij, kjer pride živilo v neposreden stik s površinami in kasneje ni več toplotno obdelano.

Čiščenje, v ožjem pomenu besede, pomeni odstranjevanje nečistoč z določenih površin. Poleg tekočega sprotnega čiščenja in razkuževanja med delom ali zaključnega čiščenja po

končanem delu moramo organizirati tudi generalno čiščenje in razkuževanje (dnevno, tedensko, trimesečno, letno). Čiščenje in razkuževanje je težko ločiti, saj je učinkovitost razkuževanja zelo vprašljiva brez predhodnega čiščenja.

Čiščenje vsebuje naslednje faze:

- mehanično odstranjevanje nečistoč s površine (ribanje, strganje, vodni curek z visokim tlakom)
 - disperzija nečistoče v čistilnem sredstvu
 - preprečevanje ponovnega usedanja dispergirane nečistoče v čistilnem sredstvu na že očiščene površine – spiranje
 - sušenje
- (Jeršek, 2003).

2.2.2.1 Osnovne lastnosti čiščenja

Pri čiščenju uporabljamo sredstva za čiščenje ali kombinirana sredstva za čiščenje in razkuževanje.

Pri izbiri sredstva in načina čiščenja je pomembno, da upoštevamo naslednje parametre:

- vrsta in lastnosti čiščenja
- vrsta materiala
- vrsta in način čiščenja
- lastnosti čistilnega sredstva
- osnovne sestavine čistil

2.2.2.2 Vrsta in lastnosti čiščenja

Nečistoče v živilski industriji so organskega in anorganskega izvora in po kemijski sestavi zelo heterogene. Za anorganske nečistoče so bolj primerna čistilna sredstva z nizko vrednostjo pH, za organske pa z alkalno vrednostjo pH. Nečistoče so po naravi zelo kompleksne (Jeršek, 2003).

2.2.2.3 Vrsta materiala

V živilstvu se uporabljajo različne vrste materialov, kot so :

- nerjaveča pločevina
- pocinkana pločevina
- steklo

- plastični materiali
- keramika
- beton
- guma in
- les.

Glede na strukturo in hrapavost površine, korozijsko odpornost materiala ter mehansko in toplotno odpornost materiala se izbereta ustrezna tehnologija čiščenja ter primerno čistilno sredstvo. Tako je nerjaveča pločevina korozijsko najbolj odporen material z gladko površino, odporna na visoke temperature. Na drugi strani pa je les za čiščenje zelo problematičen material, ker je prepusten za vlago, maščobe in olja, ni primeren za visokotlačno čiščenje in ni odporen proti alkalnim čistilom (Jeršek, 2003).

2.2.2.4 Vrsta in način čiščenja

Način čiščenja je odvisen od površin, opreme, prostorov, ki se čistijo, ter od razpoložljivih sredstev in opreme za čiščenje. Osnovna načina čiščenja sta ročno in strojno čiščenje. Ročno čiščenje zajema več faz: grobo čiščenje z detergentom in odplakovanje z vodo. Vse bolj se uveljavlja strojno čiščenje s stroji za čiščenje z vodo pod visokim pritiskom, s tlačnimi aparati za penasti nanos čistilnih raztopin, CIP – čiščenje zaprtih sistemov (angl. Cleaning in place) ter drugo. Vso opremo za čiščenje in razkuževanje je potrebno redno čistiti in vzdrževati (Jeršek, 2003).

2.2.2.5 Lastnosti čistilnega sredstva

Idealno čistilno sredstvo mora imeti dobro sposobnost mehčanja vode ter emulgiranja maščob in olj, dobro sposobnost pranja in raztapljanja, preprečevati mora usedanje že dispergiranih delcev, dobro se mora spirati s površin, mora biti dobro topno, ne sme biti korozivno, enostavno za uporabo, ekološko neoporečno ter cenovno primerno (Jeršek, 2003).

Učinkovitost čiščenja je odvisna od mnogih dejavnikov, med katerimi so najpomembnejši:

- čas delovanja,
- temperatura,
- mehanično učinkovanje ter
- vrsta in koncentracija čistilnega sredstva

(Jeršek, 2003).

2.2.2.6 Osnovne sestavine čistil

Čistilna sredstva sestavljajo sestavine, katerih naloga je odstraniti nezaželene snovi s površin. Za doseg tega cilja vsebujejo več sestavin, od katerih vsaka na svoj način prispeva k optimalnim učinkom čiščenja. Sestavine so v odvisnosti od namembnosti čistila različno dozirane. Delimo jih na več skupin, ki so predstavljene v nadaljevanju.

➤ Površinsko aktivne snovi ali tenzidi

Površinsko aktivne snovi ali tenzidi so ena najpomembnejših sestavin čistilnih sredstev. So snovi, katerih molekule so sestavljene iz hidrofilnega in hidrofobnega dela. So organske kemikalije, ki tekočinam znižujejo površinsko napetost. Glede na to, kakšen naboj nastane na hidrofilnem delu molekule pri disociaciji v vodi, ločimo: anionske, kationske in amfoterne tenzide (Mulhall in sod., 2006).

Lastnosti tenzidov so:

- odstranjevanje nečistoč s površin
- adsorbcija na površine
- sposobnost dispergiranja in emulgiranja
- preprečevanje ponovnega usedanja nečistoč nazaj na površine
- dobra topnost
- dobro omakanje površin
- nadzorovano penjenje
- minimalna toksičnost
- ekološka sprejemljivost

(Kegl, 2002).

Pomembna lastnost tenzidov je njihova biološka razgradljivost.

➤ Osnovni gradniki

Naloga osnovnih gradnikov je podpiranje čistilnega delovanja tenzidov tako, da nevtralizirajo negativno delovanje tvorcev trdote vode, ki jih sicer pretežno sestavljajo kalcijevi in magnezijevi ioni. Splošno je znano, da mehčana voda veliko bolje čisti in pere kot trda voda. Nekateri osnovni gradniki pomagajo pri razpadu mase v manjše delce in disperzijo le-teh v tekočini.

Med osnovne gradnike sodijo (Kegl, 2002):

- alkalijske soli
- kompleksanti ali sekvestreni
- ionski izmenjevalci

➤ Belila

Beljenje pomeni vsako spremembo, ki ima za posledico boljše reflektiranje vidne svetlobe objekta po obdelavi. Belilne učinke dosežemo s spremembo ali odstranitvijo nečistoč, ki so na površini. Poteka lahko na fizični ali kemični način. Sredstva, ki jih v ta namen večinoma uporabljamo, so oksidanti in delujejo običajno na osnovi aktivnega kisika ali aktivnega klora. Ob tem, da imajo ta sredstva belilni učinek, poteka hkrati tudi razkuževanje, saj te snovi istočasno uničujejo mikroorganizme (Kegl, 2002).

➤ Alkalije

Alkalije zelo dobro odstranjujejo maščobe. Pri tem pride do kemične reakcije, pri katerih nastanejo mila. Ker so mila anionski tenzidi, še dodatno pomagajo pri procesu čiščenja. Predstavnik sta natrijev in kalijev hidroksid. Natrijev hidroksid je izredno močna baza, nastane pri reakciji natrija z vodo (Kegl, 2002).

➤ Kisline

Kisline vsebujejo zlasti čistila, namenjena odstranjevanju mineralnih oblog, kot je npr. vodni kamen. Šibke kisline, kot so mlečna in citronska kislina, delujejo tudi na mikroorganizme – delujejo bakteriocidno (Arvanitoyannis in Kassaveti, 2009).

➤ Pomožne sestavine

Vse ostale sestavine, brez katerih si čistilnih sredstev ne moremo predstavljati, uvrščamo med pomožne sestavine. Sem sodijo: encimi, topila, snovi, ki preprečujejo ponovno odsedanje nečistoč na površino, sredstva, ki omogočajo topnost sicer netopnih sestavin, regulatorji pene, inhibitorji korozije, parfumi, barve, stabilizatorji in konzervansi (Kegl, 2002).

2.2.2.7 Vrste čiščenja

Glede na to, ali čistimo na suho ali pa pri tem uporabljamo tekoče čistilne raztopine, ločimo suho in mokro čiščenje (Kegl, 2002).

➤ Suho čiščenje

O suhem čiščenju govorimo takrat, kadar pri čiščenju uporabljamo mehanske postopke, ne da bi pri tem uporabljali vodo. Uporabljamo ga, kadar imamo opravka s higroskopskimi živili, ki bi bila ob stiku z vodo poškodovana ali uničena, ali v primeru, ko bi lahko ob stiku z vodo nastale za čiščenje težko odstranljive obloge (IVZ Republike Slovenije, 2009).

➤ Mokro čiščenje

Mokro čiščenje v praksi najpogosteje uporabljamo, vendar moramo najprej izbrati najprimernejši čistilni sistem.

Pri mokrem čiščenju izbiramo na splošno med sledečimi tipi čistilnih sistemov:

- ročno čiščenje
- sistem z uporabo pene ali gelov
- sistem visok pritisk-nizek volumen
- sistem nizek pritisk-velik volumen
- sistem CIP

(IVZ RS, 2009)

2.2.2.8 Čiščenje v velikih kuhinjah

➤ Ročno čiščenje

Večina čiščenj in dezinfekcij v velikih kuhinjah se še vedno opravlja ročno. Delovne površine, aparate in stroje čistimo z rahlo alkalnimi sredstvi na osnovi neionskih in anionskih tenzidov. Če se le da, se pri rednem čiščenju izogibamo uporabi čistilnega mleka, saj ta vsebuje abrazivne komponente, ki poškodujejo površine. Higiensko kritična mesta običajno dezinficiramo s sredstvi na osnovi aktivnega klora. Kadar izvajamo kombinirano čiščenje in dezinfekcijo, so ta sredstva običajno na osnovi kationskih in neionskih tenzidov. Zapečene maščobe čistimo z močno alkalnimi tenzidnimi sredstvi. Kuhinjska tla, zlasti v večjih kuhinjah, čistimo strojno, predvsem zaradi boljših učinkov čiščenja, pri čemer pomagajo alkalna tenzidna sredstva.

Za hitro dezinfekcijo kuhinjskih strojev, rezalnih desk in druge opreme se danes uporabljajo dezinfekcijska sredstva na osnovi alkohola, ki delujejo hitro in učinkovito in jih ni potrebno izpirati (Kegl, 2002).

Za ročno pranje posode se priporoča trodelno korito, posebno za pranje, izpiranje in dezinfekcijo. Da bi kemijsko sredstvo delovalo na pravilen način, je pomembno, da sledimo navodilom proizvajalca, ki se nanaša na kontaktni čas in temperaturo delovanja kemijskega sredstva. Pomite posode ni primerno brisati, saj so čistilne krpe in brisače so lahko kontaminirane z mikroorganizmi in nečistočami, ki se lahko prenesejo na posode (Knezić in sod., 2010).

➤ Strojno pomivanje posode

Stroj za pomivanje posode zagotavlja, da je posoda dobro oprana in higiensko ustrezna, zato mora biti stroj primerno vzdrževan in redno čiščen. Pomivalni stroj je namreč lahko idealno mesto za razvoj mikroorganizmov. Za zagotavljanje higiene je pomembna temperatura delovanja pomivalnega stroja, ki naj bi dosegala vrednosti:

- temperatura pomivanja v zadnji pomivalni komori: 55-65 °C

- temperatura izpiranja: 80-85 °C (Kegl, 2002).

Pri strojnem pomivanju posode moramo:

- stroj redno čistiti
- skrbeti za pravilno delovanje stroja
- preveriti, če je posoda čista in suha po pranju
- po potrebi izvesti korektivne ukrepe in zadeve evidentirati (Knezić in sod., 2010).

V okviru sistema HACCP se priporoča uvedba monitoringa strojnega pomivanja posode, pri čemer se običajno nadzoruje temperatura in spremlja poraba čistilnih sredstev.

2.3 ORGANIZACIJA DELA V VELIKIH KUHINJAH

V osrednji kuhinji se hrana pripravi. Po pripravi sledi takojšnja strežba ali razvoz in strežba v razdelilnih kuhinjah. Razvoz je lahko:

- notranji (npr. razvoz do različnih jedilnic ali razdeljevalnih kuhinj v istem obratu, razvoz do prostora javne prireditve, razvoz do posameznih bolnišničnih oddelkov) ali
- zunanji (npr. razvoz v različne razdeljevalne kuhinje izven obrata, kjer je osrednja kuhinja, razvoz in postrežba na zabavah, prireditvah) (Vouk Grbac in Vidović, 2002).

Razdeljevanje hrane za različne lokacije lahko poteka na dva načina:

- klasični način, kjer se v osrednji kuhinji hrana razdeli v večje posode za celoten oddelek oziroma posamezno lokacijo in se hrano v razdeljevalnih kuhinjah deli na posamezne porcije ali pa
- t.i. tabletni sistem, kjer se v centralni kuhinji za tekočim trakom pripravi posamezna porcija, t.i. »tableta«.

Sistem HACCP je potrebno vzpostaviti in izvajati na vse lokacijah, kjer se manipulira z živili in hrano, t.j. v vseh prostorih osrednje kuhinje, razdeljevalnih kuhinj in drugih gostinskih obratih (Vouk Grbac in Vidović, 2002).

2.3.1 Delovni procesi priprave hrane

V kletnem delu kuhinje si delovni prostori sledijo po namembnosti – skladišča, hladilnice živil in pijač ter pripravljavnica sadja in zelenjave.

V pritličju so priročna skladišča. Hladilnice hitro pokvarljivih živil, fina priprava mesa in rib, fina priprava zelenjave, priprava zajtrkov, hladilni del, termična linija, priprava dietne

hrane, pomivalnica bele in kuhinjske posode ter ločeni topli in hladni slaščičarski prostor. Proces poteka krožno, tako ni križanja čistih in nečistih poti (Sraka-Šadl, 2002).

Upoštevana so načela glede prezračevanja in klimatizacije prostorov z izsesavanjem onesnaženega zraka in vpihovanjem čistega ogretega zraka. Izvedba delovnih površin je v eni plošči, termični blok je v blok izvedbi, da je možno čiščenje in razkuževanje tudi spodnjih površin opreme in tal. Umivalniki so na nožni pogon in zagotavljajo umivanje in razkuževanje rok brez dotika rok in pip. Nečiste poti so označene z rdečo talno keramiko (Sraka-Šadl, 2002).

V delovnem procesu se ločeno razvrščajo odpadki, ki se s posebnim dvigalom prepeljejo v prostor za odpadke. Vsa strojna oprema, termični blok, konvektomati, delovne in odlagalne površine, nape, zaščitne rešetke, stenske obrobe, vozički in vsa kuhinjska posoda so iz nerjavečega jekla. V celoti je omogočeno spremljanje kritičnih parametrov – temperature in koncentracije pomivalnih sredstev na pomivalnih strojih, temperature za termično obdelavo živil, temperature pri hlajenju in zamrzovanju živil, porabe vode, plina in elektrike na računalniku (Sraka-Šadl, 2002).

2.4 DOBRA PROIZVODNA PRAKSA V VELIKIH KUHINJAH

Dobra proizvodna praksa (DDP) v javnih kuhinjah zajema:

- usposabljanje in higieno zaposlenih,
- sprejem in skladiščenje živil,
- higieno proizvodnih obratov,
- ravnanje z odpadki,
- nadzor in servisiranje strojev in naprav,
- nadzor pitne vode, meritve in analize,
- zatiranje škodljivcev in škodljivih vplivov ter
- nadzor gradbenega stanja objektov (Bernik, 2002).

2.4.1 Usposabljanje in higiena zaposlenih

Vodje kuhinje morajo organizirati izobraževanja o higieni za osebje kuhinje. O tem je potrebno voditi evidenco (Knezić in sod., 2010).

Osebje usposabljamo s ciljem upoštevanja higienskih zahtev pri proizvodnji, ravnanju z živili in njihovi prodaji. Postopki izobraževanja in usposabljanja, higienski minimum, zdravniški pregledi, osebna higiena, ravnanje z delovno obleko, javljanje obolenj, osebna

higiena, prehrana na delu, prepoved kajenja ter obnašanje delavcev in serviserjev v prostorih kuhinje, morajo biti opisani (Sraka-Šadl, 2002).

Z osebno higieno preprečujemo prenašanje bolezni oziroma povzročiteljev bolezni iz delavcev na živila, zato definiramo, kdaj in kako si osebje umiva in razkužuje roke (Sraka-Šadl, 2002).

2.4.2 Sprejem in skladiščenje živil

Nadzor nad nabavo surovin in sestavin živil, je ključnega pomena za zagotavljanje zdravstvene ustreznosti živil. Nabava živil se začne s podpisom pogodbe z dobavitelji. Ob sprejemu živil v kuhinjo je treba preveriti spremljajočo dokumentacijo (dobavnico). Na dobavnici morajo biti podatki o dobavitelju, vrsti in količini živil. Pri živilih, ki so predpakirana, embalaža ne sme biti poškodovana ali kako drugače onesnažena. Označba mora biti v slovenskem jeziku (Mravljak in sod., 2005).

Živila je treba shranjevati na način, ki onemogoča kakršnokoli poškodbo embalaže in onesnaževanja živil. Surova in gotova živila je treba ločeno shranjevati. Če je le mogoče, je treba takoj ob sprejemu odstraniti transportno embalažo (npr. karton) in preložiti živila v čisto okolje. Kadar ne prihaja do križanja čistih in nečistih poti, lahko orginalno embalirane porcijske jedi izjemoma shranjujemo v namenskem hladilniku v transportni embalaži (Mravljak in sod., 2005).

Pri sprejemu surovin je potrebno upoštevati načela dobre proizvodne prakse:

- živila morajo biti pri dobavi ločena od izdelkov, ki niso namenjeni za prehrano
- za sprejem surovin je potrebno zagotoviti čist in opredeljen prostor
- če se hrana prepakira iz originalne embalaže v drugo embalažo, se mora zaradi sledljivosti primerno označiti
- živila morajo biti v čim krajšem času pravilno skladiščena (Knezić in sod., 2010).

Definirani so vrste skladišč, hladilnic in pogoji v posameznih skladiščih in hladilnicah z vzdrževanjem higienskih režimov in pogoji skladiščenja (Sraka-Šadl, 2002).

2.4.3 Higiena proizvodnih obratov

Sredstva za čiščenje in razkuževanje morajo biti testirana in morajo imeti certifikat za uporabo v živilski industriji. Izvaja se sprotno, dnevno, tedensko in mesečno čiščenje po prostorih in elementih, kar je prikazano v načrtu čiščenja in razkuževanja v preglednici. Sprotno čiščenje je pred opravljenim delovnim postopkom, med njim in po njem, torej večkrat dnevno. Vodja kuhinje in dobavitelj strojne opreme, čistil in razkužil sta odgovorna, da so delavci seznanjeni s primerno uporabo pomivalnih strojev, čistilnih sredstev, čistil in razkužil. Vsa čiščenja se evidentirajo s podpisom izvajalca in zadolžene

osebe, ki je odgovorna za nadzor nad čiščenjem. Učinek čiščenja preverimo vizualno in z mikrobiološko preiskavo brisov (Sraka-Šadl, 2002).

2.4.4 Nadzor pitne vode, meritve in analize

Živilski obrati morajo imeti zagotovljene zadostne količine zdravstveno ustrezne pitne vode (Pravilnik o pitni vodi, 2004).

Uporablja se vodovodna voda iz nadziranega zajetja. Pipe so oštevilčene. Mikrobiološko analizo opravlja zavod, ki izvaja sanitarno – higienski pregled, odvzame brise na snažnost. Odvzamejo se brisi jedilnega pribora, kuharske in restavracijske posode, delovnih površin, strojev in naprav ter brisi z rok delavcev v delovnem prostoru (Sraka-Šadl, 2002).

2.4.5 Zatiranje škodljivcev in škodljivih vplivov

Škodljivci (mrčes, glodalci,...) lahko prenašajo številne povzročitelje nalezljivih bolezni in povzročajo gospodarsko škodo. Obrati, ki proizvajajo ali dajejo v promet živila, morajo biti zasnovani, grajeni in urejeni tako, da se lahko zaščitijo pred škodljivci in zunanjim onesnaževanjem.

Dezinsekcija je zatiranje in uničevanje mrčesa (insektov). Deratizacija je zatiranje podgan, miši in drugih škodljivih glodalcev.

Namen dezinsekcije in deratizacije (DD) je preprečevanje in obvladovanje nalezljivih bolezni (ZZV Murska Sobota, 2011b).

2.4.6 Nadzor gradbenega stanja objekta

Nadzor gradbenega stanja objekta zajema nadzor oken, sten, vrat, tlakov in kakovosti izgradnje oziroma predloge za izboljšanje gradbenega stanja – nagibi za odtoke in velikosti odtokov, odprtine za vrata, obrobe sten in prehodnost odtokov. Beljenje in razkuževanje sten se opravi po potrebi pri generalnih čiščenjih in obnovah (Sraka-Šadl, 2002).

2.5 METODE VZORČENJA IN DOLOČANJA UČINKOVITOSTI ČIŠČENJA

2.5.1 Metodi vzorčenja

2.5.1.1 Brisi

Vzorčenje z brisi uporabljamo za ugotavljanje higienskega stanja v proizvodnih obratih, gostinskih obratih, za ugotavljanje učinkovitosti čiščenja in razkuževanja. Z brisi vzorčimo

delovne površine, opremo, jedilni in kuhinjski pribor, posodo, roke, nalive pipe, cevovode.

Za vzorčenje z brisi uporabljamo sterilne epruvete z določenim volumnom sterilne fiziološke raztopine (npr. 5 ml ali 10 ml). Na notranji strani pokrovčka epruvete je pritrjena paličica, ki je na koncu ovita z vato. Pri vzorčenju površin z brisom pobrišemo površino določene velikosti (npr. 100 cm²) tako, da bris med vzorčenjem obračamo in da smer brisanja površine vsaj dvakrat zamenjamo. Nato damo bris v epruveto s fiziološko raztopino in vsebino dobro premešamo (ZZV Murska Sobota, 2011a).

V brisu po pravilniku (Pravilniku o posebnih ukrepih pri zastrupitvah in infekcijah oseb s hrano in njihovem preprečevanju, 1985) s klasičnimi mikrobiološkimi metodami določamo:

- število aerobnih mezofilnih bakterij
- bakterije vrste *Escherichia coli*, koagulaza pozitivne stafilokoke, fekalne streptokoke, *Proteus* ssp., *Pseudomonas aeruginosa*.

Po pravilniku (Pravilniku o posebnih ukrepih pri zastrupitvah in infekcijah oseb s hrano in njihovem preprečevanju, 1985) je bris snažen:

- če je število aerobnih mezofilnih bakterij do 100 KE/20 cm² (jedilni pribor, kozarci, skodelice, krožniki) oziroma do 200 KE/20 cm² (delovna površina)
- če ne vsebuje bakterij vrste *Escherichia coli*, koagulaza pozitivnih stafilokokov, fekalnih streptokokov, *Proteus* ssp., *Pseudomonas aeruginosa*.

2.5.1.2 Izpirki

Vzorčenje z izpirki uporabljamo za ugotavljanje higienskega stanja težko dostopnih mest in embalaže (povratne in nepovratne) (ZZV Murska Sobota, 2011a).

2.5.2 Metode določanja učinkovitosti čiščenja

2.5.2.1 Metoda merjenja ATP-bioluminiscenca

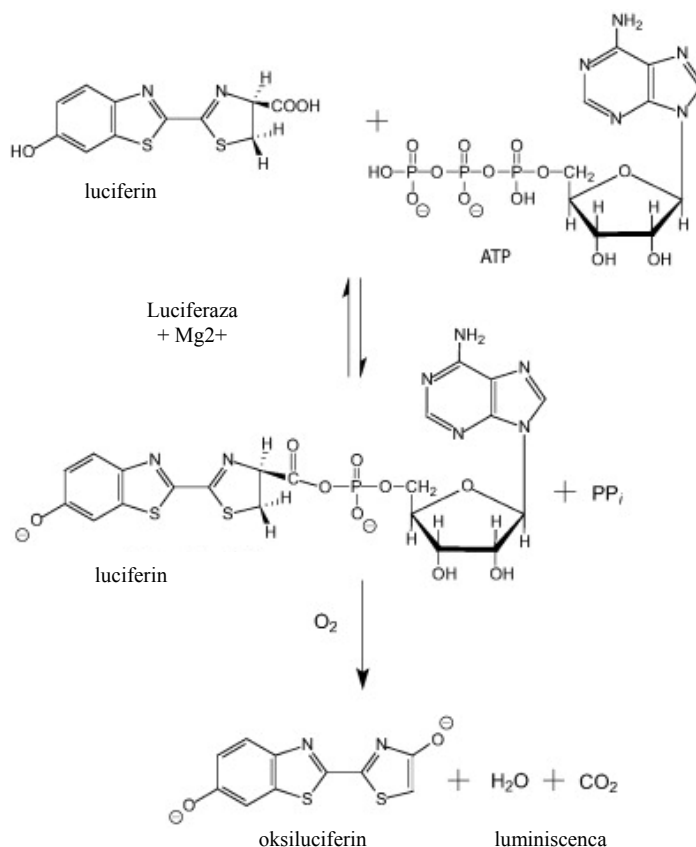
Bioluminiscenca je encimsko katalizirana kemiluminiscenca. Je kemična reakcija, pri kateri se sproščena energija uporabi za nastanek električno vzbujenega intermedijata ali produkta, ki nato odda foton. Bioluminiscenca nastane ob delovanju encima (luciferaza) na substrat (luciferin) ob prisotnosti kisika. Substrat se vrne v nezbujeno stanje, ko odda foton svetlobne energije. Luciferaza in luciferin sta le splošni imeni beljakovin, ki se uporabljata

pri vseh luminiscenčnih organizmih, vendar sta pri različnih vrstah različna (Vodopivec in Raspor, 2004).

Bioluminiscenco poznamo pri različnih bioloških sistemih: planktonu, svetlobnih bakterijah, nekaterih bazidiomicetah, dinoflagelatih. Vloga bioluminiscence ni znana, morda je ostanek sistema, ki je nekoč odstranjeval iz okolice majhne koncentracije kisika (Vodopivec, 2001).

Adenozin trifosfat (ATP) je sestavina živih celic vseh organizmov in sodeluje pri prenosu energije. ATP je prisoten v treh različnih oblikah, in sicer mikrobní ATP znotraj živih mikroorganizmov; somatski, nemikrobni ATP znotraj rastlinskih in živalskih celic; zunajcelični ali prosti ATP iz celičnih razkrojkov ali poškodovanih mikrobníh celic (Vodopivec in Raspor, 2004).

Ugotavljanje koncentracije mikroorganizmov z merjenjem ATP bioluminiscence temelji na merjenju svetlobe, ki se kot stranski produkt sprosti med biokemično reakcijo – encimsko pretvorbo luciferina v oksiluciferin (ključni encim je luciferaza, potrebni so še Mg^{2+} ioni in ATP) (Smole Možina, 2002).



Slika 2: Princip bioluminiscence (Sigma-Aldrich, 2012)

Emisija svetlobe se meri z luminometrom pri 562 nm v relativnih svetlobnih enotah (RLU angl. Relative light Unit). Izmerjen delež svetlobe je pri standardiziranih reakcijskih pogojih sorazmeren količini ATP v vzorcu. Ker je količina ATP v metabolično aktivnih mikrobnih celicah relativno konstantna (v mrtvih celicah se ATP hitro razgradi), je delež izmerjene svetlobe praviloma sorazmeren s številom živih celic v vzorcu.

Zveza med količino ATP in številom mikroorganizmov na hranljivih podlogah je dobra v primeru, ko gre za laboratorijske vzorce kultur. V praksi je v vzorcih izmerjena količina ATP v korelaciji z vsemi celicami, sposobnimi za življenje (mikrobne, rastlinske, animalne) in ne samo z ATP mikrobnega izvora. Meritve zaznajo tudi ostanke organskega izvora (ostanki živil na delovnih površinah), ki so lahko idealno gojišče za mikroorganizme, in zato odločitev o čistosti oziroma umazanosti površine temelji na dejanski prisotnosti ostankov hrane in mikroorganizmov. Obstajata vsaj dva razloga za to, da se uporaba tega principa vse bolj uveljavlja kot hitra metoda ugotavljanja mikrobiološke kontaminacije:

- rezultat temelji na zaznavanju metabolično aktivnih celic, torej tistih, ki so dejansko zanimive, bodisi da gre za proizvodne organizme (npr. določanje aktivnosti starterskih kultur) ali za nezaželeno mikroorganizme, pokazatelje slabega higienskega stanja, povzročitelje kvara hrane ali povzročitelje alimentarnih toksikoinfekcij
- luciferazna aktivnost je zelo hitra, saj končni rezultat dobimo v nekaj minutah, česar ne omogoča nobena druga tehnika (Smole Možina, 2003).

Merjenje ATP-bioluminiscence v živilski mikrobiologiji vse več uporabljajo predvsem za kontrolo snažnosti delovnih površin, opreme. Lahko je merilo uspešnosti pranja, t.j. odstranjevanja organskih ostankov (merjenje ATP somatskih celic), ali pa uspešnosti sanitacije, uničenja prisotne mikrobne združbe. Je ena izmed redkih metod, ki daje rezultat takoj oz. v nekaj minutah in zato omogoča operativno ukrepanje v proizvodnji (npr. ponovno čiščenje, če je rezultat meritve neustrezen). Poleg kontrole higiene se je merjenje ATP-bioluminiscence izkazalo za uspešno tudi pri kontroli surovin in končnih izdelkov v različnih živilskih panogah: mlekarstvu (določanje mikrobiološke kvalitete surovega mleka), pivovarstvu (kontrola surovin – vode, aktivnosti kvasa, zgodnje odkrivanje kvara piva), proizvodnji brezalkoholnih pijač in mesnopredelovalni industriji (ugotavljanje površinske kontaminacije kosov mesa, perutnine ...) (Smole Možina, 2003).

Ker gre za encimsko reakcijo, je pomemben vpliv okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, vrednost pH, prisotnost čistil, razkužil in drugih inhibitorjev.

Ostanki čistil in razkužil zmanjšajo aktivnost luciferaze, kar daje neustrezen rezultat meritve. Omejitev je tudi relativno slaba občutljivost – reakcija je zaznavna šele pri razmeroma visoki kontaminaciji (meja detekcije je odvisna od ekoloških pogojev, vendar brez specialne izvedbe aparata ni nižja od 10^3 KE/ml vzorca). Določen vpliv ima tudi kondicija prisotne mikrobne združbe, ki določa hitrost pretvorbe ATP v celicah. Tehnika

ne daje nikakršne možnosti razlikovanja med mikroorganizmi, torej je uporabna le za hitro določanje relativno visoke skupne mikrobne kontaminacije (Smole Možina, 2002).

2.5.2.2 Merjenje redukcije NAD/NADP

Princip določanja je podoben kot pri merjenju ATP-bioluminiscence, saj gre prav tako za spremljanje encimske reakcije, ki poteče pod vplivom prisotnih organskih snovi in dodanega encima ter substrata. Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) in nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP) sta koencima, ki sodelujeta v celičnem metabolizmu. NAD je predvsem vključen v katabolične reakcije, NADP pa v anabolične reakcije (Smole Možina in Raspor, 1997).

Gre za oksido-redukcijsko reakcijo pretvorbe encimskega kofaktorja NAD^+ ali NADP^+ v reducirano obliko NADH oz. NADHP, pri čemer reakcijo zaznamo kot spremembo barve. Metoda je hitra (5 minut) in enostavna. Za meritve ni potrebna posebna aparatura (Smole Možina, 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPREDELITEV NALOGE

Pri pripravi hrane v šolski kuhinji je higiena še posebej pomembna, saj gre za varnost občutljivejše ciljne skupine, otrok.

V nalogi smo z dvema metodama, z merjenjem ATP- bioluminiscence ter mikrobiološko analizo brisov, proučili uspešnost čiščenja delovnih površin šolske kuhinje.

V obdobju dveh mesecev (od 2.12.2010 do 3.2.2011) smo v šolski kuhinji na celjskem območju preverjali higiensko stanje delovnih površin. Izbrano šolo obiskuje okoli 400 učencev. Učenci imajo možnost celodnevne prehrane, ki zajema zajtrk, malico, kosilo ter popoldansko malico. Dnevno se pripravi približno 15 zajtrkov, 490 malic, 280 kosil ter 21 popoldanskih malic.

Vzorci smo odvezemali bodisi med nenapovedanim prihodom (zjutraj, pred pričetkom dela), med napovedanim prihodom (prav tako zjutraj pred pričetkom dela), popoldan po končanem čiščenju, zjutraj pred generalnim čiščenjem, popoldan po generalnem čiščenju in med fazami čiščenja.

Čistost površin smo preverjali na 12 odzemnih mestih:

- odzemno mesto 1 (v nadaljevanju OM1) → **Deska za pripravo zelenjave**
- odzemno mesto 2 (v nadaljevanju OM2) → **Korito za pranje zelenjave**
- odzemno mesto 3 (v nadaljevanju OM3) → **Rezalnik za kruh**

- odvzemno mesto 4 (v nadaljevanju OM4) → **Deska za pripravo kruha**
- odvzemno mesto 5 (v nadaljevanju OM5) → **Korito v centralnem delu kuhinje**
- odvzemno mesto 6 (v nadaljevanju OM6) → **Kotel za pripravo omak**
- odvzemno mesto 7 (v nadaljevanju OM7) → **Pladenj**
- odvzemno mesto 8 (v nadaljevanju OM8) → **Razdeljevalna posoda**
- odvzemno mesto 9 (v nadaljevanju OM9) → **Krožnik**
- odvzemno mesto 10 (v nadaljevanju OM10) → **Pribor (žlica, nož, vilica)**
- odvzemno mesto 11 (v nadaljevanju OM11) → **Nož za pripravo mesa**
- odvzemno mesto 12 (v nadaljevanju OM12) → **Deska za pripravo mesa**



Slika 3: OM1 – deska za pripravo zelenjave

Deska za pripravo zelenjave (slika 3) je iz umetne mase, čiščenje pa poteka ročno. Površina je sicer ravna, a delno hrapava, kar otežuje čiščenje.



Slika 4: OM2 – korito za pranje zelenjave

Korito za pranje zelenjave (slika 4) je iz nerjavečega jekla, kar omogoča dobro čiščenje, ki poteka ročno.



Slika 5: OM3 – rezalnik za kruh

Rezila noža za kruh (slika 5) so jeklena in zaščitena s plastično maso. Čiščenje je ročno.



Slika 6: OM4 – deska za pripravo kruha

Deska za pripravo kruha (slika 6) je lesena, čiščenje pa poteka ročno.



Slika 7: OM5 – korito v centralnem delu kuhinje

Površina korita v centralnem delu kuhinje (slika 7) je iz nerjavečega jekla, ki omogoča dobro čiščenje, ki poteka ročno.



Slika 8: OM6 – kotel za pripravo omak

Kotel za pripravo omak (slika 8) je iz rjavečega jekla, čiščenje je ročno.



Slika 9: OM7 – pladenj

Pladenj (slika 9) je iz umetne mase, čiščenje poteka strojno.



Slika 10: OM8 – razdeljevalna posoda

Površina razdeljevalne posode (slika 10) je iz nerjavečega jekla, čiščenje je ročno.



Slika 11: OM9 – krožnik

Krožnik (slika 11) je iz nerjavečega jekla, čiščenje poteka strojno.



Slika 12: OM10 – pribor

Pribor (slika 12) je iz nerjavečega jekla, čiščenje pa poteka strojno.



Slika 13: OM11 – nož za pripravo mesa

Rezilo na nožu za pripravo mesa (slika 13) je iz nerjavečega jekla, čiščenje pa je ročno.



Slika 14: OM12 – deska za pripravo mesa

Deska za pripravo mesa (slika 14) je iz umetne mase. Čiščenje je ročno.

3.2 MERJENJE ATP-BIOLUMINISCENCE

3.2.1 Princip metode in material

- Merjenje ATP-bioluminiscence

Oprema:

- ultrasnap brisi (Hygiena)
- »SystemSure« luminometer (Hygiena)

3.2.2 Opis metode

- odvzem brisa na določeni površini (10 cm x 10 cm)
- bris se odlomi in vsebina se iztisne v notranjost brisa
- bris se pretresa nekaj sekund
- bris se vstavi v luminometer
- odčitavanje rezultatov
- rezultati v 15 s



Slika 15: Prikaz poteka metode merjenja ATP-bioluminiscence (V.I.A d.o.o, 2012)



Slika 16: Luminometer in bris za kontrolo površin (V.I.A d.o.o., 2012)

Preglednica 1: Priporočene meje vrednosti RLU/100 cm² oz. na enoto pribora za delovne površine s strani proizvajalca (V.I.A d.o.o, 2012).

ODVZEMNO MESTO	PRIPOROČILA S STRANI PROIZVAJALCA (RLU/100 cm ²)
OM1 - deska za pripravo zelenjave	50 – 100
OM2 - korito za pranje zelenjave	10 - 30
OM3 - rezalnik za kruh	10 - 30
OM4 - deska za pripravo kruha	50 - 100
OM5 - korito v centralnem delu kuhinje	10 - 30
OM6 - kotel za pripravo omak	25 - 50
OM7 – pladenj	10 - 20
OM8 - razdeljevalna posoda	10 - 20
OM9 - krožnik	10 - 20
OM10 - pribor (žlica, nož, vilica)*	10 - 20
OM11 - nož za pripravo mesa*	10 - 20
OM12 - deska za pripravo mesa	50 – 100

Legenda: *tu ne velja RLU/100 cm², ampak na enoto pribora

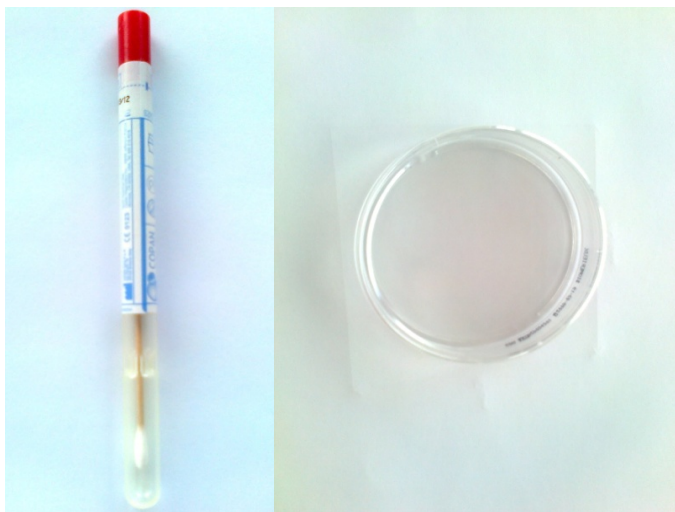
3.3 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA BRISOV

3.3.1 Princip metode

Metoda določanja mikroorganizmov na površinah z jemanjem brisov. Določali smo skupno število mikroorganizmov in število koliformnih bakterij.

3.3.2 Potrebna oprema in material

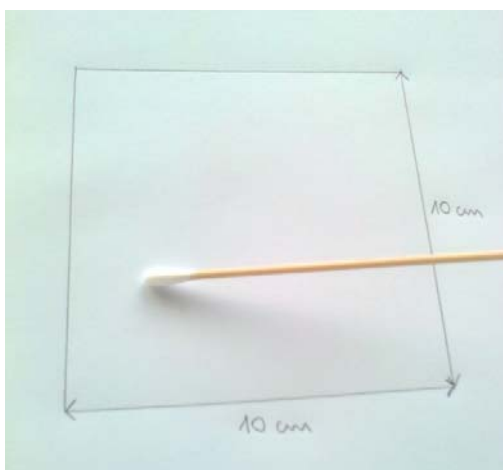
- sterilni bris za enkratno uporabo (Copan Italia s.p.A)
- sterilna fiziološka raztopina, pripravljali sami (3.3.4)
- sterilni nastavki za pipete (1 ml)
- avtomatska pipeta (1 ml)
- gojišče PCA (ang. Plate count agar, za določanje skupnega št. aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, Merck, Nemčija)
- gojišče VRB (ang. Violet Red Bile agar, Merck, Nemčija)
- inkubator s temperaturo 30 °C



Slika 17: Sterilni bris in prazna petrijevka

3.3.3 Opis postopka

- V plastično sterilno epruveto s sterilnim brisom aseptično odpipetiramo 5 ml fiziološke raztopine.
- Z mokrim brisom pobrišemo površino določene velikosti (npr. 10 cm x 10 cm).
- Izbrano površino obrišemo najprej v navpični smeri, vrnemo bris nazaj v fiziološko raztopino, ga premešamo in nato površino obrišemo še v vodoravni smeri.
- Med brisanjem vrtimo bris okoli njegove osi.
- Bris vrnemo v fiziološko raztopino, premešamo.
- Največ 6 ur po odvzemu vzorca moramo bris nacepiti na mikrobiološko gojišče.
- Bris premešamo in iz vsebine odpipetiramo 1 ml v petrijevo ploščo ($R = 1$) in 1 ml v epruveto z 9 ml fiziološke raztopine. Razredčevalno epruveto premešamo in iz nje prenesemo 1 ml v naslednjo ploščo ($R = 100$).
- Petrijeve plošče z vzorcem prelijemo s hranljivim gojiščem PCA za določanje skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov in s hranljivim gojiščem VRB za določanje skupnega števila koliformnih mikroorganizmov. Gojišča morajo biti predhodno popolnoma raztopljeni in ohlajena na 45 ± 1 °C.
- Ko se gojišče PCA strdi, plošče obrnemo in 48 ur inkubiramo pri 30 ± 1 °C.
- Ko se gojišče VRB z vmešanim vzorcem popolnoma strdi, ga prelijemo s tankim slojem istega gojišča (4 – 5 ml VRB) in pustimo, da se strdi. Inkubiramo pri 30 ± 1 °C 24 ± 2 ur (Čanžek Majhenič in sod., 2007).



Slika 18: Površina, pobrisana z mokrim brisom

3.3.4 Priprava fiziološke raztopine

Za pripravo 500 ml fiziološke raztopine potrebujemo:

- 1 tableto (Ringerjeve tablete, Merck Darmstadt, Nemčija)
- 500 ml destilirane vode
- magnetke za mešanje

V 500 ml destilirane vode damo 1 tableto Ringer ter magnetno mešalo in erlenmajerico postavimo na mešalnik. Ko je tableta popolnoma raztopljena, v prazne epruvete razdelimo fiziološko raztopino po 9 ml in steriliziramo. Tako pripravljeno fiziološko raztopino lahko uporabimo pri razredčitvah vzorca.

3.3.5 Priprava gojišč

Za pripravo gojišča PCA (Merck) potrebujemo:

- 250 ml reagenčne stekleničke
- destilirano vodo
- dehidrirano gojišče PCA
- mikrovalovno pečico
- avtoklav

Za pripravo 200 ml gojišča zatehtamo 4,5 g dehidriranega gojišča PCA ter ga prelijemo z 200 ml destilirane vode. Dobro premešamo in segrevamo v mikrovalovni pečici, dokler ni vsa vsebina raztopljena. Nato tako pripravljeno gojišče avtoklaviramo (121 °C, 15 min).

Za pripravo gojišča VRB (Merck) potrebujemo:

- 250 ml reagenčne stekleničke
- destilirano vodo
- dehidrirano gojišče VRB
- mikrovalovno pečico

Za pripravo 200 ml gojišča zatehtamo 7,9 g dehidriranega gojišča VRB ter prelijemo z 200 ml destilirane vode. Dobro premešamo in segrevamo v mikrovalovni pečici, da se gojišče popolnoma raztopi.

3.3.6 Odčitavanje rezultatov

Število KE mikroorganizmov ugotovimo na petrijevih ploščah po inkubaciji, in sicer s štetjem vidnih kolonij na ploščah. Števne plošče: gojišče PCA 10 – 300 KE (ISO 4833, 2003), gojišče VRB 10 – 150 KE (ISO 4832, 2006).

Za izračun števila mikroorganizmov (N) oz. kolonijskih enot na cm^2 (KE/ cm^2) smo uporabili naslednjo formulo:

$$N = \frac{\text{št. kolonij} \times 5 \times R}{P}$$

N = št. kolonijskih enot (KE/cm²)
R = razredčitveni faktor
P = površina (cm²)

... (1)

Preglednica 2: Velikost vzorčnih površin na odvzemnih mestih.

ODVZEMNO MESTO	P – površina (cm ²)
1	100
2	100
5	100
8	100
9	100
10	Žlica = 8 Nož = 6 Vilica = 8
11	28
12	100

3.3.7 Normativi

Merila za oceno snažnosti podaja pravilnik (Pravilnik o posebnih ukrepih pri zastrupitvah in infekcijah oseb s hrano in njihovem preprečevanju, 1985).

Bris je snažen:

- če je število aerobnih mezofilnih bakterij do 100 KE/20 cm² (jedilni pribor, skodelice, krožniki) oziroma do 200 KE/20 cm² (delovne površine);
- če ne vsebuje bakterij vrste *Escherichia coli*, koagulaza pozitivnih stafilokokov, fekalnih streptokokov, *Proteus ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa*.

V nalogi smo ocenili snažnost površin na osnovi skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij ter izmerjene vrednosti RLU (relativne svetlobne enote).

4 REZULTATI

4.1 ČISTOST DELOVNIH POVRŠIN

V preglednici 3 so predstavljeni rezultati merjenja ATP-bioluminiscence, skupnega števila mikroorganizmov ter števila koliformnih bakterij po čiščenju, in sicer po nenapovedanem in takoj za tem, po štirih dneh, napovedanem vzorčenju.

Preglednica 3: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena po nenapovedanem in napovedanem vzorčenju po čiščenju.

Odvzemno mesto	ATP (RLU/100 cm ²)		Skupno število mikroorganizmov (KE/cm ²)		Koliformne bakterije (KE/cm ²)	
	Nenapovedano vzorčenje	Napovedano vzorčenje	Nenapovedano vzorčenje	Napovedano vzorčenje	Nenapovedano vzorčenje	Napovedano vzorčenje
1	3	2	1,1	<0,5	<0,5	<0,5
2	29	15	0,7	<0,5	<0,5	<0,5
3	3	4	*	*	*	*
4	2	0	*	*	*	*
5	9	2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
6	7	0	*	*	*	*
7	2	0	*	*	*	*
8	0	3	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
9	2	0	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
10**	1	0	10	<8,3	<6,3	<8,3
11**	4	0	<1,8	<1,8	<1,8	<1,8
12	1	0	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Legenda: *ni določeno

** tu velja RLU na enoto pribora in ne RLU/100 cm²

Z merjenjem ATP-bioluminiscence in mikrobiološkimi preiskavami brisov smo pokazali, da so bile vse površine odveznih mest tako po nenapovedanem kot po napovedanem vzorčenju dobro očiščene, kar smo tudi potrdili z vizualno oceno. Pri nenapovedanem vzorčenju je bila površina OM 2 že v uporabi, pri napovedanem vzorčenju pa površina OM 5. Kljub temu, da sta bili že v uporabi, pa skupno število mikroorganizmov ni bilo preseženo.

V preglednici 4 so predstavljeni rezultati merjenja ATP-bioluminiscence, skupnega števila mikroorganizmov ter števila koliformnih bakterij, ki smo jih dobili po treh neodvisnih napovedanih vzorčenjih delovnih površin.

Preglednica 4: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena po napovedanih vzorčenjih.

Odvzemno mesto	ATP (RLU/100 cm ²)			Skupno število mikroorganizmov (KE/cm ²)			Koliformne bakterije (KE/cm ²)		
	1. vz.	2. vz.	3. vz.	1. vz.	2. vz.	3. vz.	1. vz.	2. vz.	3. vz.
1	9	18	2	2,1	1,2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
2	54	69	14	68	1,3	<0,5	25,5	<0,5	<0,5
3	2	1	3	*	*	*	*	*	*
4	3	2	5	*	*	*	*	*	*
5	8	429	3	<0,5	2,8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
6	6	0	2	*	*	*	*	*	*
7	7	0	2	*	*	*	*	*	*
8	5	0	2	0,8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
9	0	0	1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
10**	0	0	1	<6,3	<8,3	<8,3	<6,3	<8,3	<8,3
11**	0	0	1	8,4	<1,8	<1,8	<1,8	<1,8	<1,8
12	1	2	1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Legenda: *ni določeno

** tu velja RLU na enoto pribora in ne RLU/100 cm²

vz.: vzorčenje

Z mikrobiološkimi preiskavami in merjenjem ATP-bioluminiscence smo ugotovili, da so bila vsa odvzemna mesta, razen OM 2, v povprečju dobro očiščena.

Pri prvem neodvisnem napovedanem vzorčenju delovnih površin smo na OM 2 (površina je bila že v uporabi) ugotovili prisotnost koliformnih bakterij. Pri pranju zelenjave lahko v koritu zaostajajo delci zemlje, zato predvidevamo, da se je korito preko zemlje kontaminiralo s koliformnimi bakterijami.

Pri drugem neodvisnem napovedanem vzorčenju delovnih površin smo na OM 5 z merjenjem ATP-bioluminiscence izmerili vrednost RLU/100 cm² 14 krat višjo od dovoljene. Površina je bila že v uporabi, a skupno število mikroorganizmov ni bilo preseženo, prav tako nismo dokazali prisotnosti koliformnih bakterij. Iz tega lahko zaključimo, da je bilo verjetno večina ATP organskega izvora (ostanki hrane).

Pri tretjem neodvisnem vzorčenju smo delovnih površin smo z obema metodama pokazali, da so bile površine dobro očiščene.

V preglednici 5 so predstavljeni rezultati merjenja ATP-bioluminiscence, skupnega števila mikroorganizmov ter števila koliformnih bakterij, ko smo vzorčenje izvedli po prvi in drugi fazi čiščenja.

Preglednica 5: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena po prvi in drugi fazi čiščenja.

Odvzemno mesto	ATP (RLU/100 cm ²)		Skupno število mikroorganizmov (KE/cm ²)		Koliformne bakterije (KE/cm ²)	
	Po prvi fazi čiščenja	Po drugi fazi čiščenja	Po prvi fazi čiščenja	Po drugi fazi čiščenja	Po prvi fazi čiščenja	Po drugi fazi čiščenja
1	1	*	<0,5	*	<0,5	*
2	99	*	1,3	*	<0,5	*
3	4	*	*	*	*	*
4	3	*	*	*	*	*
5	12	7	1,8	1,3	<0,5	<0,5
6	3	3	*	*	*	*
7	80	10	*	*	*	*
8	4	*	<0,5	*	<0,5	*
9	5	3	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
10**	6	3	<6,3	<6,3	<6,3	<6,3
11**	4	*	<1,8	*	<1,8	*
12	2	*	<0,5	*	<0,5	*

Legenda: *ni določeno

** tu velja RLU na enoto pribora in ne RLU/ 100 cm²

Pri OM 5, OM 6, OM 7, OM 9 in OM 10 smo ocenjevali učinkovitost čiščenja med dvema fazama – po prvi fazi čiščenja (grobo čiščenje) in po končanem čiščenju. Ugotovili smo, da smo z drugo fazo čiščenja dosegli boljše higiensko stanje delovnih površin, saj je bila izmerjena vrednost RLU/100 cm² in skupno število mikroorganizmov po drugi fazi čiščenja vedno nižja; prisotnosti koliformnih bakterij nismo dokazali.

V preglednici 6 so predstavljeni rezultati merjenja ATP-bioluminiscence, skupnega števila mikroorganizmov ter števila koliformnih bakterij. Vzorčenje je bilo opravljeno pred in po generalnem čiščenju.

Preglednica 6: Čistost delovnih površin v šolski kuhinji določena pred in po generalnem čiščenju.

Odvzemno mesto	ATP (RLU/100 cm ²)		Skupno število mikroorganizmov (KE/cm ²)		Koliformne bakterije (KE/cm ²)	
	Pred generalnim čiščenjem	Po generalnem čiščenju	Pred generalnim čiščenjem	Po generalnem čiščenju	Pred generalnim čiščenjem	Po generalnem čiščenju
1	1	1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
2	56	9	24,5	<0,5	30,5	<0,5
3	0	3	*	*	*	*
4	0	3	*	*	*	*
5	15	3	150	<0,5	>7,5	<0,5
6	0	22	*	*	*	*
7	0	0	*	*	*	*
8	1	29	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
9	0	0	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
10**	25	4	<6,3	<6,3	<6,3	<6,3
11**	0	0	<1,8	<1,8	<1,8	<1,8
12	0	0	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

Legenda: *ni določeno

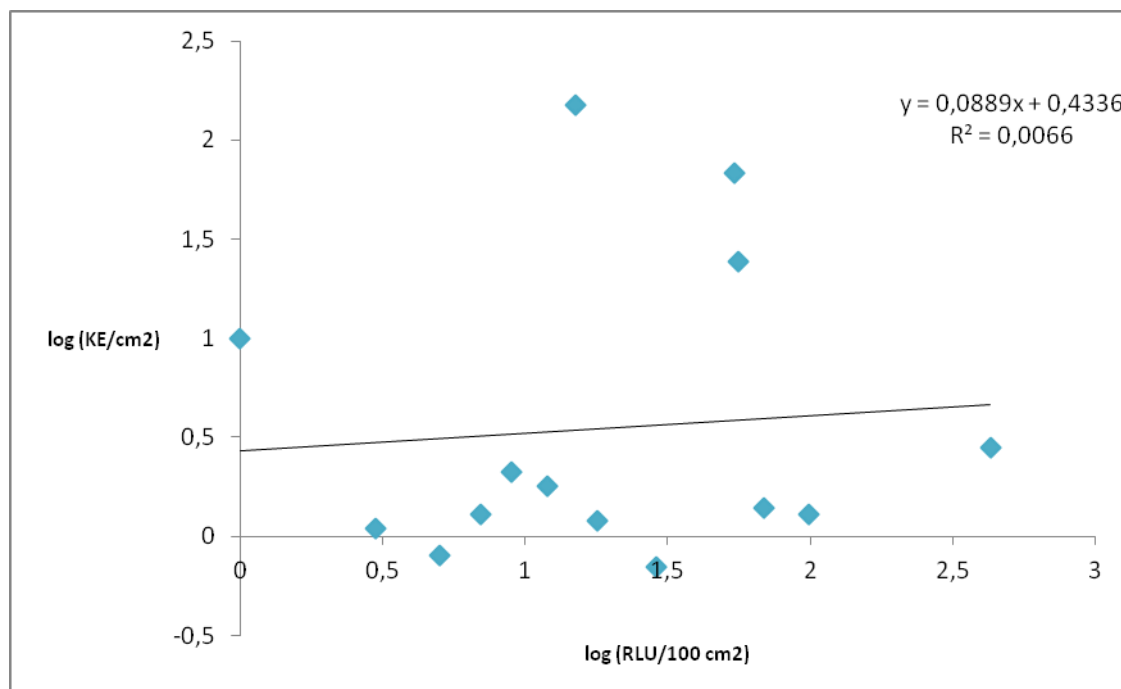
** tu velja RLU na enoto pribora in ne RLU/100 cm²

V povprečju so bile delovne površine OM dobro očiščene, tako pred kot po generalnem čiščenju.

Pri vzorčenju površin pred generalnim čiščenjem smo na površini OM 2 in OM 5 z mikrobiološkimi preiskavami ugotovili prisotnost koliformnih bakterij. Površini OM 2 in OM 5 sta bili pred vzorčenjem že v uporabi, zato predvidevamo, da sta se površini preko zemlje kontaminirali s koliformnimi bakterijami.

Izmerjena vrednost RLU/100 cm² je bila na OM 6 in OM 8 po generalnem čiščenju višja kot pred generalnim čiščenju. Predvidevamo, da so ostanki čistil motili encimsko reakcijo.

4.2 KORELACIJA MED METODO ŠTETJA KOLONIJ NA PLOŠČAH IN BIOLUMINISCENČNO METODO



Slika 19: Korelacija med metodo štetja kolonij na ploščah z gojiščem PCA ter bioluminiscenčno metodo.

Korelacija med metodo štetja kolonij na ploščah z gojiščem PCA ter bioluminiscenčno metodo (slika 19) je zelo nizka, R^2 je 0,0066. Pri izračunu korelacije nismo upoštevali meritev za vzorce, pri katerih je bil rezultat štetja kolonij na ploščah pod mejo detekcije ($KE < 10$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil preveriti uspešnost čiščenja delovnih površin v šolski kuhinji na celjskem območju z merjenjem ATP-bioluminiscence in mikrobiološko preiskavo brisov.

Za preverjanje snažnosti površin z metodo merjenja bioluminiscence smo uporabili luminometer in brise SystemSURE Plus. Za mikrobiološko preiskavo brisov (metoda štetja kolonij na ploščah) pa smo potrebovali sterilen bris in gojišča:

- za določanje skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij gojišče PCA in
- za določanje koliformnih bakterij gojišče VRB.

Uspešnost čiščenja delovnih površin smo preverjali v obdobju dveh mesecev, in sicer na 12 odvzemnih mestih. Higienško stanje smo preverjali ob različnih časih, saj smo želeli ugotoviti dejansko stanje čistosti površin (nenapovedan prihod, napovedan prihod, po prvi fazi čiščenja, po drugi fazi čiščenja, pred generalnim čiščenjem, po generalnem čiščenju).

Zanimala nas je korelacija med omenjenima metodama, zato smo v preglednicah 3 - 6 podali rezultate dobljene z merjenjem ATP-bioluminiscence in mikrobiološkimi preiskavami. Z analizo podatkov smo ugotovili, da je korelacija med metodo merjenja ATP-bioluminiscence in metodo štetja kolonij na ploščah z gojiščem PCA zelo nizka, $R^2 = 0,0066$, pri izračunu korelacije pa nismo upoštevali meritev tistih vzorcev, pri kateri je bil rezultat štetja kolonij na ploščah pod mejo detekcije.

Vilar in sod. (2008) so z merjenjem ATP-bioluminiscence in mikrobiološko analizo brisov preverjali uspešnost čiščenja površin molzne opreme na farmah. Ugotovili so, da so z merjenjem bioluminiscence zaznali le 12 % ATP, ki je bil mikrobiološkega izvora.

Čeprav je v našem poskusu korelacija med metodama zelo nizka, pa nakazuje povezavo med metodama, kar bi najverjetneje lahko potrdili na večjem številu vzorcev in večkratnih ponovitvah vzorčenj. Kljub temu pa lahko iz rezultatov posamezne metode zaključimo, da je čiščenje v šolski kuhinji primerno, kar smo dokazali tako z merjenjem ATP-bioluminiscence kot tudi z mikrobiološkimi preiskavami, kjer so bile dobljene vrednosti v povprečju znotraj meja predpisanih vrednosti. Tudi z vizualnim pregledom nismo ugotovili nobenih nečistoč, razen v primeru, ko je bila delovna površina OM že v uporabi.

Do podobnih zaključkov smo prišli tudi pri primerjavi vrednosti, izmerjenih pred generalnim čiščenjem in po njem. Izstopata odvzemni mesti 6 in 8, saj je bila po generalnem čiščenju izmerjena vrednost RLU višja. Predvidevamo, da je vzrok za to uporaba čistilnih pripomočkov, ki so namenjeni samo za to vrsto čiščenja, oziroma ostanki čistilnih sredstev, ki lahko motijo reakcijo. Tudi Champiat in sod. (2001) so v svoji raziskavi prišli do podobnih ugotovitev. Na nekaterih živilskih proizvodnih obratih so na kritičnih kontrolnih točkah, ki jih zahteva sistem HACCP, preverjali primernost metod na principu biokemiluminiscence za določanje čistosti površin. Zaključili so, da neučinkovito

izpiranje oz. ostanek detergentov povzroči nepravilen čas trajanja luminiscence. Prav tako so menili, da izmerjena količina ATP ni vedno pravilna, saj mikroorganizmi in ostale celice niso vedno v optimalnih fizioloških stanjih.

5.2 SKLEPI

Pri diplomski nalogi smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Korelacija med metodo štetja kolonij na ploščah z gojiščem PCA ter bioluminiscenčno metodo je zelo nizka; R^2 je 0,0066.
- Kljub temu, da je korelacijski koeficient zelo nizek, pa daje slutiti povezavo med metodama, kar bi verjetno potrdili z večjim številom vzorčenj in večjim številom meritev za vzorce, katerih rezultat štetja kolonij na ploščah bi bil nad mejo detekcije ($KE > 10$).
- Delovne površine odvzemnih mest so bile pri večini vzorčenj po obeh metodah ocenjene kot čiste.
- Rezultati mikrobiološke preiskave brisov so bili znotraj meja predpisanih normativov o skupnem številu mikroorganizmov Pravilnika (Pravilniku o posebnih ukrepih pri zastrupitvah in infekcijah oseb s hrano in njihovem preprečevanju, 1985), zato lahko zaključimo, da je čiščenje v šolski kuhinji dobro.

6 POVZETEK

V sodobnem svetu okužbe s hrano predstavljajo velik problem. V vsaki fazi priprave hrane obstajajo številne nevarnosti in tveganja za mikrobiološko okužbo. Posebno pozornost je treba posvetiti pripravi hrane za otroke, saj so, kot ena najboljčutljivejših skupin ljudi, bolj dovzetni za mikrobiološke okužbe.

Pomembno je, da se v šolskih kuhinjah izvaja pravilno čiščenje in vodi njegov nadzor, kar zahteva tudi sistem HACCP. Postavitev sistema HACCP temelji na jasni definiciji principov in načel, ki si sledijo v postopku postavljanja sistema.

Preverjanje učinkovitosti čiščenja nam omogočajo hitre metode, kot npr. merjenje ATP – bioluminiscence, merjenje NAD/NADP..., kakor tudi standardne, konvencionalne metode, kot na primer štetje kolonijских enot na petrijevih ploščah.

Merjenje ATP-bioluminiscence temelji na merjenju svetlobe, ki se kot stranski produkt sprosti med encimsko pretvorbo luciferina v oksiluciferin. Meritve ATP na delovnih površinah zaznajo tudi ostanke organskega izvora, ki pa prav tako ne smejo biti prisotni, saj so idealno gojišče za razvoj mikroorganizmov.

Kontrolo učinkovitosti čiščenja smo preverili tudi z mikrobiološkimi preiskavami brisov. Na podlagi rezultatov meritev smo izračunali korelacijo med obema metodama (korelacija med RLU/100 cm² in KE/cm²). Čeprav je korelacija med metodama zelo nizka, pa posamezne vrednosti merjenj ATP-bioluminiscence in rezultati mikrobioloških preiskav brisov nakazujejo, da so dobljene vrednosti znotraj meja predpisanih in lahko zaključimo, da je čiščenje delovnih površin v šolski kuhinji v povprečju dobro.

Kljub temu, da je korelacijski koeficient zelo nizek, pa daje slutiti povezavo med metodama, kar bi verjetno potrdili z večjim številom vzorčenj in večjim številom meritev za vzorce, katerih rezultat štetja kolonij na ploščah bi bil nad mejo detekcije (KE >10).

7 VIRI

- Arvanitoyannis I.S., Kassaveti A. 2009. HACCP and ISO 2200: A comparison of the two systems. V: HACCP and ISO 2200: Application to foods of animal origin. Arvanitoyannis I.S. (ed.). Chichesster, Willey-Blackwell: 3 – 40
- Bernik J. 2002. Dobra proizvodna praksa. V: Priročnik za vodenje in postavljanje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 29 - 36
- Champiat D., Matas N., Monfort B., Fraass H. 2001. Applications of biochemiluminiscence to HACCP. *Luminiscence*, 16: 193-198
- Čanžek Majhenič A., Perko B., Rogelj I. 2007. Praktikum pri predmetu Tehnologija mleka. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za mlekarstvo: 53 – 56
- Dragaš Z. A., Škerl M. 2004. Higiena rok: Higiena in obvladovanje okužb. Ljubljana, Založba ZRC: 73 – 76
- Evropska direktiva sveta o higieni živil št 852/2004. 2004. Uradni list Evropske Unije, 47, L 139/1: 319 – 337
- Goolsby L.M., Schubert H.L. 2006. Hazard analysis and critical control point (HACCP) protocols in cosmetic microbiology. V: *Cosmetic microbiology*. 2nd ed. Geis P.H. (ed.). New York, Taylor & Francis Group: 97-107
- ISO 4833. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - - Colony count tehniqe at 30 degrees C. 2003: 3 str.
- ISO 4832. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for enumeration of coliforms - - Colony count technique. 2006: 3 str.
- IVZ RS. 2009. Osnovna higienska stališča za higieno živil, namenjena delavcem v živilskih dejavnostih/2.stopnja. Ljubljana, IVZ RS, Območni zavodi za varovanje zdravja: Ljubljana, Celje, Koper, Kranj, Maribor, Murska Sobota, Nova Gorica, Novo mesto, Ravne na Koroškem: 58 str.
<http://www.zzv-ms.si/si/varnost-zivila/documents/Higienskastaliscazahigienozivilnamenjenadelavcemvzivilskidejavnosti.pdf> (september 2011)
- Jeršek B. 2003. Higiena živil: Laboratorijske vaje za predmet higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 35 – 40
- Jeršek B. 2002. Metodologija odkrivanja mikrobiološke kontaminacije živil. V: *Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99 - 109

- Kegl B. 2002. Čistilna sredstva. V: Priročnik za vodenje in postavljanje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 555 – 564
- Knežič K., Pahor Đ., Pavić E., Poljak V., Uremović S., Vahčić N., Vazdar R., Vodopija Sušanj D. 2010. Vodič dobre higijenske prakse i primjene HACCP načela za institucionalne kuhinje. Zagreb, Ministarstvo zdravstva in nacionalne skrbi: 13 – 51
- Likar M. 1987. Mikrobiologija. Ljubljana, Cankarjeva založba: 46 – 47
- Milohnoja M., Tomašić A. 1996. Osebna higiena: Higiena v proizvodnji in prometu živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 86 – 87
- Mravljak A., Tkavc A., Uršič S., Horvat M., Letnar Žbogar N. 2005. Smernice dobre higijenske prakse / HACCP za kuhinje vrtcev. Ljubljana, Skupnost vrtcev Slovenije: 5 - 50
- Mulhall R., Schmidt E., Brannan D.K. 2006. Microbial environment of the manufacturing plant. V: Cosmetic microbiology. 2nd ed. Geis P.H. (ed.). New York, Taylor & Francis Group: 73-96
- Peterman M. 2006. Izdelava HACCP načrta. Šmarješke toplice, Inštitut za sanitarno inženirstvo: 6 str.
<http://www.zzv-ce.si/uploads/izdelava%20haccp%20nacarta.pdf> (oktober, 2011)
- Pollak P., Mehikić D. 2002. Smernice dobre higijenske prakse: HACCP za gostinstvo. Ljubljana, Gospodarska zbornica Slovenije, Obrtna zbornica Slovenije: 4 – 66
- Pravilnik o pitni vodi. 2004. Uradni list Republike Slovenije. 14, 19: 2155 – 2165
- Pravilnik o posebnih ukrepih pri zastrupitvah in infekcijah oseb s hrano in o njihovem preprečevanju. 1985. Uradni list Socialistične Republike Slovenije, 42, 35: 250 - 252
- Raspor P. 2002. Definicija sistema HACCP in načel HACCP. V: Priročnik za vodenje in postavljanje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 115 – 117
- Sigma-Aldrich. 2012. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit. Sant Louis, Sigma-Aldrich: 1 str.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/flaa?lang=en®ion=SI> (oktober, 2011)
- Smole Možina S., Raspor P. 1997. Hitre metode mikrobiološke kontrole v proizvodnji hrane. V: Moderne tehnologije predelave in kakovosti živil. Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 115 – 120

- Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87 – 103
- Smole Možina S. 2002. Metode ugotavljanja mikrobioloških kontaminacij. V: Priročnik za vodenje in postavljanje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 229 – 244
- Sraka-Šadl M. 2002. HACCP v gostinskem obratu. V: Priročnik za vodenje in postavljanje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 377 – 389
- Vanne L., Karwoski M., Karppinen S., Sjöberg A.M. 1996. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*, 7: 263-275
- V.I.A d.o.o. 2011. Kontrola higijene površin in vode s bioluminiscenco. Murska Sobota, V.I.A. d.o.o.: 3 str.
www.viams.net (junij, 2011)
- Vilar M.J., Rodriguez-Otero J.L., Dieguez F.J., Sanjuan M.L., Yus E. 2008. Application of ATP bioluminiscence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 357-361
- Vodopivec K., Raspor P. 2004. Ugotavljanje snažnosti živilskega obrata s klasičnimi in alternativnimi metodami. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 131 - 137
- Vouk Grbac L., Vidović K. 2002. HACCP v velikih kuhinjah in catering obratih. V: Priročnik za vodenje in postavljanje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 393 – 410
- ZZV Novo mesto. 2009. Načela HACCP sistema zagotavljanja varne hrane v Evropi. Novo mesto, ZZV Novo mesto, Služba za higieno, epidemiologijo in ekologijo: 13 str.
http://www.zzv-nm.si/media/Nacela_HACCP_sistema.pdf, (junij 2011).
- ZZV Murska Sobota. 2011a. Higiena v živilskih obratih. Murska Sobota, ZZV Murska Sobota: 16 str.
<http://www.zzv-ms.si/si/varnost-zivila/documents/HIGIENA-V-ZIVILSKIH-OBRATIH.pdf> (julij 2011a).
- ZZV Murska Sobota. 2011b. Obvladovanje škodljivcev v živilskih obratih. Murska Sobota, ZZV Murska Sobota: 4 str.
<http://www.zzv-ms.si/si/varnost-zivila/obvladovanje-skodljivcev-v-zivilskih-obratih.htm> (september, 2011)

ZAHVALA

Najprej bi se želela zahvaliti mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za njeno strokovno pomoč, ki mi jo je nudila v času izdelave diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorici višji znan. sod. dr. Bojani Bogovič Matijašić za pomoč in nasvete, ki so mi olajšali delo.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Barbari Jeršek.

Hvala knjižničarki Lini Burkan za pregled literature.

Zahvala gre prav tako go. ravnatelju osnovne šole na kateri sem opravljala praktičen del diplomske naloge. Prav tako bi se želela zahvaliti vodji prehrane na tej šoli, ter za topel in prijazen sprejem, vodji kuhinje in vsem zaposlenim v njej.

Zahvaljujem se podjetju V.I.A. Murska Sobota za izposajo luminometra in podarjeni komplet brisov.

Zahvaljujem se gospe učiteljici Nadi Šilec za lektoriranje.

Hvala Mirjani Štih za pomoč pri oblikovanju diplome.

Hvala Nataši Dolinšek iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor za pomoč pri iskanju literature.

Hvala sodelavkam za razumevanje in vzpodbudne besede.

Ne nazadnje hvala očetu Borisu in mami Vesni za podporo, vzpodbudo, skrb, zaupanje in potrpežljivost v času študija.

Hvala Goranu za vzpodbudo.

Hvala vsem!