

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tina TUŠAR

**UGOTAVLJANJE KRITIČNIH KONTROLNIH TOČK
V KLAVNICI IN PAKIRNICI PIŠČANČJEGA MESA IN
IZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tina Tušar

**UGOTAVLJANJE KRITIČNIH KONTROLNIH TOČK V KLAVNICI IN
PAKIRNICI PIŠČANČJEGA MESA IN IZDELKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**CRITICAL CONTROL POINTS IN POULTRY SLAUGHTERY AND
PACKAGING ROOM**

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Eksperimentalni delo je bilo deloma opravljeno na inštitutu VTT Technical Research Centre of Finland v okviru evropskega projekta SAFOODNET, deloma pa v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Lea Gašperlin.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Lea Gašperlin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Tušar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 614.3+614.97:637.54:579.67(043)=163.6
KG nadzor nad živil/ higiena živil/higiena živilskih obratov/ klavnice/ piščančje meso/ kritične kontrolne točke/ HACCP/ razkužila/ čistilna sredstva/ *Campylobacter* spp./ *Listeria monocytogenes*/ *Salmonella* spp.
AV TUŠAR, Tina
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica) / GAŠPERLIN, Lea (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN UGOTAVLJANJE KRITIČNIH KONTROLNIH TOČK V KLAVNICI IN PAKIRNICI PIŠČANČJEGA MESA IN IZDELKOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 67 str. 16 pregl., 21 sl., 6 pril., 101 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Na osnovi obstoječega sistema HACCP v klavnici in pakirnici dveh slovenskih perutninskih obratov smo odvzeli brise očiščene in razkužene površine pred začetkom proizvodnje ter umazane površine med potekom proizvodnje. Dodali smo še vzorčna mesta iz proizvodnega okolja, ki niso bila v neposrednem stiku s surovino in izdelkom, ter vzorce končnega izdelka. V brisih in na piščančjem mesu smo določili indikatorske mikroorganizme snažnosti (skupno število mikroorganizmov, koliformne organizme ter *E. coli*) in patogene mikroorganizme rodov *Campylobacter* in *Salmonella* ter vrste *Listeria monocytogenes* - po klasični metodi ter z metodo PCR v realnem času. Rezultati so potrdili prisotnost indikatorskih organizmov in patogenih bakterij *Campylobacter* spp. in *Listeria monocytogenes* na umazanih, pa tudi domnevno čistih in razkuženih površinah. Industrijske izolate in seve iz mikrobiološke zbirke vrste *Listeria monocytogenes* ter rodov *Campylobacter* in *Salmonella* smo uporabili kot testne mikroorganizme pri določitvi protimikrobne aktivnosti čistilnih in razkužilnih sredstev, ki se uporabljajo v preiskovanih obratih. Uporabili smo standardni suspenzijski test (EN 1276, 1997) in površinski test, pri katerem so bakterije pritrjene na kovinske nosilce (Charaf, 2000). Glede na pridobljene rezultate testiranja učinkovitosti uporabljenih čistil in razkužil se je njihova protimikrobna učinkovitost razlikovala, nobeno sredstvo pa ni v celoti ustrezalo zahtevam površinskega testa mikrobicidne učinkovitosti in standardnega suspenzijskega testa. Večina čistil in razkužil je bila učinkovita proti testnim mikroorganizmom *Campylobacter*. Slabše je bilo delovanje proti bakterijskim *Salmonella* in najslabše proti vrsti *Listeria monocytogenes*. Potrdili smo povezavo med prisotnostjo mikroorganizmov na delovnih površinah in njihovo odpornostjo proti sanitacijskim sredstvom, ki jih uporabljajo v proizvodnji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 614.3+614.97:637.54:579.67(043)=163.6
CX food control/ food hygiene/ processing plants hygiene/ slaughterhouses/ poultry meat/ critical control points/ HACCP/ disinfectants/cleaning agents/ *Campylobacter* spp. / *Listeria monocytogenes* / *Salmonella* spp.
AU TUŠAR, Tina
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / GAŠPERLIN, Lea (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme of Food technology
PY 2011
TI CRITICAL CONTROL POINTS IN POULTRY SLAUGHTERY AND PACKAGING ROOM
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 67 p., 16 tab., 21 fig., 6 ann., 101 ref.
LA sl
AL sl/en
AB On the basis of the HACCP system and the existing control points in two poultry slaughterhouses, we determined swab sampling points on processing line where there is direct contact with raw material or product. In addition, swabs were taken from sampling points in the processing environment, and samples of the final product, chicken meat, were taken according to standard procedures. The samples were examined for indicator microorganism, such as total count, coliforms and *E. coli*. We also examined the presence of pathogenic *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. with conventional methods and real-time PCR. We confirmed the presence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* on both dirty and clean and disinfected processing surfaces. Isolated bacterial strains and strains from microbial culture collections of *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* were used for testing antimicrobial efficiency of cleaning agents and disinfectants. We used two different methods: quantitative suspensions test (EN 1276, 1997) and biofilm tests with stainless steel carriers (Charaf, 1999) for the evaluating bactericidal activity of chemical cleaning agents and disinfectants. Based on the results of both methods, bactericidal activity was different for specific agents, but none of the cleaning agents or disinfectants met standard requirements completely. Cleaning agents and disinfectants the highest efficacy against *Campylobacter*, less against *Salmonella* spp. and the least against *Listeria monocytogenes*. We confirmed the connection between the presence of microorganisms on working surfaces after disinfection and their resistance against chemical sanitation agents used in the production plants.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 HIGIENA IN ZAKONSKE UREDBE	3
2.1.1 Področje varnih živil v Sloveniji	3
2.1.2 Področje varnih živil v EU	3
2.1.3 Zagotavljanje varnosti živil	4
2.2 MIKROORGANIZMI IN ZAGOTAVLJANJE VARNOSTI V PERUTNINARSKI INDUSTRIJI	6
2.2.1 Pokazatelji higiene	7
2.2.1.1 Indikatorski mikroorganizmi	7
2.2.1.2 Skupno število mikroorganizmov	8
2.2.2 Najpogostejši patogeni mikroorganizmi perutnine	9
2.2.2.1 <i>Campylobacter</i> spp.	10
2.2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2.2.2.3 <i>Salmonella</i> spp.	12
2.2.3 Tveganja za okužbo med pridelavo in predelavo perutnine	13
2.2.3.1 Potek proizvodnega procesa predelave perutninskega mesa	14
2.2.3.2 Analiza tveganja kritične kontrolne točke v proizvodnem procesu	17
2.2.4 Tvorba biofilmov in njihovo odstranjevanje s procesnih površin	20
2.2.4.1 Biofilmi v industrijskem procesu	20
2.2.4.2 Testiranje protimikrobne učinkovitosti po metodi Charaf	20
2.3 SANITACIJSKI POSTOPKI V PERUTNINARSTVU	21
2.3.1 Splošno o sanitacijskih postopkih v živilskih obratih	21
2.3.1.1 Vrste nečistoč v živilski industriji	22
2.3.1.2 Izbira ustreznih čistil glede na nečistočo	23
2.3.1.3 Izbira učinkovitih postopkov čiščenja	23
2.3.1.4 Izbira ustrezne opreme za čiščenje	23

2.3.1.5 Izbira načina razkuževanja	24
2.3.1.6 Program čiščenja, skladen z zahtevami HACCP	24
2.3.2 Čistilna sredstva in razkužila	26
2.3.2.1 Kemijski postopki sanitacije	26
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 SHEMATSKI PRIKAZ OPRAVLJENEGA DELA	29
3.2 ODVZEM VZORCEV	30
3.3 IZVEDBA MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ	30
3.3.1 Ugotavljanje prisotnosti mikrobioloških indikatorjev snaznosti.....	30
3.3.2 Ugotavljanje prisotnosti patogenih mikroorganizmov	31
3.4 TESTIRANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI ČISTILNIH IN RAZKUŽILNIH SREDSTEV	32
3.4.1 Priprava testnih mikroorganizmov	32
3.4.1.1 Predpriprava mikroorganizmov na poskus	32
3.4.1.2 Priprava bakterijske suspenzije	33
3.4.2 Priprava in testiranje inaktivacijske tekočine	33
3.4.2.1 Priprava inaktivacijske tekočine	33
3.4.2.2 Testiranje inaktivacijske tekočine	33
3.4.3 Priprava delovnih raztopin sanitacijskih sredstev	35
3.4.4 Suspenzijski test mikrobicidne učinkovitosti čistilnih sredstev in razkužil....	37
3.4.5 Površinski test protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev	38
3.4.6 Določitev baktericidnega delovanja	40
4 REZULTATI	41
4.1 DOLOČITEV VZORČNIH MEST	41
4.2 UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV, KOLIFORMNIH M.O. IN BAKTERIJE <i>E. COLI</i>	44
4.2.1 Skupno število mikroorganizmov, koliformni mikroorganizmi in <i>Escherichia coli</i> v obratu F1 in F2	44
4.2.1.1 Klavnica F1 in F2	44
4.2.1.2 Pakirnica F1 in F2	45
4.2.1.3 Vzorci brisov proizvodnega okolja v klavnici in pakirnici (F1 in F2)	46
4.3 PATOGENI MIKROORGANIZMI NA PROIZVODNI LINIJI	48
4.3.1 Spremljanje prisotnosti bakterije <i>Campylobacter spp.</i>	50
4.4 TESTIRANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI ČISTILNIH IN RAZKUŽILNIH SREDSTEV	52
4.4.1 Testiranje učinkovitosti inaktivacijske tekočine	52
4.4.2 Rezultati testiranja protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev	52

4.4.2.1 Rezultati suspenzijskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev	53
4.4.2.1 Rezultati površinskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev	55
5 RAZPRAVA	57
5.1 DOLOČITEV VZORČNIH MEST	57
5.2 UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV, KOLIFORMNIH M.O. IN BAKTERIJE <i>E. COLI</i>	57
5.3 PATOGENI MIKROORGANIZMI NA PROIZVODNI LINIJI	59
5.3.1 <i>Campylobacter</i> spp.	59
5.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	60
5.3.3 <i>Salmonella</i> spp.	60
5.4 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST ČISTILNIH IN RAZKUŽILNIH SREDSTEV	60
5.4.1 <i>Campylobacter</i> spp.	61
5.4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	61
5.4.3 <i>Salmonella</i> spp.	62
6 SKLEPI	63
7 POVZETEK.....	64
8 VIRI	65
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Karakteristike bakterij vrste <i>Campylobacter</i> (<i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i>)	10
Preglednica 2: Karakteristike bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	11
Preglednica 3: Karakteristike rodu <i>Salmonella</i>	13
Preglednica 4: Vrste nečistoč (Marriott, 1995)	22
Preglednica 5: Zmanjšanje števila bakterij na površini po čiščenju in po čiščenju z razkuževanjem (Reuter, 1998)	25
Preglednica 6: Aplikacije razkužilnih sredstev (Holah, 2003)	26
Preglednica 7: Najpogostejše snovi v čistilnih in razkužilnih sredstvih ter njihove prednosti in slabosti (Wirtanen 1995, Flemming 1991, Troller 1993)	28
Preglednica 8: Sestava čistil, uporabljenih v poskusu	36
Preglednica 9: Sestava razkužil, uporabljenih v poskusu	35
Preglednica 10: Kriteriji za oceno ustreznosti čistosti brisov .. Error! Bookmark not defined.	
Preglednica 11: Rezultati testiranja učinkovitosti inaktivacijske tekočine	52
Preglednica 12: Primer označevanja rezultatov testov protimikrobne učinkovitosti čistil in razkužil	52
Preglednica 13: Rezultati suspenzijskega testa protimikrobne učinkovitosti razkužilnih sredstev (F1 in F2)	53
Preglednica 14: Rezultati suspenzijskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih sredstev (F1 in F2)	54
Preglednica 15: Rezultati površinskega testa protimikrobne učinkovitosti razkužilnih sredstev (F1 in F2)	55
Preglednica 16: Rezultati površinskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih sredstev (F1 in F2)	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Zahteve in odgovornosti pri vzpostavitvi uspešnega higienskega menedžmenta po principih HACCP (WFK, 2007).....	5
Slika 2: Mikroba rast kot osrednji element bioloških in kemijskih tveganj in posledice v industrijskih procesih (Maukonen in sod., 2003)	6
Slika 3: Najpogostejši indikatorski mikroorganizmi (razmerje med fekalnimi koliformnimi, nefekalnimi koliformnimi mikroorganizmi in <i>E. coli</i>) (Wutor in sod., 2009)	8
Slika 4: Vplivi okolja in higiene na zdravje živali (Nahberger Marčič in Vidovič, 2002).....	14
Slika 5: Analiza tveganja in kritične točke v klavnici perutninskega mesa (interno gradivo podjetja F2)	18
Slika 6: Analiza tveganja in kritične točke v pakirnici perutninskega mesa (interno gradivo podjetja F2)	19
Slika 7: Prečni prerez pripravljenega gojišča za gojenje biofilmov na jeklenih nosilcih (Charaf in sod., 1999).....	21
Slika 8: Potek preiskave.....	29
Slika 9: Shema poteka testiranja inaktivacijske tekočine	34
Slika 10: Shema postopka za izvedbo suspenzijskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev	37
Slika 11: Shema postopka za izvedbo površinskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev.....	39
Slika 12: Procesna shema klavnice piščančjega mesa z označenimi mesti vzorčenja.....	41
Slika 13: Procesna shema pakirnice piščančjega mesa z označenimi mesti vzorčenja	42
Slika 14: Vzorci iz proizvodnega okolja z mesti vzorčenja in oznakami	43
Slika 15: Vzorec kože z vratu z oznako	43
Slika 16: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov s številom koliformnih mikroorganizmov in <i>E. coli</i> v vzorcih brisov proizvodne linije v klavnici piščančjega mesa v podjetjih F1 in F2.	46
Slika 17: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov s številom koliformnih mikroorganizmov in <i>E. coli</i> v vzorcih brisov iz proizvodne linije pakirnice piščančjega mesa v podjetjih F1 in F2.	47
Slika 18: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov s številom koliformnih mikroorganizmov in <i>E. coli</i> v vzorcih brisov iz proizvodnega okolja predelave piščančjega mesa v podjetjih F1 in F2.	48
Slika 19: Procesna shema klavnice z označenimi mesti vzorčenja, na katerih smo z obema metodama potrdili prisotne patogene mikroorganizme	48
Slika 20: Procesna shema pakirnice z označenimi mesti vzorčenja, na katerih smo z obema metodama potrdili prisotne patogene mikroorganizme.....	49
Slika 21: Shema vzorčnih mest prisotnih patogenih mikroorganizmov v vzorcih proizvodnega okolja.....	50

KAZALO PRILOG

Priloga A: Diagram poteka identifikacije bakterij *Campylobacter* spp.

Priloga B: Diagram poteka identifikacije bakterij *Listeria monocytogenes*

Priloga C: Diagram poteka identifikacije bakterij *Salmonella* spp.

Priloga D: Seznam uporabljenih trdnih gojišč glede na mikroorganizem

Priloga E: Seznam uporabljenih tekočih gojišč glede na mikroorganizem

Priloga F: Učinkovitost čistilnih in razkužilnih sredstev

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a_w	vodna aktivnost (ang. water activity)
AHB agar	Abeyta Hunt Bark agar
<i>C. jejuni</i>, <i>C. coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter coli</i>
CFU/ml, CFU/cm²	število kolonijskih enot na ml ali cm ² (angl. Colony Forming Units)
CIP	Zaprt sistem čiščenja (angl. Cleaning In Place)
DHP	dobra higienska praksa
DPP	dobra proizvodna praksa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F1	oznaka za prvo podjetje, kjer smo opravili vzorčenje
F2	oznaka za drugo podjetje, kjer smo opravili vzorčenje
HACCP	analiza tveganja kritičnih kontrolnih točk (angl. Hazard Analysis of Critical Control Points)
KAS	kvarterne amonijeve spojine
KKT	kritična kontrolna točka
KT	kontrolna točka
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
m	mejna vrednost, rezultati nad to vrednostjo so zadovoljivi
M	mejna dopustna vrednost, rezultati nad to vrednostjo ne ustrezajo standardu
MAS	mikrobiološka ocenjevalna shema (angl. Microbial Assesment Scheme)
ME	enota za mikrobicidno učinkovitost čistil (angl. Microbicidal Effect)
MHA	gojišče (angl. Mueller-Hinton Agar)
MHB	gojišče (angl. Mueller-Hinton Broth)
MO	okrajšava za mikroorganizem
NA	hranljivi agar (angl. Nutrient Agar)
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteridis

SIM	strojno izkoščeno meso
SŠM	skupno število mikroorganizmov
TSA	triptični sojin agar
TTC	trifeniltetrazolijev kloridni agar
YOPI	ogrožene skupine (angl. Young, Old, Pregnant, Immuno-compromised)
VTT	Finski tehniško raziskovalni center (angl. Technical Research Centre of Finland)
ZZUZIS	Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili

1 UVOD

Sodobni potrošnik želi varen in kakovosten izdelek s čim daljšo dobo uporabnosti. Higiena v živilskih obratih je pomemben člen v proizvodnji varnih in kakovostnih živilskih izdelkov. Mikrobiološka obstojnost in kakovost posameznega izdelka je v veliki meri odvisna od stanja kontaminacije začetne surovine, postopkov tehnološkega procesa, higiene delovnih površin, opreme in osebja, ki prihaja v neposreden stik z živilom.

Stopnja čistosti površin odseva kakovost mehanskega čiščenja v kombinaciji z učinkovitostjo čistilnih sredstev in razkužil. Prav ti so ključni dejavniki za vzdrževanje še sprejemljivega nivoja mikrobiološke kontaminacije v proizvodnih razmerah. Na proizvodno linijo se z živalskimi trupi dnevno vnaša mikrobiološke povzročitelje kvarjenja in zdravju škodljive mikroorganizme. Tveganje, ki ga predstavljajo, se še povečuje, če so jim omogočene razmere za rast ali tvorbo biofilma. Z uporabo uspešnih sanitacijskih postopkov in učinkovitih čistilnih ter razkužilnih sredstev se vse nečistoče dnevno odstranjujejo. Kot najučinkovitejši sistem za zagotavljanje varnosti izdelkov se je izkazala analiza tveganja kritičnih točk in kritičnih kontrolnih točk po HACCP sistemu.

Z eksperimentalnim delom diplomske naloge smo želeli pridobiti vpogled v mikrobiološko sliko že obstoječih kritičnih mest in pripraviti oceno biološkega tveganja v predvidoma novih kritičnih točkah pred in po sanitacijskem postopku. Velik vpliv na kakovost čiščenja pa imajo prav izbrana čistilna in razkužilna sredstva. Zato smo želeli preveriti kako učinkovita so ta sredstva proti bakterijskih vrstam, ki največkrat naseljujejo prebavni trakt živih živali in so zato najpogostejši onesnaževalci perutninskih obratov. Patogene bakterije *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* in *Salmonella* spp. predstavljajo največje tveganje pri piščančjem mesu. Ko se ukvarjamo s patogenimi mikroorganizmi, so rešitve problema preproste in kompleksne hkrati, še posebej pri živilih, ki jih je potrebno pred uporabo toplotno obdelati. Do problemov pride šele ob napakah v procesu obdelave in predelave do končnega produkta. Pomembno je pravilno rokovanje z živilom po načelu »od polja do vilic« torej vzdolž celotne proizvodno-prehranske verige, saj le tako lahko zagotovimo ustrezno varnost živila.

1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA

Cilji te diplomske naloge je bila ocena obstoječih in privedvidoma novih kritičnih točk v proizvodnem procesu na podlagi naslednjih eksperimentalnih korakov:

- določitev vzorčnih mest na osnovi sheme proizvodnega procesa že evidentiranih in predvidoma novih kritičnih točk pred in po sanitacijskem postopku;
- odvzem brisov in mikrobiološke analize ugotavljanja prisotnosti skupnega števila mikroorganizmov, indikatorskih organizmov in izbranih patogenih mikroorganizmov (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*);
- identifikacija bakterij izbranih patogenih mikroorganizmov iz pozitivnih vzorcev in njihova uporaba pri laboratorijskem testiranju protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev, ki jih uporabljajo v proizvodnji;
- izvedba testiranja protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev s suspenzijskim testom (EN 1276, 1997) in površinskim testom (Charaf, 2000).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Na podlagi zastavljenih ciljev smo predpostavili:

- da bodo rezultati pokazali odsotnost patogenih bakterij (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*) na čistih in razkuženih površinah;
- da bomo potrdili prisotnost vsaj nekaterih vrst patogenih bakterij (npr. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. in *Campylobacter* spp.) v vzorcih brisov površin, ki smo jih odvzeli med potekom proizvodnje;
- da bomo potrdili povezavo med prisotnostjo mikroorganizmov na delovnih površinah in njihovo odpornostjo proti sanitacijskim sredstvom, ki jih uporabljajo v proizvodnji.

2 PREGLED OBJAV

2. HIGIENA IN ZAKONSKE UREDBE

2.1.1 Področje varnih živil v Sloveniji

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil (ZZUZIS-Zakon o zdravstveni..., 2000; ZZUZIS-A-Zakon o spremembah..., 2002; ZdZPZ-Zakon o spremembah in dopolnitvah..., 2004) določa pogoje, ki jih morajo izpolnjevati živila, aditivi za živila in izdelki ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, da so zdravstveno ustrezni. Zakon ureja zdravstveni nadzor nad njihovo proizvodnjo in prometom z namenom, da se varuje zdravje ljudi in zaščitijo interesi potrošnika. V prvi vrsti zakon opredeljuje pojem živilo, kot vse kar ljudje uporabljajo za prehranske namene v nepredelani, polpredelani ali predelani obliki, vključno s pitno vodo. Prav tako so definirani pojmi proizvodnje in prometa živil, pojmi onesnaženja in higijene živil. V 6. členu je definirana zdravstvena ustreznost živil. Živila so zdravstveno ustrezna, če ne vsebujejo mikroorganizmov ali parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik ali izločkov, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi (ZZUZIS-Zakon o zdravstveni..., 2000). Slovenska zakonodaja ločuje pristojnosti veterinarske uprave, ki nadzoruje proizvajalce živil živalskega izvora in pristojnosti zdravstvene inšpekcije, ki nadzoruje ostale proizvajalce živil. Poleg zunanjega nadzora (zdravstveni, veterinarski, tržni inšpektorji) se nad zdravstveno ustreznostjo ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, izvaja tudi notranji nadzor (Jeršek, 2009). Izvajajo ga pravne ali fizične osebe, ki proizvajajo in dajejo v promet živila, nadzor pa je vzpostavljen na osnovah sistema HACCP. Slovenija je uskladila svojo zakonodajo z Evropsko Skupnostjo in sprejela določene spremembe zakonov in pravilnikov, ki se tičejo živil, higijene živil in uradnega nadzora nad živili. Znotraj zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, je bil tudi Pravilnik o higieni živil, ki je prenehal veljati 2007 (Pravilnik o prenehanju..., 2007).

2.1.2 Področje varnih živil v EU

Evropska skupnost je naredila pomemben korak z vključitvijo HACCP sistema v evropsko zakonodajo z direktivo 93/43 EEC (Raspor, 2004; Potočnik, 2001; Council Directive..., 1993). Skoraj desetletje kasneje pa je bil objavljena Bela knjiga o higieni živil (angl. White Paper on Food Safety) (European Parliament resolution..., 2001). Dokument je radikalno spremenil zakonodajo in njegov pglavitni cilj je bil zagotoviti visoko raven varstva potrošnikov (Raspor, 2004). Vsak nosilec dejavnosti, v živilski verigi mora zagotoviti varnost živil namenjenih za prehrano ljudi, tekom pridelave, predelave, distribucije, prometa do priprave živil. Sledila je regulativa ES 178/2002 Evropskega parlamenta in sveta, ki je jasno opredelila cilje evropske politike o splošnih načelih in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitve Evropske agencije za varnost hrane in postopkov, ki zadevajo varnost hrane, znana kot splošna živilska zakonodaja (Regulation (EC) No 178/2002..., 2002). Leta 2004 pa je bila sprejeta Uredba o higieni živil (Regulation (EC) No 853/2004..., 2004), ki določa minimalne higienske zahteve za proizvajalce živil članic evropske unije. Uredba št. 853/2004 se od začetka leta 2006 uporablja v vseh državah

članicah EU (Regulation (EC) No 852/2004..., 2004). V skladu s to uredbo morajo po zakonu vsa podjetja, ki delujejo na področju prehranske industrije, upoštevati načela HACCP. Ta uredba omogoča večjo prilagodljivost postopkov in aktivnosti, s čimer se zagotavlja izpolnjevanje zahtev tudi manjšim in manj razvitim podjetjem (MKGP, 2010).

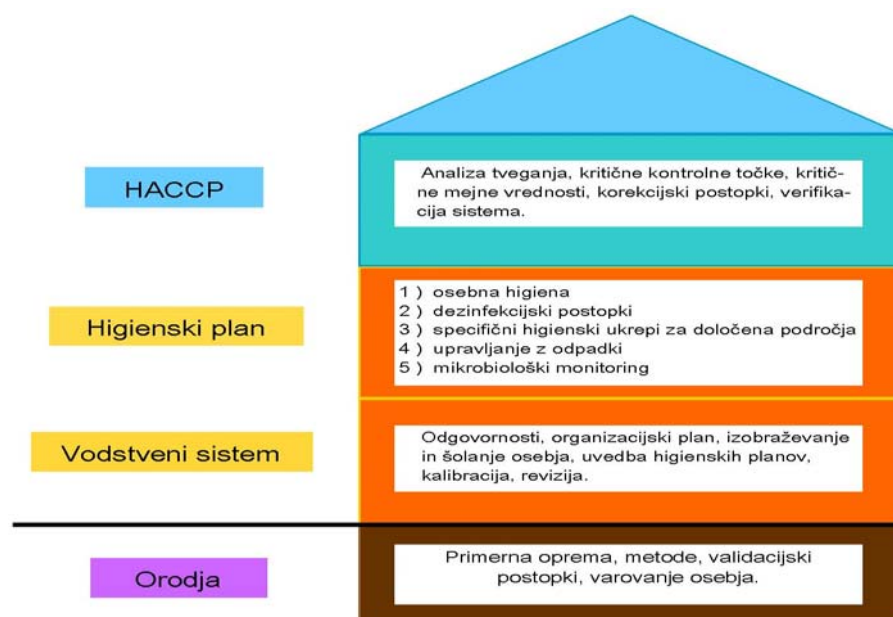
Pravila regulativ temeljijo na sledečih principih (MKGP, 2010):

- primarna odgovornost za zagotavljanje varne hrane je na strani nosilca živilske dejavnosti;
- varnost živil mora biti zagotovljena skozi celotno prehransko verigo, vključno s primarno proizvodnjo;
- v celotni prehranski verigi morajo biti vključeni postopki, ki temeljijo na principih HACCP;
- obvezna je registracija in odobritev živilskih obratov;
- zakonodaja omogoča razvoj smernic dobre higienske prakse, oziroma določa uporabo principov HACCP, kot orodja za izpolnjevanje novih zahtev zakonodaje;
- upoštevana je fleksibilnost zakonodaje do proizvajalcev v odročnih predelih (npr. visokogorje) ter do tradicionalnih postopkov in metod.

2.1.3 Zagotavljanje varnosti živil

Vsako živilsko podjetje se spopada s problemi kako optimizirati proizvodnjo, hkrati pa vzdrževati kakovost in dosegati optimalno varnost izdelka. Temelj uspešnega vodenja proizvodnje je sledenje principom dobre proizvodne prakse (DPP). Začetki segajo v leto 1968 (WHO), pri nas pa je zakonsko obvezna od leta 1997. Dobra proizvodna praksa je skupek vseh dejavnikov, ki zagotavljajo, da je kakovost, varnost in učinkovitost živila v skladu z njegovo specifikacijo in nameravano uporabo. Od dobre proizvodne prakse se je ločila dobra higienska praksa (DHP), ki združuje postopke sanitarnega in tehničnega dela in ga danes imenujemo higienski menedžment (Raspor, 2004).

Uspešen sistem higienskega menedžmenta podjetja vzdržuje visoko splošno stopnjo higiene, zagotavlja skladnost predpisov, določa, oceni in nadzoruje nevarnosti vzdolž produkcijske linije ter določa kritične vrednosti in predpiše ukrepe v kritičnih situacijah (slika 1). Nadgradnja dobre proizvodne prakse je prilagajanje dejanskemu proizvodnemu procesu, da se tveganje za končni izdelek in za potrošnika zniža na minimum. Po definiciji v uradnem listu je HACCP (angl. Hazard Analysis Critical Control Point) sistem, ki omogoča identifikacijo oziroma prepoznavanje, oceno, ukrepanje in nadzor nad morebitno prisotnimi škodljivimi agensi v živilih ali stanji, ki lahko ogrožajo zdravje človeka (ZZUZIS-Zakon o zdravstveni..., 2000). Načela HACCP so instrument, ki pomaga živilskopredelovalnim obratom in osebju doseči visok standard pri zagotavljanju varne hrane. HACCP ni nadomestilo za higienski menedžment ampak samo razvoj že obstoječih sistemov, ki so osnovani na analizi tveganj in nevarnosti. Sistem HACCP je prenesel težišče nadzorstva iz retrospektivne analize na preventivno naravnani sistem.



Slika 1: Zahteve in odgovornosti pri vzpostavitvi uspešnega higienskega menedžmenta po principih HACCP (WFK, 2007)

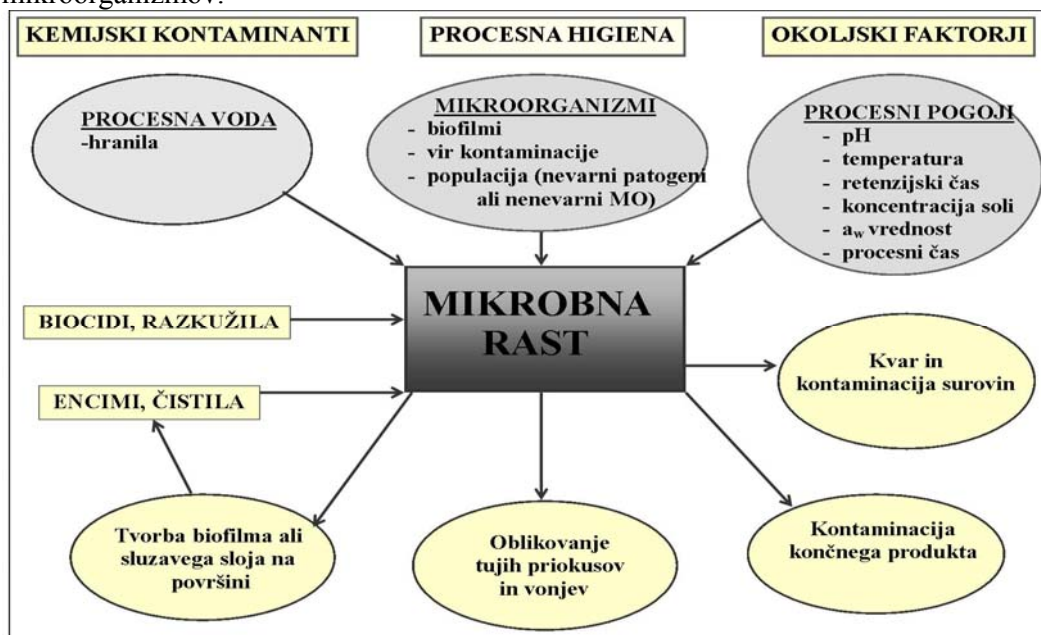
Na sliki 1 so navedeni temelji za uspešno vzpostavitev higienskega menedžmenta po načelih HACCP sistema. Vodstvo mora zagotoviti primerno opremo v proizvodnji (ustrezna delovna oprema, gladke površine iz primerne materiala). Potrebno je dosledno izvajanje sanitacijskih postopkov, pravilna izbira metod čiščenja za vzdrževanje higiene in periodično vrednotenje uspešnosti metod. Vodstvo obrata nosi odgovornost za organizacijo izvajanja higienskih postopkov, šolanje osebja in uvedbo kontrole nad izvrševanjem higienskih planov. Poskrbeti je treba za varno delovanje osebja (izobraževanje o osebni higieni, tveganju za infekcije, zastrupitve s hrano ter način pravilnega rokovanja s kemikalijami v proizvodnji in ukrepi ob nesrečah). Nadalje je potrebno uskladiti učinkovit higienski plan, ki vključuje osebno higieno zaposlenih, načrtuje se plan čiščenja, dezinfekcije in vzdrževanja. Poleg tega se določi tudi način odstranjevanja odpadkov, ukrepe ob možnih nesrečah, načrtuje se pogostost dezinsekcije in deratizacije ter načrtuje izobraževanje za delavce o pomembnosti vzdrževanja higiene. Naloge strokovne ekipe higienskega menedžmenta obsegajo načrtovanje organizacijskega plana po načelih HACCP, urejanje dokumentacije in vzpostavitev seznama tveganj. Šele na trdnih temeljih se lahko ovrednoti tveganja (biološki, kemijski in fizikalni dejavniki tveganja). Nadalje se določi kontrolne točke (KT) in kritične kontrolne točke (KKT), vključno s parametri in kritičnimi mejnimi vrednostmi. Načrtuje in opiše se metode merjenja ter način shranjevanja podatkov in določi odgovorne osebe za monitoring ter kontrolo KKT (WFK, 2007).

V nadaljevanju se bomo ukvarjali s čiščenjem procesne linije in t.i. biološkimi viri tveganj. Osredotočili se bomo na povzročitelje alimentarnih infekcij (vrste *Salmonella*, *Campylobacter* in *Listeria*). Nadgradnja sistema higienskega menedžmenta je namreč vzpostavitev mikrobiološke ocenjevalne sheme (angl. Microbial Assessment Scheme). MAS ali mikrobiološka ocenjevalna shema je postopek, ki je bil razvit kot orodje za

sistematično analizo mikrobioloških rezultatov in za vrednotenje sistema za zagotavljanje varnosti v živilski proizvodnji. Prednost sistema MAS je v mikrobiološkem nadzoru kritičnih kontrolnih točk na procesni liniji, kjer se lahko prepreči porast potencialnih tveganj in ne izključno kontrola končnega izdelka. Sistem MAS vključuje identifikacijo kritičnih kontrolnih točk za vzorčenje, izbor mikrobioloških parametrov, pogostost in izbor metode vzorčenja, izbor same analitske metode ter način končne obdelave rezultatov in njihovo interpretacijo. Smiselno je preverjati vzorce po načelu 3-3-3, 3 krat na dan (na začetku, med proizvodnjo in na koncu dneva), 3 dnevi v mesecu v treh zaporednih mesecih (Jacxens in sod., 2009). Proizvodni obrati največkrat mikrobiološko testirajo končne produkte, če zadoščajo pogojem varnosti. Veliko bolj učinkovit način pa je določiti parametre za vsako posamezno kritično mesto. Mikrobiološke metode so nepogrešljive pri verifikaciji oz. preverjanju učinkovitosti celotnega sistema nadzora HACCP in postavljenih kritičnih mejnih vrednosti parametrov (Smole Možina, 2002). Skupno število mikroorganizmov v kritičnih kontrolnih točkah daje oceno možnosti okužbe na teh točkah. Sistem je uspešen, ko zagotavljamo nizko število mikroorganizmov in zaznamo le manjše spremembe v obsegu mikrobiološke populacije (ICMSF, 2002).

2.2 MIKROORGANIZMI IN ZAGOTAVLJANJE VARNOSTI V PERUTNINARSKI INDUSTRIJI

V splošnem velja, da so mikrobiološka tveganja najpomembnejša, najpogostejša in najtežje obvladljiva, zaradi zmožnosti razmnoževanja ter tvorbe toksinov v živilu (Smole Možina, 2002). Za preprečevanje alimentarnih toksiko-infekcij in velike ekonomske škode, ki je posledica mikrobiološkega kvara živil, je pomembno poznavanje biologije mikroorganizmov.



Slika 2: Mikrobna rast kot osrednji element bioloških in kemijskih tveganj in posledice v industrijskih procesih (Maukonen in sod., 2003)

Najpomembnejši dejavniki kemijskega in biološkega tveganja v živilskem procesu povezanem z mikrobno rastjo ter načini preprečevanja so podani na sliki 2. Mikroorganizmi v hrani in v industrijski predelavi živil so porazdeljeni neenakomerno in občasno, glede na spremembe pogojev v okolju. Na mikrobno rast in vrsto imajo vpliv notranji dejavniki, kot so kemijska sestava in naravno prisotna mikrobiota. Perutninsko meso je s svojo nevtralno vrednostjo pH (6,3-6,5) in visoko aktivnostjo vode (0,99), idealen substrat za razmnoževanje mikroorganizmov (Adamič in sod., 2003). Na zunanje dejavnike pa lahko vplivamo tekom industrijskega procesa oz. s procesi skladiščenja. Intenzivnost kontaminacije in sestava mikrobiote sta odvisni od začetne kontaminacije, tehnološkega procesa, higiene površin v stiku z mesom, temperature in časa skladiščenja. Dnevno se mikroorganizme z živalskimi trupi vnaša v tehnološki proces in jih po končani proizvodnji odstranjuje s sanitacijo. Število mikroorganizmov in vrsta se spreminja glede na vrsto proizvoda (Maukonen, 2003). Glede na to so potrebni določeni higienski ukrepi, ki so odvisni od vrste prisotnih mikroorganizmov, njihove zmožnosti za rast na proizvodni površini oziroma živilu ter njihove sposobnosti preživetja tekom priprave (kuhanje, pasterizacija, konzerviranje, globoko zmrzovanje, sušenje) ali med skladiščenjem. Varnost, kvaliteta in obstojnost končnega proizvoda so v veliki meri odvisni od obsega mikrobne kontaminacije na proizvodni liniji, torej posredno tudi od učinkovitosti dnevne sanitacije.

2.2.1 Pokazatelji higiene

2.2.1.1 Indikatorski mikroorganizmi

Rutinska mikrobiološka preiskava snažnosti v industriji zahteva takojšen rezultat, temu pa ni kos klasična preiskava z inkubacijo in precepljanjem. Na trgu najdemo kar nekaj hitrih testov, ki temeljijo na detekciji t.i. indikatorskih bakterij. Indikatorski mikroorganizmi so mikroorganizmi, katerih prisotnost nakazuje na možnost rasti tudi drugih patogenih bakterij ali kvarljivcev (Jeršek, 2009). Indikatorski mikroorganizmi so lahko fekalne koliformne bakterije, ne-fekalne koliformne (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* in *Klebsiella*), enterokoki in bakterije iz družine Enterobacteriaceae (*Citrobacter*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) (Jeršek, 2010). Forsythe in Hayes (1998) ločita indikatorske mikroorganizme na tako imenovane "indeks" organizme, katerih prisotnost v hrani napove možnost patogenov v istem vzorcu (zdravstvena oporečnost) in "indikatorske" organizme, ki dajejo informacije o splošnem mikrobiološkem stanju živila (higienska kvaliteta). Razlika med obema je lahko nedoločljiva in tak primer so bakterije družine Enterobacteriaceae.

Idealni indikatorski mikroorganizem higienskega stanja, ki pa pravzaprav ne obstaja oz. še ni bil odkrit, bi izpolnjeval vse navedene kriterije (Forsythe in Hayes, 1998):

- je prisoten le v primeru fekalne kontaminacije,
- izkazuje enako ali boljšo stopnjo preživetja kot tarčni patogen,
- se ne razmnožuje zunaj gostitelja,
- je eksperimentalno lahko dokazljiv v čim krajšem času.



Slika 3: Najpogostejši indikatorski mikroorganizmi (razmerje med fekalnimi koliformnimi, nefekalnimi koliformnimi mikroorganizmi in *E. coli*) (Wutor in sod., 2009)

Najpogostejši indikatorski organizmi so koliformni mikroorganizmi. Koliformni organizmi so gram-negativne, oksidaza negativne, nesporogene paličaste bakterije, ki rastejo aerobno ali fakultativno anaerobno. V velikih koncentracijah naseljujejo prebavni trakt človeka in toplokrvnih živali (Gerardi in Zimmerman, 2005). Ločimo jih na fekalne in nefekalne (slika 3). Fekalne rastejo ob prisotnosti žolčnih soli, kot vir hranil izkoriščajo pepton, laktozo pa razgrajujejo v kislino in plin (pri gojenju na 44-45,5 °C). Koliformna fekalna bakterija je *Escherichia coli*, nefekalna pa *Enterobacter aerogenes*. Bakterijo *E. coli* zelo redko najdemo drugje kot v gastrointestinalnem traktu človeka in živali, zato je klasični indikator prisotnosti enteričnih patogenov. Resnost onesnaženja vode s fekalijami ocenjujemo s količino bakterij *E. coli*, ker se le-te v vodi ne razmnožujejo (Forsythe in Hayes, 1998). V živilih pa je povezava med bakterijo in okužbo manj zanesljiva. Veliko število zraslih kolonij ne pomeni nujno močne fekalne kontaminacije in odsotnost *E. coli* ne pomeni nujno odsotnosti drugih fekalnih mikroorganizmov. Prav tako iz naraščanja koncentracije *E. coli* ne moremo sklepati, da se podobno obnašajo ostale enterobakterije. Iz povišanega števila bakterije v živilu pa lahko sklepamo na ugodne pogoje za razvoj tudi ostalih bakterij družine Enterobacteriaceae (Jeršek, 2010). Razrast kolonij *E. coli* je bodisi posledica kontaminacije s fekalijami, rasti bakterije v hrani, slabo očiščene opreme bodisi kontaminacije preko osebja. Bakterijska vrsta *Enterobacter aerogenes* pa je ubikvitarna bakterija in dobro raste tudi izven gastrointestinalnega trakta (Forsythe in Hayes, 1998).

2.2.1.2 Skupno število mikroorganizmov

Mikrobiološko sliko snaznosti lahko določimo tudi s skupnim številom živih mikroorganizmov. Inkubacija pri temperaturi 25-30 °C je indikator higiene živilskega obrata, pri temperaturi 30-37 °C pa indikator potencialnega zdravstvenega tveganja (Jeršek, 2010). Stalen nadzor nad skupnim številom bakterij (angl. Total viable count, 24h/30-37 °C) na določenih kritičnih točkah je dovolj, da vsako odstopanje upoštevamo kot svarilo za možnost okužbe (Forsythe in Hayes, 1998). Skupno število živih oziroma za

reprodukcijo sposobnih mikroorganizmov določimo s štetjem kolonij na ploščah. Pri preiskavi živil sta izbira razmer in gojišča za inkubacijo težavni, saj živila vsebujejo zelo raznovrstne mikroorganizme. Na splošno velja, da čimbolj je sestava gojišča zapletena, več različnih mikroorganizmov bo raslo na gojišču (Jeršek, 2010).

2.2.2 Najpogostejši patogeni mikroorganizmi perutnine

Trup (koža, perje) in prebavni trakt so gostitelji številnih mikroorganizmov, ki lahko povzročajo obolenja živali, živali in ljudi ali pa so kvarljivci mesa. Najpogostejše patogene bakterije *Campylobacter* spp. in *Salmonella* spp. pridejo v obrat pri reji, prek stelje, vode, hrane, osebja, glodalcev, insektov, divjih ptic ali zraka. V črevesu in slepem črevesu klinično zdrave perutnine pogosto najdemo bakterije rodu *Campylobacter* v koncentraciji 10^5 - 10^6 CFU/g vsebine črevesa. Običajno je dve tretjini bakterij rodu *Campylobacter* iz fecesa piščancev, prepoznanih kot *Campylobacter jejuni* in le tretjina kot *Campylobacter coli* (EFSA, 2010a). V slepem črevesu perutnine najdemo tudi salmonele, ki se hitro razmnožujejo in dosežejo koncentracijo 10^8 CFU/g vsebine črevesa. Pri perutnini sta specifični vrsti *S. gallinarum* in *S. pullorum* in *S. Enteritidis*, ki je patogena za ljudi (Gašperlin in Bem, 2003).

Po poročilu EFSA za leto 2008 so v vseh 26 preiskovanih državah EU potrdili prisotnost *Campylobacter* in *Salmonella* (EFSA, 2010c). Vzorci fecesa ali površine klavnih živali iz 561 klavnic so bili pozitivni na *Campylobacter* v 75 % in *Salmonella* v 15,6 % odvzetih vzorcev. Od 15,6 % izoliranih sevov *Salmonella*, je bilo potrjenih kar 3,6 % kot *Salmonella* Enteritidis ali *Salmonella* Typhimurium (EFSA, 2010b; EFSA, 2010c). Poleg teh dveh rodov bakterij najdemo pri perutnini še celo vrsto patogenih mikroorganizmov, ki povzročajo alimentarne toksikoinfekcije. Obolenja, povzročena s sevi *Listeria monocytogenes*, so pogostejša pri divjih pticah. V črevesju perutnine je lahko prisoten tudi toksinogen *Clostridium botulinum* ali *C. perfringens*, ki je pokazatelj fekalne okužbe mesa. Bakterijo *Escherichia coli* najdemo v zadnjem delu črevesa, vendar večina sevov ni patogena za ljudi. Izjema je enterohemoragični sev *E. coli* O157:H7, ki je povzročitelj alimentarnih toksikoinfekcij (Gašperlin in Bem, 2003). Po poročilih EFSA-e je bilo v letu 2009 v EU prijavljenih 3.573 primerov zastrupitev z *E. coli* O157:H7 (EFSA, 2011). V jatah intenzivne reje piščancev povzročajo bolezni še *Chlamidia psittaci*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium avium* in številne druge (Gašperlin in Bem, 2003).

Kampilobakterioza s 198.252 prijavljenimi primeri po statistiki EFSA za leto 2009, je še vedno najpogostejša črevesna okužba povzročena s hrano (EFSA, 2011). Sledi ji salmoneloza s 108.614 primeri, ki je največkrat posledica uživanja nezadostno toplotno obdelane perutnine in svinjskega mesa. Listerioza je sicer na repu statistike, vendar je to okužba z največ smrtnimi primeri (1.645) (EFSA, 2011). Kljub prisotnosti patogenov pa so mikrobne okužbe s hrano še vedno najpogostejše posledica nestrokovnega in nehiigijskega rokovanja z mesom pri pripravi perutninskega mesa in jajc, nezadostne toplotne obdelave, priprave hrane vnaprej, hranjenja živil na sobni temperaturi, neustreznega pogrevanja ali odtajevanja živil (Milohnoja, 2003).

2.2.2.1 *Campylobacter* spp.

Bakterije vrste *Campylobacter* spp. so gram-negativne, spiralno zavite, gibljive palčke. So mikroaerofilne, za rast potrebujejo kisik (5-10 % kisika), preživijo pa tudi v pakiranju s plinom ali v vakuumu. Preživijo temperaturo hladilnika in prenašajo zmrzovanje, vendar se pod 30 °C ne razmnožujejo. Zelo občutljive so na visoke temperature (Adamič in sod., 2003). Okužba s kampilobakterji je ena od najpogostejših črevesnih okužb v Sloveniji in svetu (IVZ, 2008b; Peyrat in sod, 2008). Po navedbah zavoda za zdravstveno varstvo se števila še povečuje. Podobno stanje je v nekaterih drugih evropskih državah (EFSA, 2011).

Preglednica 1: Karakteristike bakterij vrste *Campylobacter* (*C. coli*, *C. jejuni*)

<i>Campylobacter</i> spp. KLASIFIKACIJA (Garrity in sod., 2005) Kraljestvo: Bacteria Deblo: Proteobacteria Razred: Epsilonproteobacteria Red: Campylobacterales Družina: Campylobacteraceae Rod: <i>Campylobacter</i>		
PARAMETRI RASTI in PREŽIVETJA	MEJNE VREDNOSTI	REFERENCE
Min a_w (za rast)	0,987	ICMSF, 1996
Max koncentracija NaCl za preživetje	1,5-6,5 % (pri nizkih T je toleranca nižja)	ICMSF, 1996
pH (za rast)	min 4,9 opt 6,5-7,5 max ca. 9,0	ICMSF, 1996
Temperatura (za rast)	min 32 °C opt 42-43 °C max 45 °C	ICMF, 1996
Toplotna odpornost celic (D-vrednost)	posneto mleko 48 °C/ 7,2-12,8 min meso 60 °C/ < 1,0 min mleto pišč. meso 49 °C/ 20 min; 57°C/ 45 s	Doyle in sod., 1989

Po podatkih EFSA je v 50-80 % primerih je izvor okužb s *C. jejuni* perutnina ali jajca, od tega je kar 20-30 % primerov kampilobakterioze vezanih na nepravilno rokovanje, pripravo in uživanje piščančjega mesa (EFSA, 2010a). Vir okužbe pa je lahko tudi pomankljivo toplotno obdelano goveje ali prašičje meso, sveže gobe ali mleko. Do okužbe lahko pride z navzkrižno kontaminacijo med predelavo perutnine, v mlekarstvu, preko okužene vode ali preko bolnega oseba. Kampilobakterioze imajo specifično

epidemiologijo in jih uvrščamo med zoonozne črevesne kužne bolezni okužbe. Infektivna doza pri kampilobakteriozi je minimalno 500 živih celic. Inkubacijska doba traja 2-10 dni, bolezen pa traja 2-7 dni. Simptomi bolezni so krvava diareja, krči v želodcu, mišicah in sklepih, vročina, slabost, bruhanje ter glavobol. V redkih primerih se pojavi vnetje sklepov, oslabelost srca, vnetje oči in trebušne slinavke (Aho in sod., 1989).

2.2.2.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes so ubikvitarne, gram-pozitivne, gibljive, fakultativno anaerobne paličaste bakterije. So nesporogene, a relativno dobro odporne proti neugodnim dejavnikom okolja. Bakterije so katalaza pozitivne in oksidaza negativne ter hemolizirajo β -hemolizin, kar povzroča razpad rdečih krvnih teles. Rod *Listeria* vsebuje 6 različnih vrst: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeliger* in *L. grayi*. Od vseh vrst samo *L. monocytogenes* povezujemo z okužbo pri človeku in jo ločimo od drugih vrst po tvorbi β -hemolize na krvnem agarju (Adamič in sod., 2003). Toplotna obdelava 20 min pri 70 °C zagotovi popolno uničenje bakterij. Temperatura hladilnika (4 °C) upočasni, zmrzovanje izdelkov na -18 °C pa prepreči razmnoževanje bakterij (Slutsker in Schuchat, 1999).

Infektivna doza za zdrave osebe znaša med 10^5 - 10^9 CFU/g in za rizične skupine (YOPI) 10 - 10^4 CFU/g. Inkubacijska doba traja od 18 ur do 2 mesecev. *Listeria monocytogenes* je znotraj celični parazit in povzroči razpad celice. Zastrupitev pri normalno odpornih osebah je podobna simptomom gripe. Izjema so nosečnice pri katerih lahko zastrupitev povzroči prezgodnji porod ali splav. Ogrožena skupina so tudi mlajši otroci, starostniki, osebe z imunskimi boleznimi, bolniki po transplantaciji organov, z rakom ali HIV. Pri rizičnih skupinah bakterija povzroči pljučnico in meningitis, v hujših primerih pa se pojavi vnetje notranjih organov (Polanc in Raspor, 2002). Po podatkih EFSA (2011) je bilo v članicah EU leta 2009 prijavljenih kar 1.645 primerov listerioze. Od tega je bilo kar 16,6 % smrtnih primerov (EFSA, 2011).

Vir okužbe je lahko pomanjkljivo toplotno obdelana in hlajena ali zmrznjena hrana pripravljena za takojšnje uživanje (angl. Ready-to-eat food), živila, ki jih hranimo v zmrzovalniku daljši čas (ribe in ribji izdelki, mesni izdelki), mehki siri ali vakuumsko pakirani produkti. Okužba je lahko posledica navzkrižne kontaminacije v pridelavi, predelavi mesa, posebno perutnine, mleka, surove zelenjave. Pomembno je rokovanje s perutnino in preprečitev stika kuhanih in surovih živil ter osebna higiena delavca (ICMSF, 1996; Slutsker in Schuchat, 1999).

<i>Listeria monocytogenes</i> KLASIFIKACIJA (Garrity in sod., 2005) Kraljestvo: Bacteria Deblo: Firmicutes Razred: Bacilli Red: Bacillales Družina: Listeriaceae Rod: <i>Listeria</i> Vrsta: <i>Listeria monocytogenes</i>		
PARAMETRI RASTI IN PREŽIVETJA	MEJNE VREDNOSTI	REFERENCE
Min a_w (za rast)	NaCl 0,92-0,93 saharoza 0,92 glicerol 0,90	Miller, 1992, Nolan in sod. 1992 Nolan in sod., 1992 Nolan in sod., 1992
Max koncentracija NaCl	25,5 % (a _w =0,83)	Shahamat in sod., 1980
pH (za rast)	min 4,1 opt 7,0 max 9,4	ICMSF, 1996
Temperatura rasti	min -1,5 °C opt 30-37 °C max 45-50 °C	Hudson in sod. 1994 Petran in Zottola, 1989
Toplotna odpornost celic (D-vrednost) v vodni fazi	60 °C/30 min 65 °C/10 min 70 °C/2 min 75 °C/30 s 80 °C/5 s	Seeliger in Jones, 1986

2.2.2.3 *Salmonella* spp.

Salmonele so gram-negativne, fakultativno anaerobne, paličaste bakterije iz družine enterobakterij. So nesporogene in gibljive bakterij razen izjem, kot sta *S. gallinarum* in *S. pullorum*). Večina jih proizvaja vodikov sulfid. Bakterije rodu *Salmonella* so značilne za prebavni trakt domačih in divjih živali. Preko fecesa se izločajo v okolje, kjer lahko ob ugodnih pogojih preživijo nekaj let (suho blato) (Polanc in Raspor, 2002).

Salmonele so ene najpogostejših povzročiteljev gastrointestinalnih okužb v svetu in tudi pri nas (IVZ, 2008a). Po EFSA poročilu za leto 2009 je bilo v EU 108.614 prijavljenih primerov te infekcije (EFSA, 2011). Salmoneloze spadajo med alimentarne infekcije in smrtnost je manj kot 1 % v ZDA (Mead in sod., 1999). Za bolezen sta največkrat kriva serotipa *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*. Infektivna doza za zdrave odrasle je 10⁵-10⁶ CFU/g, za rizične skupine zadošča že 10 CFU/g. Izjema sta *S. Typhi* in *S. Paratyphi*, pri

katerih lahko infekcijo povzroči že nekaj 10 bakterij. Inkubacijska doba je 36 h in traja 1-4 dni. Simptomi so močna, krvava diareja, slabost, bolečine v abdomnu in glavobol. Iz črevesja lahko vdrejo v kri in povzročajo resna obolenja z vnetji, meningitisom in pljučnico (Polanc in Raspor, 2002).

Preglednica 3: Karakteristike rodu *Salmonella*

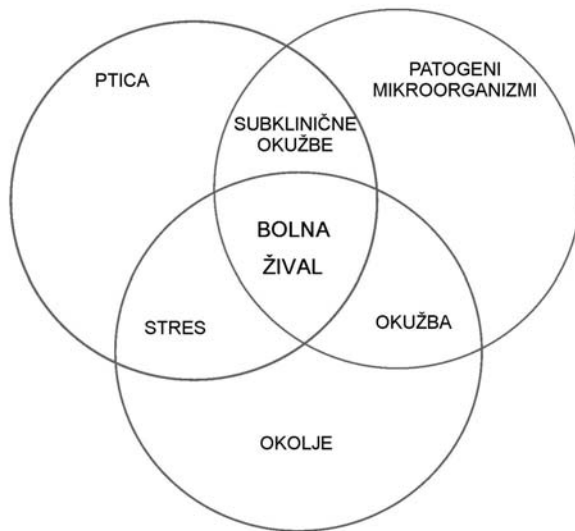
<i>Salmonella</i> spp.			
KLASIFIKACIJA (Garrity in sod., 2005)			
Kraljestvo:	Bacteria		
Deblo:	Proteobacteria		
Razred:	Gammaproteobacteria		
Red:	Enterobacteriales		
Družina:	Enterobacteriaceae		
Rod:	<i>Salmonella</i>		
PARAMETRI RASTI in PREŽIVETJA	MEJNE VREDNOSTI		REFERENCE
Min a_w (za rast)	NaCl	0,95	D'Aoust, 1989; Adamič in sod., 2003
	glicerol	0,94	
	živilo	0,92	
Max koncentracija NaCl	< 8,5 %		Blackburn in sod., 1997; Cliver, 1990
pH za rast)	min	4,05	D'Aoust, 1989
	opt	6,6-8,2	
	max	< 9,0	
Temperatura rasti	min	5,3 °C	D'Aoust, 1989
	opt	35-37 °C	
	max	45,6 °C	
Toplotna odpornost celic (D-vrednost) v vodni fazi	posneto mleko	71,7 °C/1.2 s	Cliver, 1990; Blackburn in sod., 1997
	mleko	62,8 °C /7 s	
	jajca (pH-5,5)	60 °C/9.5 min	

Možni viri kontaminacije so pomankljiva higiena pri zakolu, slaba higiena v mlekarstvu, prireji jajc, okužbe preko vode, navzkrižna kontaminacija surove in pripravljene hrane ali prenos preko okuženih delavcev. Hrana, ki jo povezujemo z okužbami je svinjsko, goveje, perutninsko meso, fermentirane klobase, surovo mleko in mlečni produkti, prelivi za solate, jajca ter sladice.

2.2.3 Tveganja za okužbo med pridelavo in predelavo perutnine

V industrijskem obratu se odvijajo številni procesi, ki lahko vplivajo na mikrobiološko kakovost perutninskega mesa. Patogeni mikroorganizmi vstopajo v proces in vplivajo na

končni izdelek po različnih poteh. Do prenosa lahko pride med intenzivno rejo, ko se zadržuje velika količina živali na majhnem prostoru ali pa se perutnina okuži kasneje med transportom. Kontaminacija lahko pride iz okolja (zrak, voda iz vodnih tankov, zemlja, feces), preko tehnološkega postopka, preko delovnih površin ali delavcev (slika 4).



Slika 4: Vplivi okolja in higiene na zdrave živali (Nahberger Marčič in Vidovič, 2002)

Nekateri mikroorganizmi ne najdejo pogojev za razmnoževanje, nekatere uničijo pogoji tehnološkega postopka, ostali pa se po krajšem ali daljšem času prilagajanja začnejo razmnoževati (Maukonen, 2003). Perutninsko meso in njegova mikrobiološka sestava ima določeno specifičnost v primerjavi z mesom ostalih klavnih živali. Kritične točke se pojavljajo že pri reji, tekom transporta živih piščancev, med zakolom, skubljenjem, odstranjevanjem prebavil, kosti, prav tako med filetiranjem in rezanjem. Masovnost klanja in tehnološki pogoji dela v posameznih fazah proizvodnje so idealni za navzkrižno kontaminacijo mesa (Borck in Pedersen, 2005). Površina piščancev je relativno majhna, kar pomeni večji stik mesa s površinami v procesu. En sam okužen piščanec ali napaka med procesom klanja lahko okuži celotno jato (Gašperlin in Bem, 2003). Cilj nadzora nad mikroorganizmi na procesni liniji je znižati ali omejiti število mikrobov, njihovo aktivnost ter odstranitev morebitnih hranil na procesni opremi. Najbolj učinkovit način je še vedno dosledno izvajanje higienskih postopkov (DHP), racionalen zagon proizvodnih linij in uspešna raba čim manj okolja ogrožajočih čistilnih sredstev ter razkužil (Maukonen, 2003).

2.2.3.1 Potek proizvodnega procesa predelave perutninskega mesa

Na kakovost in zdravstveno varnost končnega izdelka vplivajo številni premortalni dejavniki (starost, pasma, prehrana, zdravstveno stanje). Nanje imajo vpliv predvsem rejci, perutninski obrat pa le delno z izbiro dobavitelja piščancev in ravnanjem z živalmi pred zakolom. Ves nadaljni proces pa je v rokah industrije. Mikrobiota posameznih oddelkov klavnice predstavlja precej zaokrožene biosisteme. Sestava mikrobiote (vrsta in število

mikroorganizmov) klavnice in njenih oddelkov je podvržena različnim sezonskim, pa tudi raznim drugim vplivom. Na splošno velja, da se v vsaki delovni enoti, povezani z delovnim procesom, zadržuje bolj ali manj stalna mikrobiota, ki se dnevno osvežuje in obnavlja (Savić, 2003). V spodnji preglednici je navedena možnost navzkrižne kontaminacije in kritične točke (preglednica 4). Še posebno velik vpliv na kakovost mesa ima mikrobiota klavnic. V njej najdemo mikroorganizme perja in kože (mikrobiota okolja iz katerega živali prihajajo), mikroorganizme prenešene tekom transporta, mikrobioto iz živalskih telesnih odprtih (usta, prebavni trakt, zadnjična odprtina). Pomembna naloga pri klanju je preprečitev prenosa obstoječih mikroorganizmov na meso in organe med zakolom in po njem (Savić, 2003).

TRANSPORT

Sprejem piščancev je pomemben del, saj pri sprejemu in transportu piščancev lahko pride do navzkrižne kontaminacije perja in kože s fekalnimi mikroorganizmi okuženih piščancev (Pečoler, 1996). Mikrobiota transportnih kletk vsebuje tako organizme iz površine tal in okolja (večinoma proteolitične in mlečnokislinske bakterije, kot mezofilne bakterije fekalij, ki so velikokrat patogene) (Savić, 2003). Northcutt in Berrang (2006) sta v raziskavi ugotovila, da je prenos bakterije *Campylobacter* spp. iz okužene transportne kletke na žive zdrave živali izrazito hiter. Če se kletke po uporabi očisti z vodo in posuši (48h), to znatno zniža število mikroorganizmov vrste *Campylobacter*.

KLAVNICA

V mikrobioti klavnic najdemo mikroorganizme perja in kože (mikrobiota okolja iz katerega živali prihajajo), mikroorganizme prenešene tekom transporta, mikrobioto iz živalskih telesnih odprtih (usta, prebavni trakt, zadnjična odprtina). Pomembna naloga pri klanju je preprečitev prenosa obstoječih mikroorganizmov na meso in organe med zakolom in po njem (Savić, 2003).

- MAMILEC

Piščance iz transportnih kletk pritrdijo na transportno liro ter potujejo skozi vodno kad z električnim mamilcem. Prenos mikroorganizmov poteka preko vode v kadi ali zaradi prekratke razdalje med posameznimi trupi (Pečoler, 1996).

- KLAVEC in IZKRVAVITEV

Vir kontaminacije pri klavcu je rezilo, medtem ko pri postopku izkrvavitve ni opaziti povišane kontaminacije (Pečoler, 1996).

- PARJENJE TRUPOV PRED SKUBLJENJEM

Pred skubljenjem trupi potujejo skozi parno kopel, ki je lahko vir nezaželenih mikroorganizmov. Rešitev je parjenje perutnine v visečem položaju ali občasna pasterizacija vode za parjenje tekom procesa (Milohnoja, 2003). S parjenjem pri visokih temperaturah (50-60 °C) učinkovito znižamo število mikroorganizmov na površini mesa. Parjenje pri nižjih temperaturah ne uniči oziroma zaustavi fekalnih bakterij (Mead in sod., 2007). Naprimer bakterija *Campylobacter* spp. pri parjenju na 50 °C preživi več minut, temperatura 60 °C pa jo popolnoma

inaktivira. Višja temperatura uniči več bakterij, hkrati pa poškoduje povrhnjico. Poškodovana koža postane idealen medij za pričvrščanje mikroorganizmov in prodiranje v globino tkiva. Tako meso ni primerno za prodajo kot sveže hlajeno meso ali zmrznjeno meso, ampak je namenjeno za pasterizirane in sterilizirane produkte (Milohnoja, 2003).

- SKUBILEC

Večji problem od parjenja predstavlja skubljenje. Mikrobiota iz perja se delno odstrani, delno pa se med postopkom skubljenja prenese na kožo. Mikroorganizmi ostanejo na površini ali pa prodrejo v notranjost, če je koža poškodovana. V USDA raziskavi (Northcutt in Berrang, 2006) so ugotovili, da se tekom procesiranja brojlerjev sicer možnost za okužbo niža, vendar pa je najpogostejša navzkrižna kontaminacija pri postopku odstranjevanja perja. Gumijaste prste stroja za skubljenje naj bi tekom proizvodnje in po njej temeljito očistili. Naprava za odstranjevanje perja namreč povzroča iztekanje fekalnih snovi iz spodnjega dela črevesa, kar kontaminira trupe.

- EVISCERACIJA PREBAVIL

Na kvantiteto mikrobne združbe na proizvodnji liniji vpliva način ravnanja s trupom in odstranjevanje prebavil, ki največkrat poteka delno strojno in delno ročno. Odstranjevanje glave in evisceracija prebavil je zelo pomemben del, ker se v prebavni cevi nahajajo številni fekalni mikroorganizmi. Nestrokovno odpiranje trebušne votline in odstranjevanje črevesja ter trebušnih organov lahko povzroči okužbo celotnega asortimana produktov. Jetra in druge organe naj ne bi dajali ponovno v trebušno votlino, razen če so zapakirani. Po evisceraciji je potrebno površino trupov in trebušno votlino oprati ter nato čim hitreje ohladiti trupe na temperaturo blizu 0 °C (Milohnoja, 2003).

PAKIRNICA

V pakirnici se piščančje trupe sortira glede na velikost, nato pa razsekuje in odkoščuje. Praviloma vsebujejo prostori pakirnice zelo nizko koncentracijo mikroorganizmov in manjši je prenos te mikroflore iz izdelka na izdelek. Bolj pogosta pa je navzkrižna kontaminacija izdelka preko osebja, površin ali orodja in nižja iz izdelka na izdelek (Savić, 2003). Pakiranje ščiti meso pred nadaljno kontaminacijo, izgubo vlage, nihanjem temperature in upočasni razvoj obstoječih mikroorganizmov. Temperatura pakirnice mesa se večinoma giblje okrog 10 °C, z nizko relativno vlažnostjo (Pečoler, 1996). Vir širjenja kontaminacije so lahko nezadostno očiščene površine, oprema za razsek ali odkoščevanje ter nihanje temperature nad 10 °C. Mehansko odkoščeno piščančje meso je še posebej problematično, ker je težko vzdrževati temperaturo surovine od -1 do 2 °C. V mletem mesu so posebno ugodni pogoji za rast in razmnoževanje bakterij (Pečoler, 1996).

HLADILNICA in ZMRZOVALNICA

Navkljub strogim higienskim ukrepom med klanjem gre v hladilnico meso, ki vsebuje mikrofloro klavnice. Danes se meso večinoma ohlaja v toku hladnega zraka ali v ledeni vodi (Berrang in Nortcutt, 2006). Kljub temu tudi kroženje zraka predstavlja vektor za

razširjanje mikroorganizmov po mesu in hladilnici. Potreben je nadzor nad temperaturo (-3 do 4 °C) in relativno vlažnostjo zraka (predhlajenje 70-75 %, hlajenje za daljši čas 90 % relativna vlažnost) (Vomberger in Arzenšek Pinter, 2008). Temperatura hladilnic poskrbi za temperaturni šok večine mezofilnih mikroorganizmov, kar pomeni zaustavitev mikrokokov in koliformnih mikroorganizmov. Huezo s sod. (2007) je raziskoval učinek fekalno kontaminiranih trupov brojlerjev pred in po hlajenju. Ugotovili so, da hlajenje močno vpliva na sestavo mikrobne družbe. Število koliformnih bakterij, vrst *E. coli*, rodov *Campylobacter* in *Salmonella* se je znižalo za 90 %. Psihrotrofi pa se hitro prilagodijo na znižano temperaturo in s hrano bogate, vlažne površine trupov, se razmnožijo ter lahko povzročijo sluzavost mesa. Pri sodobnem hitrem hlajenju na mesu prevladujejo psihrotrofi, pri počasnih metodah hlajenja pa prevladujejo predstavniki enterobakterij (Savić, 2003).

2.2.3.2 Analiza tveganja kritične kontrolne točke v proizvodnem procesu

Spodnji shemi analize tveganj sta povzeti in prirejeni po tabelah analize tveganja na procesnih linijah obeh preiskovanih proizvodnih obratov. Obravnavana mesta v proizvodnji predstavljajo večje potencialno tveganje za bodisi biološko (**B**), kemijsko (**K**) ali fizikalno kontaminacijo (**F**) in so specifična za vsako proizvodno linijo. Vsak tehnološki vodja najboljše pozna biološko tveganje svoje proizvodne linije in že z reorganizacijo procesa lahko zmanjša obseg mikrobiološke kontaminacije. Sodobni proizvodni obrati so organizirani tako, da se zmanjša tveganje za okužbo na minimum. Uporablja se zaprte avtomatizirane sisteme proizvodnje kjer je mogoče, čiščenje je enostavno, največkrat avtomatsko, materiali za površine so gladki in čim manj porozni ter čim bolj odporni na čistila. Proizvodne površine in pripomočki so prilagojeni tako, da vsebujejo čim manj mrtvih kotov, kjer bi se lahko nabirale snovi in potencialno tvorili mikrobni biofilmi. Pomemben je tudi stalen nadzor nad kvaliteto pitne vode, ki se uporablja v proizvodnji (Wirtanen, 1995).

Najbolj pomemben kontrolni procesni parameter pri vzdrževanju higienskih razmer v perutninskih obratih je vsekakor temperatura. Meritve temperature na ocenjenih kritičnih kontrolnih točkah nam omogočajo enostaven nadzor nad razmnoževanjem mikroorganizmov. Večini kvarljivcev ali patogenih mikroorganizmov zaustavimo rast, jih uničimo pri hitrem zmrzovanju ali s toplotno obdelavo nad 60 °C. Nezadostna kontrola temperature je najpogostejši vzrok za povzročitev mikrobni okužb s hrano ali kvara izdelkov od proizvodne linije do zaužitja (Codex Alimentarius Commission, 2003).

PREPOZNANO TVEGANJE na PROCESNI LINIJI		KT in KKT
SPREJEM ŽIVALI	B: prihod bolnih živali v klavnico K: ostanki zdravil ali ostanki pesticidov (krma) v živalih	1. KT
OBEŠANJE	F: mehanske poškodbe živali, lomljenje kosti, ostanki delcev kosti v mišicah	
OMAMLJANJE	F: mehanske poškodbe živali, lomljenje kosti, ostanki delcev kosti v mišicah zaradi neučinkovitega omamljanja	
ZAKOL	B: kontaminacija s patogenimi MO preko noža za zakol iz kože trupov. F: zastajanje odkrušenih delcev noža za zakol v trupu	
IZKRVAVITEV	B: zastajanje krvi v tkivih živali, kontaminacija mesa pri razkosanju	
PARJENJE	F: poškodbe vrhnjih slojev kože in mišičnine zaradi previsoke T parjenja ali neučinkovito parjenje zaradi prenizke T parjenja, ostanek perja na trupih v naslednjih fazah	2. KT
SKUBLJENJE	F: poškodbe vrhnjih slojev kože, mišičnine, ostanek perja na trupih zaradi nepravilne nastavitve skubilnika ali poškodovanih/obrabljenih prstov skubilnika	
ODSTRANITEV GLAV, TRAHEJ	F: možnost poškodbe vratnega dela in prsi zaradi nepravilne nastavitve stroja	
STROJNO ODPI-RANJE TRUPA	F: mehanske poškodbe trupa zaradi nepravilnega odprtja B: kontaminacija trupa z MO iz črevesja zaradi nepravilnih nastavitvev stroja	
STROJNA EVISCERACIJA	B: kontaminacija trupa z MO (razlitje črevesne vsebine), možnost ostankov organov, črevesja zaradi nepravilnih nastavitvev stroja	
LOČEVANJE DROBOVINE OD TRUPA	B: kontaminacija trupa z MO (razlitje črevesja) zaradi nepravilnih nastavitvev stroja, ostanki organov, črevesja v trupu-kontaminacija pri nadaljni obdelavi B: pri ločevanju src, jeter, vratov, želodcev od črevesja obstaja možnost razlitja žolča po srcu in jetrih, kontaminacija z MO preko vode ali zaposlenih	
HLAJENJE DROBOVINE	B: kontaminacija src, jeter, vratov, želodcev zaradi okužene posode ali neustrezne T hlajenja	1. KKT
PREOBEŠANJE in HLAJENJE TRUPOV	F: prelomov členkov kosti beder, ostanki delcev kosti v mišicah B: padanje trupov na tla med preobešanjem- kontaminacija z MO B: rast in razmnoževanje MO zaradi neustrezne T hlajenja	2. KKT

Slika 5: Analiza tveganja in kritične točke v klavnici perutninskega mesa (interno gradivo podjetja F2)

PREPOZNANO TVEGANJE na PROCESNI LINIJI		KT in KKT
PAKIRANJE CELIH TRUPOV	B: možnost okužbe z nezaželenimi mikroorganizmi iz embalaže K: možnost migracije snovi iz pakirnega materiala v živilo	
NOTRANJI TRANSPORT in	F: mehanske poškodbe živali, lomljenje kosti, ostanki delcev kosti v mišicah B: možnost okužbe z nezaželenimi MO preko površin in delavcev	
SKLADIŠČENJE OHLAJENIH TRUPOV	B: preživetje, rast in razmnoževanje nezaželenih MO zaradi neustrezne T ali predolgega časa skladiščenja	3. KT
ZAMRZOVANJE CELIH TRUPOV	B: preživetje, rast in razmnoževanje nezaželenih MO zaradi neustrezne T in prepočasnega zamrzovanja	3. KKT
SKLADIŠČENJE ZMRZNJENIH TRUPOV	B: preživetje, rast in razmnoževanje nezaželenih MO zaradi nestalne T, odmrzovanje ali prepočasnega zamrzovanja	4. KT
RAZSEK NA DELE	F: drobljenje kosti in ostanek drobcev kosti v kosih zaradi nepravilnih nastavitv stroja B: kontaminacija kosov z nezaželenimi MO zaradi neustrezne čistoče opreme ali preko zaposlenih	
IZKOŠČEVANJE MESA (prsa, stegno)	F: možnost drobljenja kosti in zaostajanja drobcev kosti v kosih zaradi nepravilno nastavljenega stroja B: kontaminacija kosov z nezaželenimi MO zaradi neustrezne čistoče opreme ali preko zaposlenih	
PROIZVODNJA SIM- strojno izkoščeno meso	F: možnost drobljenja kosti in zaostajanja drobcev kosti v kosih zaradi nepravilno nastavljenega stroja B: kontaminacija kosov z nezaželenimi MO zaradi neustrezne čistoče opreme ali preko zaposlenih	5. KT
PAKIRANJE SIM,	B: možnost okužbe z nezaželenimi mikroorganizmi iz embalaže K: možnost migracije snovi iz pakirnega materiala v živilo	
ZAMRZOVANJE SIM, prsa	B: preživetje, rast in razmnoževanje nezaželenih MO zaradi neustrezne T in prepočasnega zamrzovanja	4. KKT
SKLADIŠČENJE SIM, prsa	B: preživetje, rast in razmnoževanje nezaželenih MO zaradi neustrezne T in prepočasnega zamrzovanja	6. KT

Slika 6: Analiza tveganja in kritične točke v pakirnici perutninskega mesa (interno gradivo podjetja F2)

2.2.4 Tvorba biofilmov in njihovo odstranjevanje s procesnih površin

Živila se med seboj razlikujejo po svojih fizikalnih, kemijskih, mikro- in makrostrukturnih ter mikrobioloških lastnostih. Dejavniki okolja, torej lastnosti živil in razmere v proizvodnji ter prometu z živili, določajo sestavo mikrobne združbe, obseg ter dinamiko rasti in odmiranja (Adamič in sod., 2003). Prilagojenost na spreminjajoče se okolje in zmožnost rasti tudi v neugodnih pogojih je prvi začel raziskovati Zobell leta 1943. Spremljal je mikrobiološke aktivnosti na površinah pri neugodnih pogojih za rast. Strukturo, ki je sestavljena iz mikrobne združbe in njihovih izvenceličnih produktov, polisaharidov in glikoproteinov pa so poimenovali biofilm. Po Charaklisu (1981) se biofilm tvori v petih fazah: prisotnost in transport mikrobnih celic na vlažni površini, adsorpcija celic na površino z makromolekulami, pritrditev celic na površino, reakcije znotraj biofilma (transport hranil, metabolizem, tvorba izvenceličnih polimerov) in popuščanje vezi med mikroorganizmi in površino ter posledično luščenje zrelega biofilma. Strukture biofilma delimo na reverzibilne in ireverzibilne (Marshall in sod., 1971). Reverzibilni biofilmi so lahko začetna faza, ko se mikroorganizmi zbirajo na površini, vendar se še ne pritrdjujejo na površino. Na naslednji stopnji celice ob stiku s površino začnejo tvoriti izvencelične polisaharide, ki nato prispevajo k ireverzibilni pritrditvi celic na površino (Wirtanen, 1995).

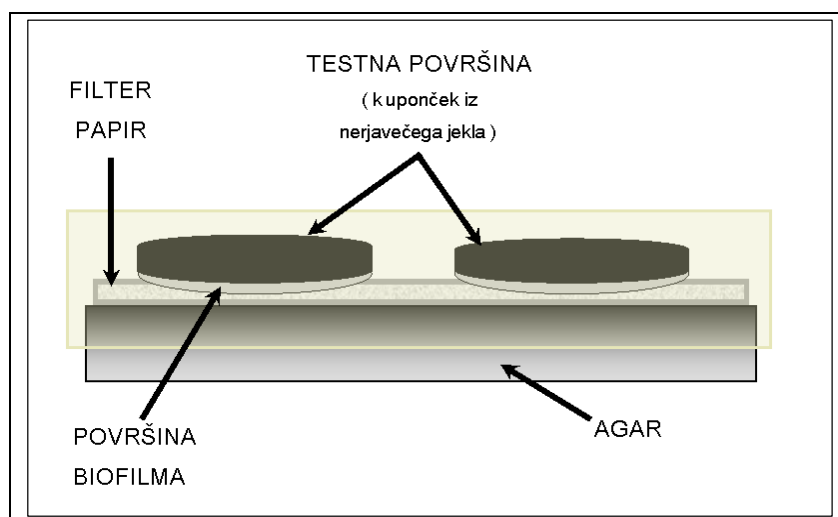
2.2.4.1 Biofilmi v industrijskem procesu

Za nastanek biofilma potencialno potrebujemo samo vodo in organski material na porozni ali hrapavi površini. Nastanek biofilma daje zaščito mikroorganizmom pred neugodnimi pogoji in zagotavljanje hranil, ki se lovijo v biofilm. Strukture biofilma povzročajo probleme v industrijskih tankih z vodo, na neravnih in hrapavih površinah v ceveh, na napravah ter pripomočkih v živilski predelovalni industriji (Salo in Wirtanen, 2005). Negativne posledice poleg problemov pri čiščenju in higieni so še izguba energije, blokade v kondenzatorskih ceveh, pri kroženju odpadnih vod, v izmenjevalcih toplote, zmanjšanje učinkovitosti membranskih procesov, ionske izmenjave itd. Biofilmi povzročajo tudi mikrobiološke korozivne spremembe na procesnih površinah in opremi. Zato je pomembno, da je procesna oprema narejena iz čim manj korozivnih materialov, površine morajo biti gladke, brez mrtvih kotov, razpok ali hitrih prelomov. Oprema mora biti dobro vzdrževana in primerno očiščena. Najbolj uporaben material je nerjaveče jeklo, ki je dokaj odporno proti mehanskim udarcem, mletju, poliranju itd. (Wirtanen, 1995).

2.2.4.2 Testiranje protimikrobne učinkovitosti po metodi Charaf

Postopki za registracijo razkužil temeljijo na testiranju protimikrobne učinkovitosti v tekočini in z laboratorijskimi kulturami. Tako imenovani suspenzijski testi so učinkoviti le za preverjanje splošne učinkovitosti razkužil in za določitev vpliva parametrov okolja na učinkovitost. Parametri okolja, kot so neustrezna temperatura, prekratek ali predolg kontaktni čas in moteči materiali, kot so organski ostanki, lahko zmanjšajo učinkovitost

sanitacijskih sredstev. Neupoštevajoč mikrobne združbe v biofilmih tudi testni sevi mikroorganizmov iz laboratorijskih zbirk niso primerljivi z organizmi, ki rastejo v okolju. Da bi vsaj približali stanje v realnosti, je Charaf s sod. (1999) razvila in patentirala metodo, ki temelji na gojenju biofilmov na jeklenih nosilcih (slika 10). Metoda vključuje razbijanje biofilma pritrjenega na površino nosilca s steklenimi kroglicami, izpostavitve razkužilu za 5 min in detekcijo za rast sposobnih mikroorganizmov s štetjem kolonij na ploščah. Rezultate se poda v enotah ME. Enota ME ali mikrobicidni efekt čistila je razlika med logaritmsko vrednostjo (CFU/ml) brez uporabe čistilnega sredstva (fiziološka raztopina) in logaritmom števila kolonij (CFU/ml) po kontaktu s čistilnim sredstvom ali razkužilom (Charaf in sod., 1999). Redukcija 5 enot ME je dovolj, da lahko rečemo za čistilno sredstvo, da je uspešno v boju proti celicam, pritrjenim v biofilmu (Moesteller in Bishop, 1993).



Slika 7: Prečni prerez pripravljenega gojišča za gojenje biofilmov na jeklenih nosilcih (Charaf in sod., 1999)

2.3 SANITACIJSKI POSTOPKI V PERUTNINARSTVU

2.3.1 Splošno o sanitacijskih postopkih v živilskih obratih

Čiščenje in dezinfekcija sta pomemben del higiene v živilski industriji, kajti samo z upoštevanjem dobre higienske prakse (DHP) lahko potrošniku zagotovimo zdravstveno neoporečno in kakovostno živilo. Zaradi kompleksnosti in pomembnosti čiščenja se pogosto uporablja pojem higienski menedžment, ki zajema celotno organizacijo vzdrževanja higiene v nekem obratu (Kegl, 2003).

Čiščenje je odstranjevanje nezaželenih snovi iz površin, opreme in pribora (DIN 10516). S čiščenjem odstranjujemo ostanke surovin iz opreme, orodja, sten, tal in drugih površin v proizvodnih prostorih. Na uspešno odstranjevanje nečistoče pomembno vpliva vrsta in lastnosti nečistoče, njena razporeditev po površinah, ter čas, ki je potekel od onesnaženja. Vpliv na učinkovitost imajo tudi lastnosti materiala in lastnosti čistilnega sredstva, temperatura, koncentracija ter čas delovanje čistilnega sredstva in trdota vode. V živilskih obratih se zadržuje bolj ali manj stalna mikrobiota, ki se dnevno obnavlja. Poznavanje

razlik v sestavi mikrobiote v posameznih oddelkih predelave mesa omogoča pravilno izbiro sredstev za čiščenje ter pogostosti razkuževanja. Na tak način so higienski ukrepi racionalnejši in učinkovitejši (Savić, 2003).

Večja stopnja higiene pomeni predvsem več kvalitetnega in bolj učinkovitega čiščenja, ki zahteva kombinacijo naslednjih elementov (Ponikvar, 2006):

- določitev specifičnosti vrste nečistoče, ki nastaja vzdolž proizvodnje linije;
- izbira ustreznih čistil glede na nečistočo;
- izbira učinkovitejših postopkov čiščenja;
- izbira ustrezne opreme za čiščenje;
- izbira načina dezinfekcije;
- program čiščenja je skladen z zahtevami načel HACCP;
- izobražena delovna sila na področju higiene.

2.3.1.1 Vrste nečistoč v živilski industriji

Nečistoča je material na nepravem mestu. Za učinkovito čiščenje je potrebno poznati vrste nečistoč, ki se pojavljajo, ter njihove kemične-fizikalne lastnosti, kot so površinska napetost, polarnost, njihova velikost, oblika, gostota in kemične reakcije s podlago (Marriot, 1995; Milohnoja in Tomašič, 1996). Drugi kriterij je vrsta materiala, ki ga želimo očistiti (Kegl, 2002). Šele nato izberemo najučinkovitejše metode čiščenja. Največkrat mora biti dvofazna, še posebno tam, kjer so nečistoče kombinacija organskih in anorganskih (Milohnoja in Tomašič, 1996).

Preglednica 4: Vrste nečistoč v živilstvu (Marriott, 1995)

VRSTA	TOPNOST	TEŽAVNOST ODSTRANITVE	SPREMEMBE PRI VIŠJIH TEMPERATURAH
ENOVALENTNE SOLI	Topne v vodi in kislinah	Enostavna do težka	Kemične reakcije z drugimi nečistočami, kar poveča težavnost odstranitve.
SLADKORJI	Topne v vodi	Enostavna	Karamelizacija in povečanje težavnosti odstranitve.
MAŠČOBE	Netopne v vodi, topne v alkalnih raztopinah	Težka	Polimerizacija in povečanje težavnosti odstranitve.
BELJAKOVINE	Netopne v vodi, delno topne v kislih in topne v alkalnih raztopinah.	Zelo težka	Denaturacija in povečanje težavnosti odstranitve.

Nečistoče, topne v vodi, kot so različne anorganske soli, sladkorji, škrob, ne predstavljajo velikih tehničnih problemov. Nečistoče, topne pri pH, nižjem od 7,0 so anorganske soli na primer kalcijev oksalat, kovinski oksidi (rja), vodni in mlečni kamen. Nečistoče, topne v alkalnem mediju, so večinoma organskega izvora. Tak primer so na primer sveži in nezasušeni ostanki beljakovin in maščob. Pri koaguliranih in zasušenih beljakovinskih

oblogah ter ostankih živalskih maščob, pa lahko pride do težav pri odstranjevanju. Potrebna je mehanska sila (drgnjenje, povišan tlak) in uporaba učinkovitejših površinsko aktivnih čistil ter namakanje v vodni raztopini čistila (Savić, 2003).

2.3.1.2 Izbira ustreznih čistil glede na nečistočo

Za kakovost in učinkovitost čiščenja je potrebno izbrati ustrezno čistilno sredstvo. Upoštevati je potrebno temperaturo čistilnega sredstva ob nanosu, predpisano koncentracijo, kontaktni čas in mehansko silo, predpisano na deklaraciji (Kegl, 2003). Čistilna sredstva je potrebno hraniti ločeno od živil, jih uporabljati v predpisan namen in ne mešati med seboj. Čistila hranimo v originalni embalaži in le če je nujno prelijemo v drugo embalažo, ki jo ustrezno označimo z originalnim imenom. Po uporabi zapremo in upoštevamo navodila za varno uporabo (etiketa, označba, navodilo, varnostni list) (Kegl, 2003).

2.3.1.3 Izbira učinkovitih postopkov čiščenja

Ločimo dve vrsti čiščenja: suho in mokro čiščenje. Suho čiščenje je uporaba mehanskih postopkov, ne da bi pri tem uporabili vodo. Največkrat se uporablja kot predčiščenje ali v primeru zelo higroskopskih živil, ki bi bila ob stiku z vodo uničena. Suho čiščenje se uporablja tudi v primeru, ko bi ob stiku z vodo nastale za čiščenje težko odstranljive obloge. V praksi pa v živilski industriji najpogosteje uporabljamo mokro čiščenje. Izbiramo lahko med različnimi vrstami čistilnih sistemov. Najpreprostejše je ročno čiščenje z uporabo pene in gelov, v živilski industriji se uporabljajo tudi čistilni sistemi s pomočjo vodne pare (visokotlačne čistilne razpršilne naprave, vrteče čistilne razpršilne šobe itd.). V novejših proizvodnjah se uporablja avtomatske čistilne sisteme ali CIP (cleaning in place), ki so primerni predvsem za cevne sisteme. Po čiščenju je potrebno površine spirati z vodo in jih osušiti. Pravilno čiščenje poteka po točno določenem vrstnem redu od najbolj čistih površin k bolj umazanim predelom. Čistimo od zgoraj navzdol (Kegl, 2003).

Pravilen postopek čiščenja v živilski industriji je naslednji (Ponikvar in Jeršek, 2002):

- grobo predčiščenje (mehanično odstranjevanje umazanije s strganjem, ribanjem pometanjem večjih kosov nečistoče, ostankov embalaže);
- predizpiranje (izpiranje delovnih površin, sten in tal);
- glavno čiščenje s čistilom (nanos pene, strojno ali ročno drgnjenje);
- spiranje površin z vodo (najpogosteje s širokim curkom);
- razkuževanje;
- končno spiranje;
- čiščenje, razkuževanje in vzdrževanje čistilnih pripomočkov.

2.3.1.4 Izbira ustrezne opreme za čiščenje

Pri ročnem čiščenju moramo izbrati primerne čistilne pripomočke kot so mopi, ščetke, metle, gobice, krpe, sesalniki itd. Izberemo takšne pripomočke za čiščenje, ki učinkovito odstranjujejo nečistoče in ne poškodujejo površin. Čistilne pripomočke ločimo za čisti in

nečisti del obrata. Za čiščenje sanitarij uporabljamo ločene čistilne pripomočke in jih shranjujemo ločeno od tistih za čiščenje proizvodnega dela obrata (Kegl, 2003). Po uporabi se pripomočke redno in ustrezno čisti, razkuži in shrani. Krpe in gobice, ki se uporabljajo za posamezna delovna področja se lahko prekuha (95 °C) ter osuši. Veliko bolje pa je, da uporabljamo tiste za enkratno uporabo. Vlažno in hranljivo okolje je idealno za hiter razvoj mikroorganizmov. Preko umazanih pripomočkov lahko nezaželene mikroorganizme prenesemo nazaj na delovne površine, opremo, druge delovne pripomočke in posredno na živila. Pripomočki za čiščenje in čistilna sredstva, naj se shranjujejo v posebnem dobro zračenem prostoru ali v omari, kjer se po uporabi obesijo in čim hitreje posušijo (IVZ, 2007).

2.3.1.5 Izbira načina razkuževanja

Razkuževanje ali dezinfekcija je postopek, pri katerem s pomočjo fizikalnih ali kemičnih sredstev zaviramo rast in uničujemo škodljive mikroorganizme razen bakterijskih spor. Namen dezinfekcije je zmanjšati število mikroorganizmov na delovnih površinah, opremi in priboru, ki jih z običajnimi čistilnimi postopki nismo uspeli odstraniti (Milohnoja in Tomašič, 1996). Razkuževanje ni nadomestilo za temeljito čiščenje in ga izvajamo na čistih, suhih površinah, saj se učinkovitost mnogih kemičnih razkužil močno zmanjša, če površina ni temeljito očiščena (Riemann in sod., 2006). Primere, v katerih je potrebno razkuževanje, mora odgovorna oseba natančno opredeliti v okviru načrta čiščenja in razkuževanja. Ravnanje v primeru okužene jate, pri pojavu nalezljivih bolezni med delavci, pri slabem higienskem poročilu, ob posegih na opremi (predelave, obnova), letno generalno čiščenje in razkuževanje itd.

Metode razkuževanja (Milohnoja in Tomašič, 1996):

- s toploto (vroča voda nad 80-90 °C, para, vroč zrak),
- mehansko (visok tlak do 130 atm),
- s kemičnimi sredstvi,
- plini (ozon),
- žarčenjem (UV žarki, ionizirajoča sevanja- α , β , δ , elektromagnetno valovanje).

2.3.1.6 Program čiščenja, skladen z zahtevami HACCP

Za načrtovanje postopka čiščenja in dezinfekcije je potrebno dobro poznati proizvodnjo in vrsto nečistoče, ki nastaja v proizvodnji živil. Čiščenje in razkuževanje ima v predelavi živil velik vpliv na zdravstveno varnost. Še posebej velja to za površine, kjer živilo lahko pride v stik s površino in kasneje ni več toplotno obdelano. Z učinkovitim čiščenjem in razkuževanjem se zmanjša število mikroorganizmov v delovnih prostorih in na opremi za približno 10^5 - 10^8 CFU/ml mikroorganizmov (Preglednica 5). Zato lahko določeno čiščenje izberemo tudi kot KT ali KKT. Oprema, ki je v neposrednem stiku z živili, mora biti izbrana tako, da glede na zahteve dobre higienske prakse dopušča primerno čiščenje in vzdrževanje ter po potrebi razkuževanje. Glede na specifičnost proizvodnje je potrebno izbrati ustrezna čistila in pripadajočo opremo za čiščenje.

Preglednica 5: Zmanjšanje števila bakterij na površini po čiščenju in po čiščenju z razkuževanjem (Reuter, 1998)

ČIŠČENJE ΔN ($\log_{10}$ CFU/ml)		ČIŠČENJE in RAZKUŽEVANJE ΔN ($\log_{10}$ CFU/ml)	
Čiščenje	3-5	Čiščenje	3-5
Spiranje	1-3	Spiranje	1-3
Sušenje	1-4	Razkuževanje	4-7
Skupno najmanj	5	Skupno najmanj	8

Določiti je potrebno pogostost in način izvajanja postopkov ter metod čiščenja ter kontrole učinkovitosti čiščenja (mikrobiološke preiskave opreme in brisev). V skladu z zahtevami sistema HACCP, se izdeli uporaben, predvsem pa učinkovit program čiščenja ali higienski načrt. Program čiščenja je pisni dokument s katerim standardiziramo postopke čiščenja. V praksi dokumentacijo razdelimo v dva dela. Prvi del se ukvarja s postopki čiščenja, drugi del pa se nanaša na monitoring čiščenja (Kegl, 2002).

Higienski menedžment sestavi učinkovit higienski načrt in plan čiščenja, ki vsebuje (Codex Alimentarius, 2003):

- popis vseh prostorov in inventarja, ki se čisti;
- vrste in predpisane delovne koncentracije čistil, ki se uporabljajo na določenih površinah;
- navodila za izvajanje čiščenja (vrsta čistila, čistilni pripomočki, pogostost čiščenja (dnevno, tedensko, mesečno, letno);
- navodila za varno delo, opozorila, navodila za vzdrževanje čistilne opreme
- vsebuje tehnične in varnostne liste za čistila in stroje zajete v higienskem načrtu;
- določi se odgovornost za evidentiranje in kontrolo čiščenja (območje čiščenja ali kontrole, datum/ura čiščenja, potrditev izvajanja v obliki podpisa).

Vendar to ni dovolj. Za izvrševanje pravih higienskih postopkov je potrebno dolgotrajno vlaganje v izobraževanje, izbiro primernih kadrov in organizacijo dela. Higienski načrt čiščenja je namenjen zaposlenim, da dobijo popolno informacijo o načinu čiščenja, vrstah čistil, načinu uporabe čistil itd. Največkrat so v živilskih proizvodnjah za nadzor nad čiščenjem odgovorni vodje proizvodnje, za čiščenje pa posebne delovne skupine ali izmenično delavci proizvodnje. Najbolj smiselno je, da delavce, ki upravljajo z določenim strojem, postavimo za odgovorne tudi za vzdrževanje higiene po zaključku dela. Vse delavce, ki izvajajo čiščenje, pa je potrebno izobraziti o pomembnosti natančnega sledenja in izvrševanja programa čiščenja. Higienski menedžment zbira in vodi vso dokumentacijo o rezultatih ter ustreznosti čiščenja in razkuževanja. Skrbi, da je v vsakem delovnem prostoru na vidnem mestu obešen obrazec o izvedenih dnevni postopkih čiščenja in jih arhivira vsaj 2 leti (IVZ, 2007).

2.3.2 Čistilna sredstva in razkužila

2.3.2.1 Kemijski postopki sanitacije

Kemijski postopki sanitacije temeljijo na interakciji čistilnega sredstva ali razkužila s celično površino ter poškodovanju ali uničenju mikrobne celice. Zgradba celične površine se razlikuje glede na tip celice in glede na prilagojenost na okolje. Interakcija čistilnega sredstva s celično površino je ključnega pomena za odpornost na sanitacijske postopke. Večina protimikrobnih sredstev že v minimalnih koncentracijah uspešno pronica v notranjost celice in jo poškoduje ali uniči.

Glede na kemično sestavo in aktivne substance razkužila delimo na (Seme, 2002):

- fenolne spojine (bifenoli, halofenoli),
- alkoholi,
- aldehydi (formaldehid, glutaraldehid),
- dušikove heterociklične spojine,
- kvarterne amonijeve spojine ali KAS,
- gvanidini (bigvanidini, polimerni bigvanidini),
- peroksigeni (ozon, vodikov peroksid, perocetna kislina),
- halogeni (klorove spojine, jodove spojine),
- derivati težkih kovin (srebrove spojine, baker, živosrebrne spojine).

Preglednica 6: Aplikacije razkužilnih sredstev (Holah, 2003)

UPORABA	PRIPOROČLJIVA RAZKUŽILA
Preventiva in odstranitev bakterijskega filma	kislina, jodoform, klor, perocetna kislina, KAS*
Betonska tla	klor, KAS*
Dizinfekcija rok	jodoform, KAS*, klorheksidin
Plastični deli	jodoform, KAS*, amfoterne spojine
Leseni deli	klor
Porozne površine	klor
Procesna oprema (aluminij)	KAS*, jodoform, amfoterne spojine
Procesna oprema (nerjaveče jeklo)	kislina, KAS*, klor, jodoform, amfoterne spojine
Stene	jodoform, KAS*, amfoterne spojine
Tretiranje vode	klor, ozon, klorov dioksid

KAS* kvarterne amonijeve spojine

Mehanizmi delovanja razkužil so različni. Nekatera razkužila lahko uvrstimo tudi v več skupin hkrati. Snovi, ki porušijo celično membrano, so organska topila in detergenti (fenolne spojine, bigvanidini oz. gvanidini in alkoholi). Fenoli, aldehydi in alkoholi povzročajo denaturacijo celičnih beljakovin. Oksidanti (klorove in jodove spojine, perocetna kislina) in alkilirajoča sredstva (aldehydi), površinsko aktivne spojine (KAS)

spremenijo funkcionalne skupine encimskih katalitičnih mest ali nukleinskih spojin in privedejo do motenj njihove funkcije.

Lastnosti dobrega čistilnega sredstva (Milohnoja in Tomašič, 1996) so:

- učinkuje hitro in na čim širši spekter mikroorganizmov;
- ne škoduje zdravju in je razgradljivo;
- nima vpliva na senzorično kakovost živil;
- ne poškoduje materiala delovnih površin ali orodja;
- deluje v majhnih koncentracijah in ne pušča ostankov na površini;
- organski ostanki minimalno vplivajo na učinkovitost;
- je poceni in enostavno za uporabo.

Razkuževanje ni nadomestilo za temeljito čiščenje in se izvaja na čistih in suhih površinah, saj se učinkovitost mnogih kemičnih razkužil močno zmanjša, če površina ni temeljito očiščena. Na delovanje razkužil delujejo številni dejavniki, kot so: koncentracija, kontaktni čas in temperatura raztopine razkužila. Priporočena koncentracija proizvajalca je optimalna količina sredstva za maksimalen učinek. Učinkovitost in koncentracija premo sorazmerno naraščata samo do določene optimalne točke. Višja koncentracija od priporočene ne doseže boljšega učinka. Kontaktni čas med razkužilom in mikroorganizmom je najbolj pomemben dejavnik biocidne učinkovitosti. Učinkovita razkužila se vežejo na bakterijsko celico, prodrejo skozi celično membrano ter jo uničijo v manj kot 5 minutah. Splošna zahteva za učinkovito razkužilo je, da v kontaktnem času 5 min zniža bakterijsko populacijo za vsaj 5 log enot v suspenziji (EN 1276, 1997).

Za posebno odporne mikroorganizme (spore, plesni) se kontaktni čas podaljša 15-60 min. Povišana temperatura (50-60 °C) v večini primerov deluje pozitivno na delovanje razkužil. Kljub temu je potrebno preveriti priporočeno temperaturo na specifikaciji razkužila. Najbolj občutljivi na temperaturo so jodofori, ki se ne uporabljajo pri temperaturi nad 35 °C, razkužilom na bazi klora pa se zmanjša učinkovitost pri temperaturah, ki presegajo 52 °C (Holah, 2003).

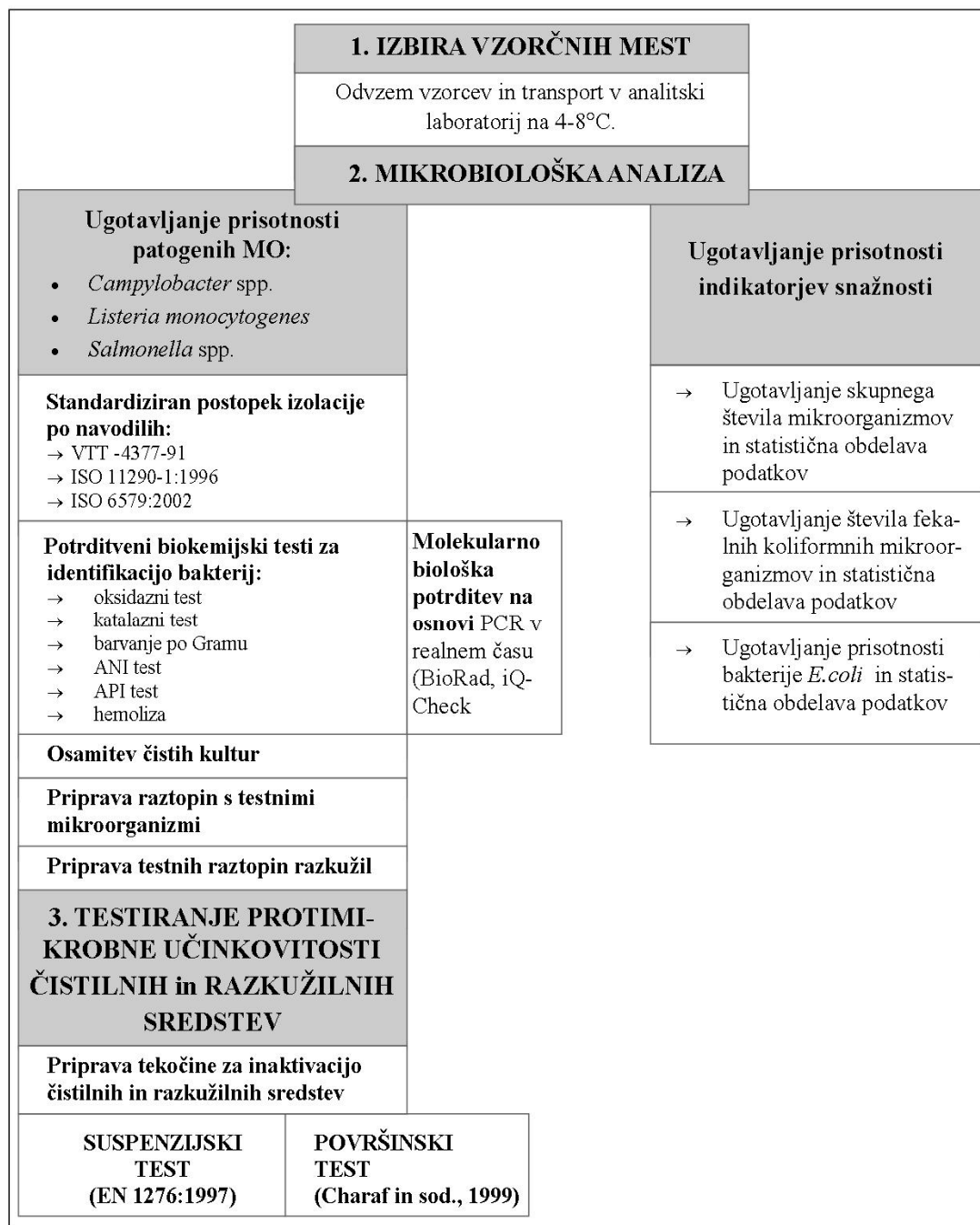
V spodnji preglednici so najpogostejše aktivne sestavine razkužil, ki se uporabljajo v živilski predelovalni industriji, ter njihove prednosti in slabosti (preglednica 7). V industriji se največ uporabljajo razkužila na kisli ali bazični osnovi, halogenski preparati s klorom, okolju prijazni oksidanti (perocetna kislina, kalijev permanganat), površinsko aktivne snovi (KAS) in sredstva na bazi alkohola za dezinfekcijo rok (Holah, 2003).

Preglednica 7: Najpogostejše snovi v čistilnih in razkužilnih sredstvih ter njihove prednosti in slabosti (Wirtanen, 1995; Flemming, 1991; Troller, 1993)

SESTAVINE ČISTILNIH SREDSTEV	PREDNOSTI	SLABOSTI
KLOROVE SPOJINE	-Širok spekter delovanja, -aktivne v nizkih koncentracijah, -uniči matriks biofilma, -odstop biofilma iz površine	-Toksični razgradni produkti, -lahko se pojavi rezistenca, -koroziiven in ostanki klor na površini, - reagira z ekstracelularnimi polimeri in slabo prodira v biofilm,
HIPOKLORIT	-Poceni, učinkovit, -enostaven za uporabo, -destabilizacija in odstop biofilma, -širok spekter aktivnosti.	-Slaba stabilnost, toksičnost, -koroziiven, oksidativen, -hitra ponovna rast mikrobov, -možne diskoloracije produkta, -ne preprečuje vezave biofilma.
KLORAMIN	-Dobra penetracija v biofilme, -hitra reakcija z mikrobi.	-Manj učinkovit od klor pri bakterijah v suspenziji, -razvoj odpornosti, -ostanki razkužila na površini.
KLOROV DIOKSID	-Učinkovit pri nizkih koncentracijah, -neodvisen od pH, -priprava na mestu čiščenja.	-Toksični razgradni produkti, -eksploziven plin.
KVARTERNE AMONIJEVE SPOJINE	-Učinkovite in brez vonja in okusa, -odstranjujejo in preprečujejo vezavo biofilma na površino, -nekorozivne, netoksične, -ne dražijo.	-Nizek pH jih inaktivira, prav tako kal- cijeve in magnezijeve soli, -razvoj odpornosti, -neučinkovite proti Gram negativnim bakterijam.
JODOFORJI	-Širok spekter aktivnosti, -nekorozivne in ne dražijo -enostavne za uporabo.	-Imajo močan vonj in okus, -v stiku s škrobom se obarva vijola -drag
PEROCETNA KISLINA	-Učinkovita pri nizkih koncentracijah, -širok spekter aktivnosti, -uničuje tudi spore.	-Korozivna, -relativno nestabilna.
GLUTARALDEHID	-Učinkovit pri nizkih koncentracijah, -poceni, -nekoroziven, neoksidativen	-Slabo prodira v biofilm, -ragradi se v mravljično kislino.
HIDROGEN PEROKSID	-Razgradi se na vodo in kisik, -relativno netoksičen, -uporablja se ga lahko <i>in situ</i> , -preprečuje vezavo biofilma na površino in ga odstranjuje.	-Potrebne visoke koncentracije >3%, -razvoj odpornosti, -korozivnost.
OZON	-Podobna učinkovitost kot klor, -dekompozicija kisika, -ni ostankov, -odstranjuje biofilm.	-Reakcija z organskimi snovmi, nastanek epoksidov, -korozivnost -kratka obstojnost, -občutljivi na kompozicijo vode.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMATSKI PRIKAZ OPRAVLJENEGA DELA



Slika 8: Shema poteka eksperimentalnega dela

Analizo smo razdelili v dva vsebinska sklopa (slika 8). Prvi del se nanaša na testiranje vzorcev na snažnost, kjer smo določali skupno število aerobnih mikroorganizmov, fekalnih koliformnih bakterij in bakterije vrste *Escherichia coli*. Naslednji korak pa je bila kvalitativna preiskava za določitev izbranih bakterijskih patogenih vrst: *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* in *Salmonella* spp. Drugi sklop pa se nanaša na preiskavo učinkovitosti čistilnih sredstev uporabljenih v obeh živilskih podjetjih.

3.2 ODVZEM VZORCEV

Vzorci za mikrobiološko analizo so bili odvzeti 12. februarja 2009 v dveh perutninarsko predelovalnih obratih. Brisi na površinah klavnice in pakirnice so bili odvzeti pred začetkom proizvodnje in med potekom proizvodnje. Skupaj smo vzorčili 60 različnih površin in produktov v obeh klavnicah. Vzorci so bili odvzeti v dveh ponovitvah, ki smo jih dosledno označili po vnaprej dogovorjenih označbah.

V proizvodnji smo zbrali 3 vrste vzorcev:

- vzorci brisov površine v neposrednem stiku s surovino ali izdelkom (proizvodna linija);
- vzorci površin proizvodnega okolja, ki niso v neposrednem stiku s surovino ali produktom (umivalnik, stena, kljuka, tehnološka voda);
- vzorci izdelka (svežega piščanca oz. kože s piščančjega vratu).

Vzorčna mesta brisov površine v neposrednem stiku s surovino ali produktom smo določili po uskladitvi že obstoječih shem analiz tveganja HACCP sistema v proizvodnji obeh perutninskih obratov (slika 5 in 6). Odvzem brisov na snažnost površin je potekal aseptično po standardni metodi. Za vzorčenje so bile uporabljene sterilne epruvete s 5 ml sterilne fiziološke raztopine s sterilno vatenko. Vzorec smo odvzeli s površine velikosti 100 cm². Vzorce kože s piščančjega vratu smo s sterilnim skalpelom in pinceto odrezali s svežega proizvoda po hlajenju in pred pakiranjem ter jih zapakirali v sterilne plastične vrečke. Kot vzorec proizvoda smo odvzeli kožo z vratu piščancev, kot to predvideva standardni postopek opisan v standardu (EC 1441, 2007). Odvzete vzorce smo po odvzemu shranili v hladilni skrinji in vzdrževali na temperaturi 4-8 °C med transportom do laboratorija.

3.3 IZVEDBA MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ

3.3.1 Ugotavljanje prisotnosti mikrobioloških indikatorjev snažnosti

MATERIALI

Pri analizi vzorcev skupnega števila aerobnih mikroorganizmov smo uporabili predpripravljena sterilna kromogena gojišča. Uporabili smo gojišče Compact Dry TC (HyServe, Nemčija) za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov in gojišče Compact Dry EC (HyServe, Nemčija) za ugotavljanje števila koliformnih bakterij in bakterij *E. coli*. Gojišče Compact Dry TC vsebuje standardni hranljivi agar in redoks indikator tetrazolijevo sol za obarvanje kolonij. Gojišče Compact Dry EC vsebuje barvilo

Magenta-Gal (β -D-galactopiranozid) in X-Gluc (X- β -D-glukuronid). *E. coli* ločimo od koliformnih po njeni β -D-glukuronidazni aktivnosti in se na gojišču obarva modro, ostale koliformne bakterije pa rdeče. Število skupnih koliformnih bakterij je seštevka obeh (Compact Dry, 2010).

METODA

Nacepili smo po 1,0 ml vzorca na sveže kromogeno gojišče v štirih zaporednih razredčitvah. Plošče Compact Dry TC smo nato inkubirali po navodilih proizvajalca 24 ur na 30 °C in Compact EC 72 ur na 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli obarvane kolonije in izračunali koncentracije živih mikroorganizmov v enotah CFU/ml po spodnji formuli (ISO 4833, 1991). Upoštevali smo le števne plošče, ki so vsebovale 30-300 kolonij. Pridobljene rezultate smo pomnožili z 10. Dobili smo vrednost mikroorganizmov v 10 ml brisa, kar ustreza površini 100 cm² (2).

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0,10 \cdot n_2) \cdot d \quad \dots(1)$$

N – mikroorganizmi CFU/100cm²
ΣC – vsota vseh kolonij na ploščah;
n₁ – število plošč prve razredčitve;
n₂ – število plošč druge razredčitve,
d – prva razredčitev (10^{-x}).

$$N_{100\text{cm}^2} = N \cdot 10\text{ml} \quad \dots(2)$$

3.3.2 Ugotavljanje prisotnosti patogenih mikroorganizmov

METODE in MATERIALI

Analizo odvzetih vzorcev smo naredili po klasičnih za identifikacijo patogenih bakterij standardiziranih postopkih:

- *Campylobacter jejuni, coli*. (VTT-4377, 1991; priloga A),
- *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1, 1996; priloga B),
- *Salmonella* spp. (ISO 6579, 2002; priloga C).

Vsa uporabljena gojišča in potrebni dodatki za standardno preiskavo za vse tri patogene mikroorganizme so navedeni v preglednici (priloga D, E, F). Za potrditev rezultatov po standardni metodi smo uporabili oksidazni in katalazni test, ter barvanje po Gramu. Poleg tega pa smo uporabili še komercialni biokemijski ANITM test za identifikacijo bakterij *Salmonella* spp. Test razlikuje bakterijske vrste *Salmonella* spp. glede na aktivnost koagulaz. Biokemijski test APITM pa razlikuje različne vrste *Listeria* spp. med seboj in potrdi ali ovrže prisotnost vrste *Listeria monocytogenes*.

Potrditev dobljenih pozitivnih rezultatov s klasično metodo smo izvedli tudi z molekularno-biološko metodo: PCR v realnem času. Uporabili smo komercialno

pripravljen test iQ-Check Salmonella (Bio-Rad, Francija), iQ-Check Listeria monocytogenes (Bio-Rad, Francija) in iQ-Check Campylobacter (Bio-Rad, Francija). Sistem je zelo enostaven za uporabo in uporablja DNK oligonukleotidne začetnike, ki fluorescirajo z različno močjo glede na količino prisotne DNK določene bakterije. Po navodilih smo pripravljene vzorce vložili v sistem iCycler iQ™, kjer je potekla verižna reakcija pomnoževanja mikrobne DNK s polimerazo. Aparat zazna DNK in jo primerja s kontrolnim vzorcem ter posname fluorescenčni signal. Iz krivulj lahko tudi kvantitativno določimo količino bakterij v vzorcu (Bio-Rad, 2009).

3.4 TESTIRANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI ČISTILNIH IN RAZKUŽILNIH SREDSTEV

Protimikrobno učinkovitost čistilnih in razkužilnih sredstev iz perutninsko predelovalne industrije smo testirali z modificiranim suspenzijskim testom (EN 1276, 1997) in t.i. površinskim testom na jeklenih nosilcih (Charaf, 2000). Za vse teste smo uporabili izolate iz industrije in jih primerjali z rezultati sevov iz mikrobiološke zbirke Biotehniške fakultete.

3.4.1 Priprava testnih mikroorganizmov

V poskus smo vključili testne mikroorganizme, ki smo jih osamili in identificirali s površin perutninsko predelovalnih obratov, ter mikroorganizme iz mikrobiološke zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete. Uporabili smo testne mikroorganizme vrst:

- *Campylobacter* spp.,
- *Listeria monocytogenes*,
- *Salmonella* spp.

3.4.1.1 Predpriprava mikroorganizmov na poskus

V hladilnici shranjene testne mikroorganizme, ki smo jih izolirali iz odvzetih vzorcev, smo precepili in jih inkubirali 24 ur. Na sveže gojišče smo precepili eno bakterijsko kolonijo *Salmonella* in eno vrste *L. monocytogenes* v MHB (Oxoid, Anglija) gojišče in jih inkubirali pri aerobnih pogojih na 37 °C. Bakterije vrste *Campylobacter* smo nacepili na Abeyta-Hunt-Bark gojišče-AHB (Oxoid, Anglija). Sledila je inkubacija na 42 °C za 24 ur v anaerobnih loncih.

Testne organizme *Campylobacter* iz laboratorijske zbirke (- 80 °C) smo precepili na sveža gojišča Columbia (Oxoid, Anglija), z rastnim dodatkom za *Campylobacter* (Oxoid, Anglija) in dodatkom lizirane konjske krvi. Plošče smo inkubirali pri anaerobnih pogojih na 37 °C/ 72 ur. Po 3 dneh je sledilo precepljanje na sveža gojišča Columbia (Oxoid, Anglija) in inkubacija 42 °C/ 24 ur. Enako smo precepljali testne mikroorganizme iz laboratorijske zbirke (-80 °C) vrste *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*. Shranjene mikroorganizme smo precepili na sveža gojišča. Za *L. monocytogenes* smo uporabili

gojišče OXFORD (Oxoid, Anglija) in za *Salmonella* XLD (Biolife, Italija). Plošče smo inkubirali pri aerobnih pogojih na 37 °C/ 72 ur. Po 3 dneh smo mikroorganizme precepili na sveža gojišča (XLD in OXFORD) in inkubirali še 24 ur na 37 °C.

3.4.1.2 Priprava bakterijske suspenzije

Campylobacter spp.

Eno bakterijsko kolonijo vrste *Campylobacter* spp. smo precepili v tekoče gojišče MHB (Oxoid, Anglija) z dodatkom lizirane konjske krvi (20 ml na 1 l gojišča). Nato smo inkubirali za 24 ur na 42 °C v mikroaerofilnem okolju (anaerobnem loncu z uravnano atmosfero).

Listeria monocytogenes

V tekoče gojišče MHB (Oxoid, Anglija) smo precepili eno kolonijo vrste *L. monocytogenes*. Nato smo inkubirali aerobno, pri 37 °C za 24 ur.

Salmonella spp.

Bakterijsko kolonijo vrste *Salmonella* spp. (iz laboratorijske zbirke) smo precepili v tekoče gojišče MHB (Oxoid, Anglija) in inkubirali pri 37 °C, za 24 ur v aerobnem okolju.

3.4.2 Priprava in testiranje inaktivacijske tekočine

3.4.2.1 Priprava inaktivacijske tekočine

MATERIAL in METODA

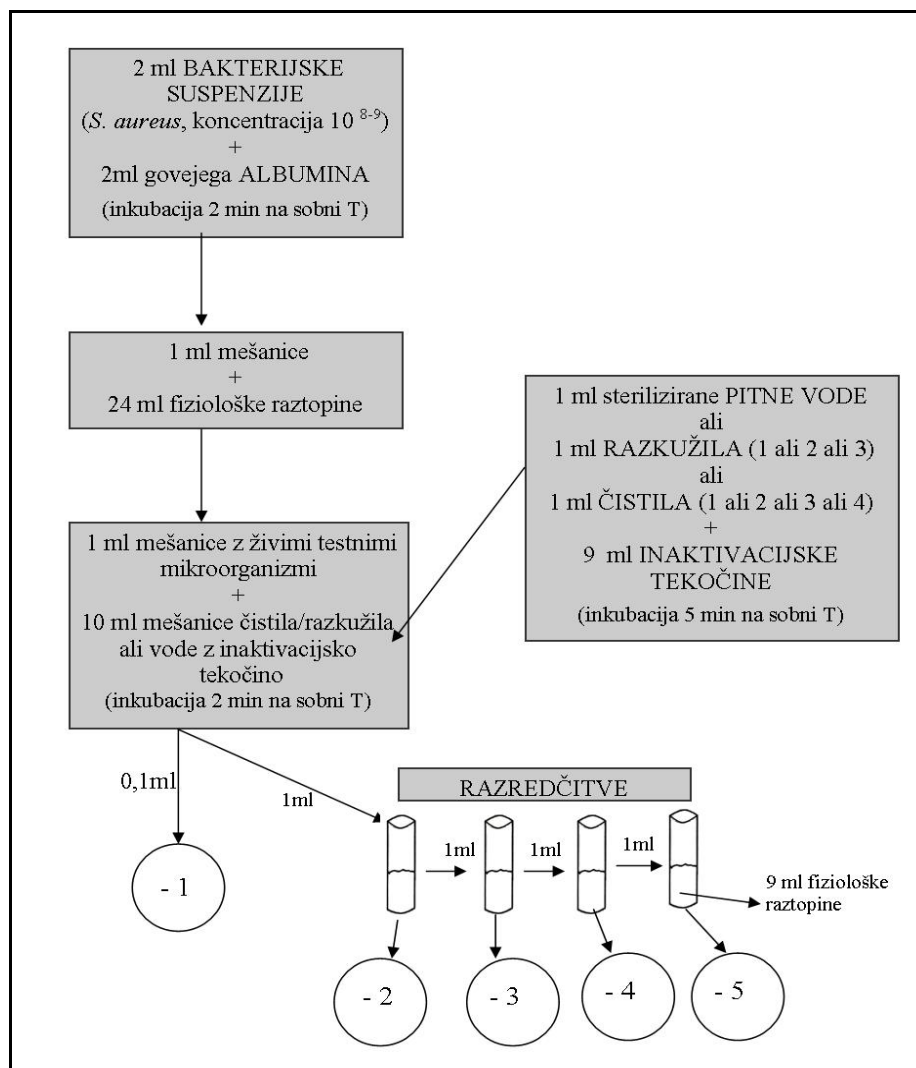
Raztopino smo pripravili po internih navodilih inštituta VTT (VTT 4278-96, 1996). Za 500 ml inaktivacijske tekočine smo pripravili 5 ml 0,25 M fosfatnega pufra (KH₂PO₄). Ločeno smo v erlenmajerici pripravili 3 g lecitina (Sigma, ZDA), 30 ml of Tween 80 (Merck, Nemčija) ter 300 ml destilirane vode. Mešanico smo segreli na 70 °C in enakomerno mešali na magnetnem mešalu, dokler ni postala transparentna. Ohlajeni raztopini smo dodali 4,0 g natrijevega tiosulfata (Merck, Nemčija), 0,5 g L-histidin HCl (Sigma, ZDA), 5 ml 1,25 M Sorensovega fosfatnega pufra ter 3,6 g govejega albumina (Sigma, ZDA). Mešanico smo razredčili z destilirano vodo do 500 ml in jo sterilizirali z membransko filtracijo (filter s porami velikosti 0,45 µm).

3.4.2.2 Testiranje inaktivacijske tekočine

MATERIAL in METODA

Testiranje inaktivacijske tekočine smo izvedli tako kot kaže spodnja slika (slika 9). Najprej smo naredili poskus z sterilizirano pitno vodo in nato po istem postopku z vsemi razkužili in čistili, ki smo jih uporabili v nadaljnjem poskusu. Pripravili smo ustrezne razredčitve in

jih nacepili po 1 ml na pripravljene agarske plošče-MHA(Oxoid, Anglija). Plošče smo inkubirali 48 ur na 37 °C. Pripravljeno inaktivacijsko tekočino je potrebno preizkusiti, da ne vpliva negativno na rast ali razmnoževanje mikroorganizmov. Hkrati pa mora povzročiti inaktivacijo vseh aktivnih učinkovin v različnih vrstah razkužil in čistil. S predhodnim mešanjem inaktivacijske tekočine in razkužila (čistila) vnaprej inaktiviramo delovanje razkužila (čistila) in zato ne poškoduje ali uniči dodanih testnih mikroorganizmov. Ob dokazani popolni inaktivaciji, razkužilo na rast nima vpliva in na ploščah po inkubaciji določimo koncentracijo testnih mikroorganizmov, ki je enaka začetni. V poskusu z dodatkom sterilizirane vode pa dokažemo, da sama inaktivacijska tekočina nima nobenih negativnih vplivov na rast testnih mikroorganizmov.



Slika 9: Shema poteka testiranja inaktivacijske tekočine

3.4.3 Priprava delovnih raztopin sanitacijskih sredstev

Uporabili smo 7 komercialnih čistilnih in razkužilnih sredstev za vzdrževanje higiene površin v perutninsko predelovalni industriji. Spodnji preglednici vsebujeta nekatere podatke o čistilih in razkužilih, povzetih po specifikacijskih listih ter navodilih uporabe proizvajalca. Raztopine izbranih čistilnih sredstev in razkužil smo razredčili na priporočeno koncentracijo po priporočilih proizvajalca s sterilizirano pitno vodo.

Preglednica 8: Sestava čistil, uporabljenih v poskusu

TRGOVSKO IME	SPECIFIKACIJA in TIP RAZKUŽILA	PRIPOROČENA KONCENTRACIJA	TEMPERATURA, KONTAKTNI ČAS
T99	Peneče alkalno sredstvo z aktivnim kloridom.	1-2 %	sobna temperatura, 15 min
Ostale značilnosti:	SESTAVA: 5-10 % N-(3-aminopropil)-N-dodecilpropan-1,3-diamin, 2-5 % očetna kislina; pH: cca. 8,7 (100 %) EKOTOKSIKOLOŠKI PODATKI: test razgradljivosti >60 % BPK/KPK ali test sproščanja CO ₂ , 70 % DOC		
TDS	Kislo dezinfekcijsko sredstvo, na osnovi perocetne kisline in vodikovega peroksida, za uporabo v živilski industriji	1-2 %	sobna temperatura, 15 min
Ostale značilnosti:	SESTAVA: 10-25 % vodikov peroksid, 10-25 % očetna k., 2,5-10 % perocetna kislina, <2,5 % amini, alkildimetil N-oksidi; pH cca 3,25-3,45		
N10	Večnamensko dezinfekcijsko sredstvo	1-2 %	5-30 minut
Ostale značilnosti:	SESTAVA: 1-5 % Polieksametilendigvanid hidroklorid; pH (1 %) 6-7 % EKOTOKSIKOLOŠKI PODATKI: KOROZIVNOST: Ne povzroča korozije na inox jeklu, jeklu, gumi, plastiki, epoksi premazih, bakru, steklu in cementu, aluminiju, pocinkanem jeklu.		

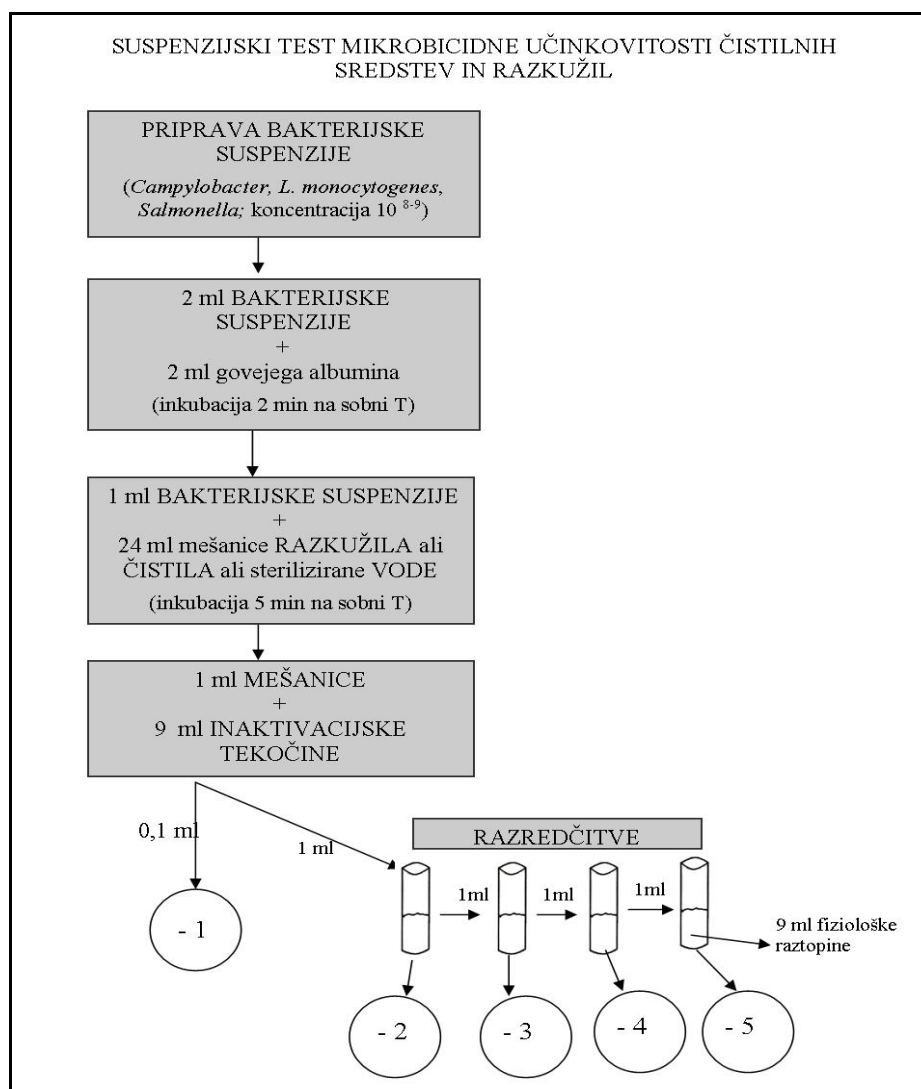
Preglednica 9: Sestava razkužil, uporabljenih v poskusu

TRGOVSKO IME	SPECIFIKACIJA in TIP ČISTILA	PRIPOROČENA KONCENTRACIJA	TEMPERATURA, KONTAKTNI ČAS
T19	Peneče alkalno čistilno sredstvo za živilsko industrijo.	2-5 %	do 60 °C, 10-30 min
Ostale značilnosti:	SESTAVA: 5-15 % Natrijev hidroksid; 5-15 % NTA, Na soli; < 5 % alkilaminooksid, pH (koncentriran) >13, pH (1 % razt.) je 12,5 EKOTOKSIKOLOŠKI PODATKI: NTA 5,0-15,0 % , <5 % neionskih tenzidov KOROZIVNOST: Ne povzroča korozije na inox jeklu, jeklu, gumi, plastiki, epoksi premazih, bakru, steklu in cementu, aluminiju, pocinkanem jeklu.		
T56	Tekoče kislo sredstvo, namenjeno za odstranjevanje anorganskih inkrustacij	2-5 %	40-50 °C, 15 min
Ostale značilnosti:	SESTAVA: 25-30 % fosforjeva kislina, 5-10 % , 2-(2-butoksi-etoksi)etanol, 2-5 % amini, C12-18,-alkildimetil, N-oksidi, 0,5-1,0 % Fosforjeva (V) kislina izotridecil ester, pH (1 % razt.): 1,9. EKOTOKSIKOLOŠKI PODATKI: < 5 %: neionski tenzidi, test razgradljivosti >60 % BPK/KPK ali test sproščanja CO2, 70 % DOC		
C10	Kisli peneči detergent z dezinfekcijskim delovanjem za čiščenje vertikalnih površin	3-10 %	15-60 °C, 5 min
	SESTAVA: fosforjeva kislina 15-20 % ut., 1-5 % brezvodni vodikov klorid, 1-5% 2-butoeksietanol. pH je 1 EKOTOKSIKOLOŠKI PODATKI: Vsebuje neionske tenzide biološko razgradljive nad 90 %, fosfor 13 %. Preparat vpliva na dvig KPK za 95,2 mg/g. KOROZIVNOST: Ne povzroča korozije na inox jeklu, jeklu, gumi, plastiki, epoksi premazih, bakru, steklu. Povzroča na cementu, marmorju, kamnu, malti. UPORABA: Najdaljši kontaktni čas s površino je 5 minut. Preparat se ne sme osušiti na površini. Nanos preko opreme za nanašanje pene in detergentov.		
V10	Peneči detergent srednje alkalnosti za odstranjevanje organske substance s strojne opreme in drugih pokončnih površin v živilski industriji.	5-6 %	15-50 °C, 15 min
Ostale značilnosti:	SESTAVA: Natrijev hidroksid >5 % ut., pH brez uravnave: 14, pH 1 % je 12. EKOTOKSIKOLOŠKI PODATKI: Vsebuje neionske tenzide biološko razgradljive nad 90 %, fosfor 0,42 %. Preparat vpliva na dvig KPK za 175 mg/g. KOROZIVNOST: Ne povzroča korozije na inox jeklu, jeklu, gumi, plastiki, epoksi premazih, bakru, steklu in cementu. Povzroča na aluminiju, pocinkanem jeklu, poškoduje površine premazane z nitro in fenolnimi premazi.		

3.4.4 Suspenzijski test mikrobicidne učinkovitosti čistilnih sredstev in razkužil

METODA in MATERIALI

Pri izvedbi suspenzijskega testa mikrobicidne učinkovitosti čistilnih sredstev in razkužil smo upoštevali postopek evropskega standarda: (EN 1276, 1997). Vnaprej smo pripravili bakterijske suspenzije izbranega patogenega mikroorganizma (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* ali *Listeria monocytogenes*) s koncentracijo 10^7 - 10^8 CFU/ml. Postopek je opisan v poglavju 3.4.1.2.



Slika 10: Shema postopka za izvedbo suspenzijskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev

Suspenzijski test protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev smo izvedli tako kot je opisano na sliki 10. Naredili smo 5 razredčitev in jih nacepili na pripravljena gojišča. Za poskus z bakterijami *Salmonella* in *Listeria monocytogenes* smo uporabili MHA (Oxoid) gojišča in za bakterije vrste *Campylobacter* sestavljeno AHB gojišče.

Sledilo je inkubiranje pri optimalnih pogojih za organizem:

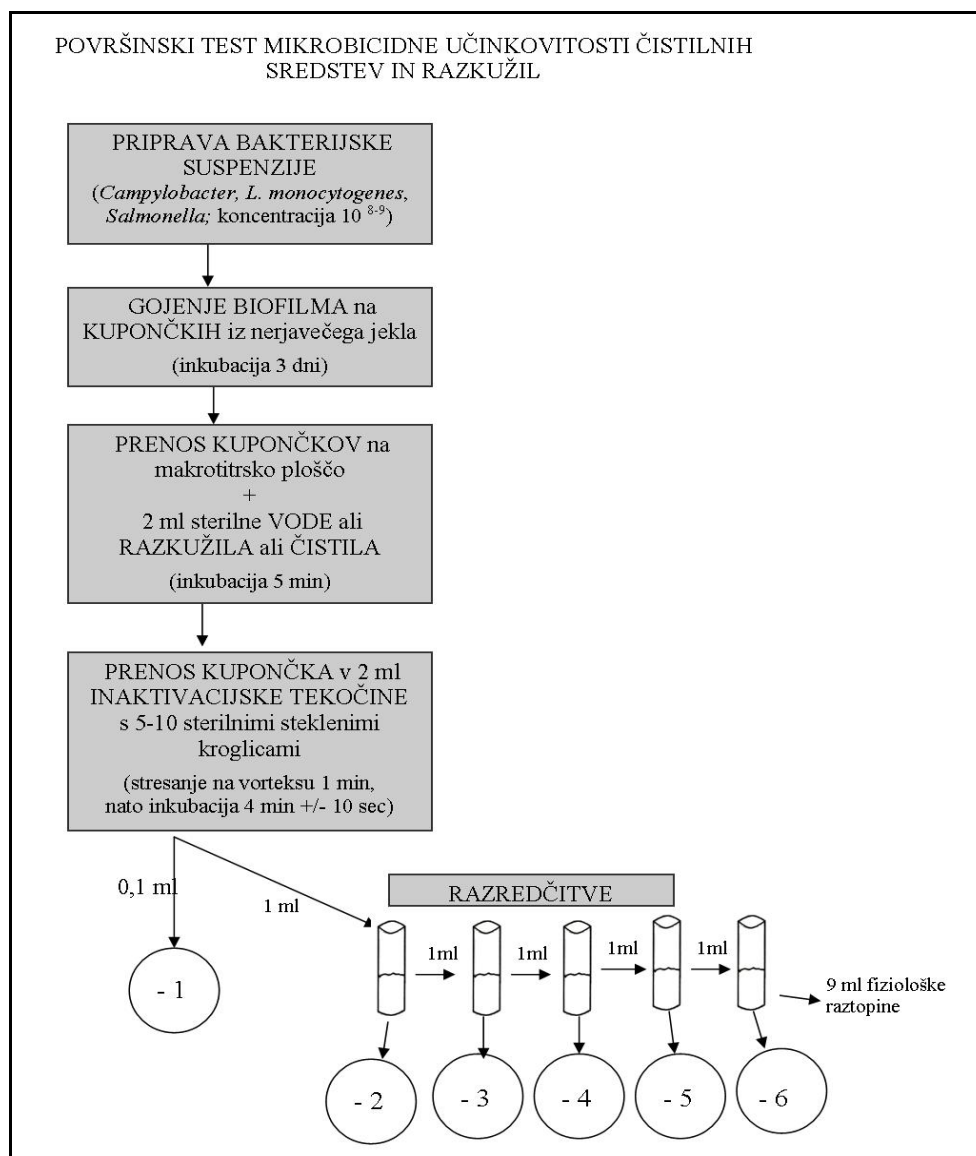
- *Salmonella* spp.: MHA agar, aerobni pogoji, 24 ur pri 37 °C;
- *Listeria monocytogenes*: MHA agar, aerobni pogoji, 24h pri 37 °C;
- *Campylobacter* spp.: AHB agar, inkubacija v anaerobnem loncu, 24 h pri 42 °C.

Zrasle kolonije na ploščah preštejemo in izračunamo koncentracijo mikroorganizmov po delovanju čistilnih/razkužilnih sredstev. Po formuli (3) pretvorimo v ME enote.

3.4.5 Površinski test protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev

METODA in MATERIALI

Poskus smo izvedli po internih navodilih Inštituta VTT (VTT-4278, 1996), ki so povzeti po objavi Charaf in njenih sodelavcev (2000). Metoda vključuje gojenje biofilma na nosilcih iz nerjavečega jekla kot prikazuje slika (slika 11).



Slika 11: Shema postopka za izvedbo površinskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev

Sterilizirane kupončke premera 12 mm in širine 2 mm iz nerjavečega jekla smo postavili z zgornjo stranjo navzdol na agar, prekrit s sterilnim filter papirjem (če ga nimamo, lahko uporabimo sterilno gazo). Na filter papir smo inokulirali bakterijsko suspenzijo testnega mikroorganizma (*Campylobacter*, *L.monocytogenes*, *Salmonella*). Inkubirali smo 72 ur pri optimalnih pogojih za izbrani mikroorganizem.

- *Salmonella* spp.: agar MHA (Oxoid, Anglija), aerobni pogoji, 72 ur pri 37 °C;
- *Listeria monocytogenes*: agar MHA (Oxoid), aerobni pogoji, 72 ur pri 37 °C;
- *Campylobacter* spp.: agar AHB, mikroaerofilna inkubacija v anaerobnem loncu, 72 ur na 42 °C.

Kupončke po inkubaciji smo previdno odstranili iz inkubiranih plošč in jih s sprednjo stranjo navzgor, v aseptičnih pogojih, prestavili v makrotitrsko ploščo. Naprej smo sledili postopku, ki je opisan na sliki 11. Za nacepljanje mešanice po razredčitvah smo uporabili ista gojišča, kot pri gojenju biofilma testnega mikroorganizma na kupončkih. Po 24 urni inkubaciji smo prešteli kolonije na agarških ploščah in določili število ME.

3.4.6 Določitev baktericidnega delovanja

Pri določanju baktericidnega delovanja je potrebno najprej prešteti kolonije bakterij na ploščah. Rezultate preračunamo v CFU/ml. Učinkovitost čistilnih in razkužilnih sredstev je podana v enotah ME. Enota ME (angl. Microbicidal effect) nam pove za koliko logaritmskih enot je razkužilo ali čistilno sredstvo zmanjšalo mikrobnό populacijo. Sanitacijsko sredstvo je baktericidno, če znaša ME vsaj za 5 enot.

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0,10 * n_2) * d \quad \dots(1)$$

N – mikroorganizmi CFU/ml;

ΣC – vsota vseh kolonij na ploščah;

n_1 – število plošč prve razredčitve;

n_2 – število plošč druge razredčitve;

d – prva razredčitev (10^{-x}).

$$ME = \log N_c - \log N_d \quad \dots(3)$$

N_c – CFU/ml z fiziološko raztopino, brez baktericidnega sredstva,

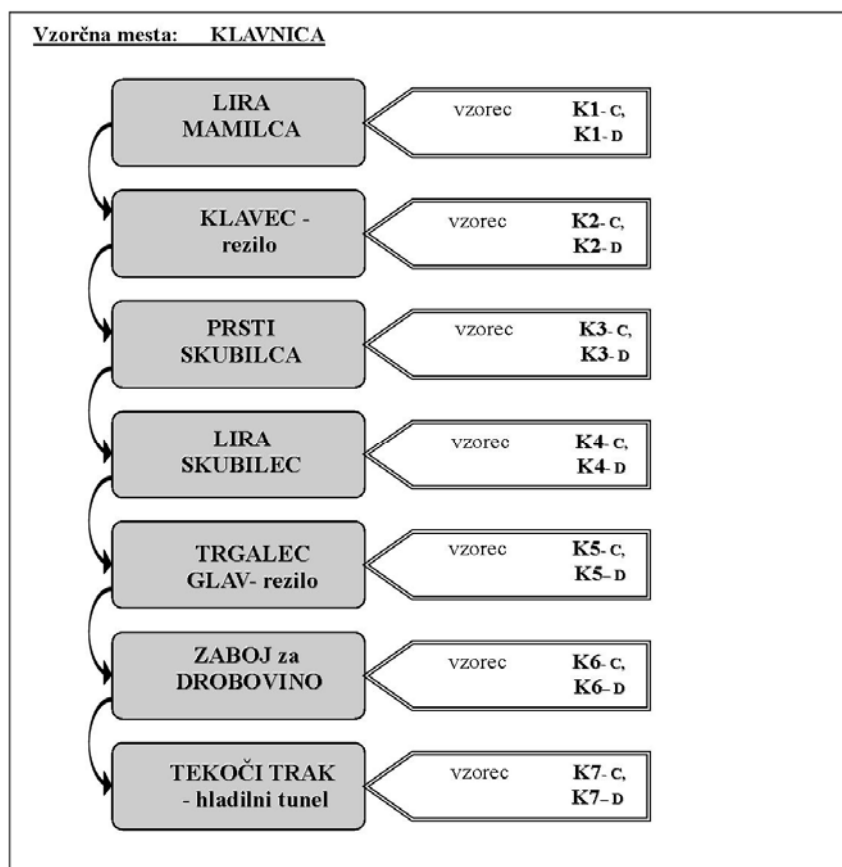
N_d – CFU/ml z baktericidnim sredstvom.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČITEV VZORČNIH MEST

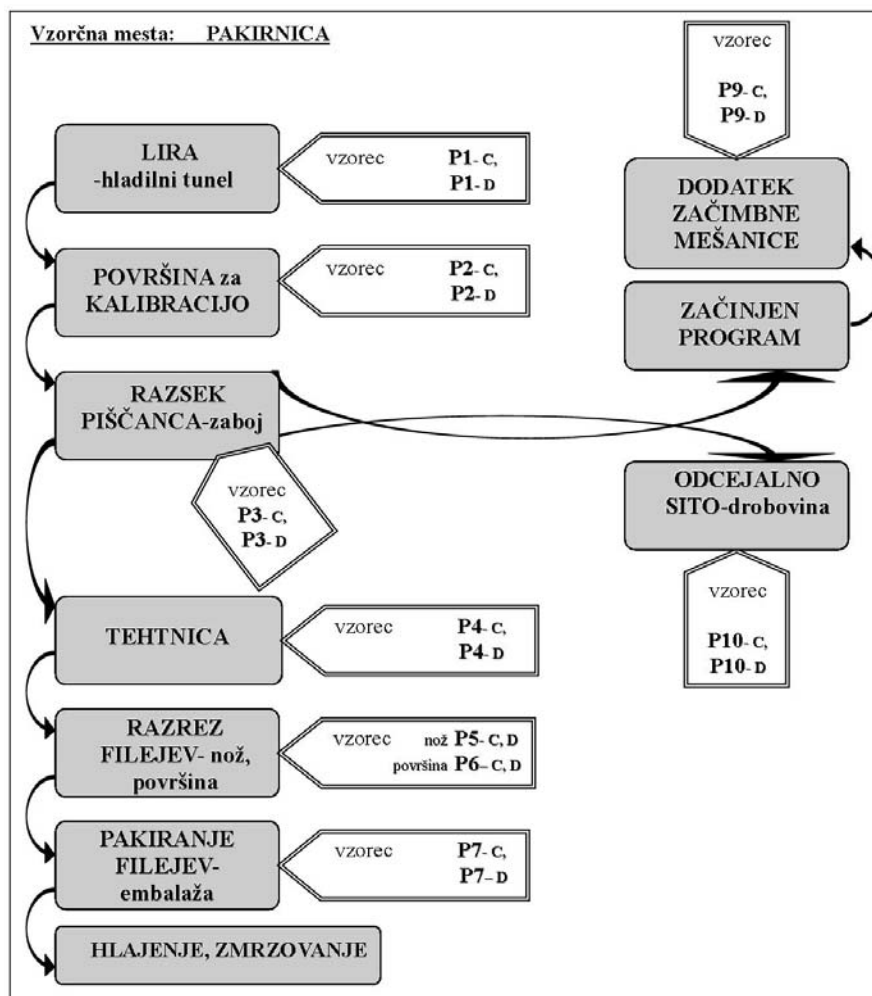
Po pregledu obeh perutninskih obratov smo določili vzorčna mesta delovnih površin na podlagi obstoječe sheme analiz tveganja in kritičnih kontrolnih točk, sistema HACCP. Na spodnjih shemah so izbrana vzorčna mesta z oznakami (slika 12, 13, 14 in 15). Shema izbranih vzorčnih mest je vsebovala:

- Vzorke površin v neposrednem stiku s surovino ali izdelkom:
 - klavnica K1-K7, vzorec čiste in umazane površine,
 - pakirnica P1-P10, vzorec čiste in umazane površine.
- Vzorke površin, ki se ne dotikajo neposredno surovine ali izdelka:
 - klavnica HK1-HK4,
 - pakirnica HP1-HP4,
 - ostali vzorci H1-H3.
- Vzorke izdelka:
 - koža s piščančjega vratu BV



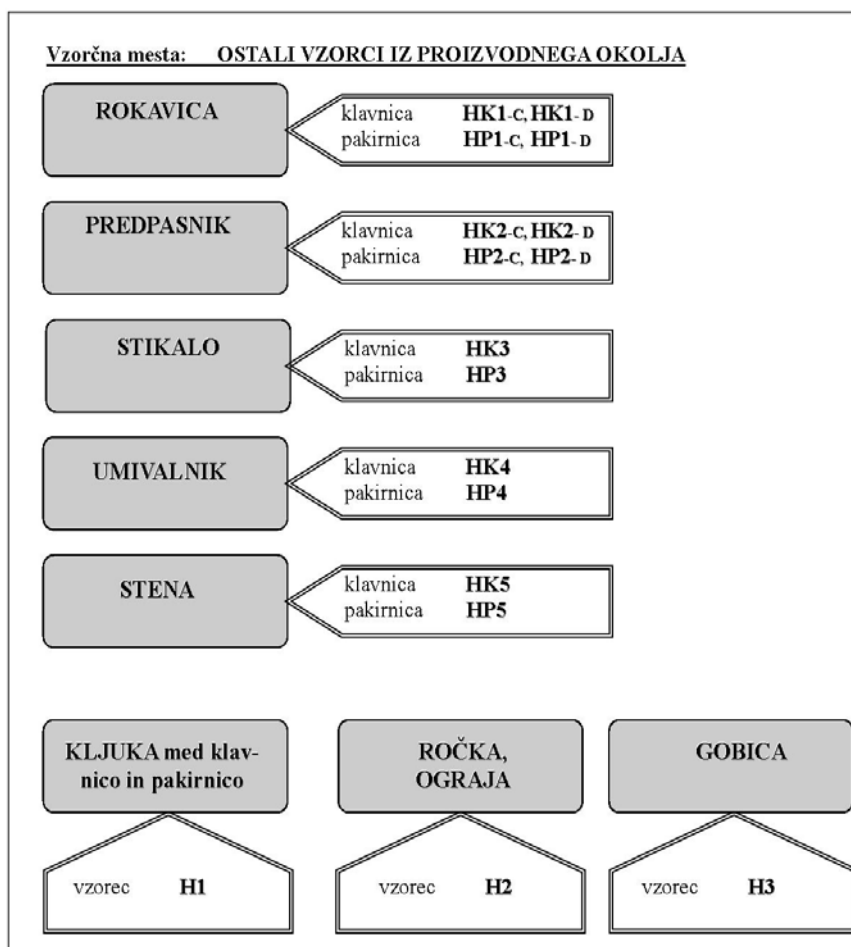
Slika 12: Procesna shema klavnice piščančjega mesa z označenimi mesti vzorčenja (oznaka vzorca C pomeni čisto, suho površino po sanitaciji, D pa med proizvodnjo)

V klavnici in pakirnici je bilo določenih po 7 vzorčnih mest površin v neposrednem stiku s surovino ali izdelkom (slika 12 in 13). Zaradi razlik med obema proizvodnjama imamo pri določenih točkah vzorec površine samo enega obrata. Vzorce čistih, razkuženih in suhih površin pred začetkom proizvodnje v klavnici smo označili kot K-C (1 do 7) in v pakirnici kot P-C (1 do 10). Vzorce brisov površin, odvzetih po začetku proizvodnje smo označili kot K-D (1 do 7) v klavnici in P-D (1 do 10) v pakirnici.



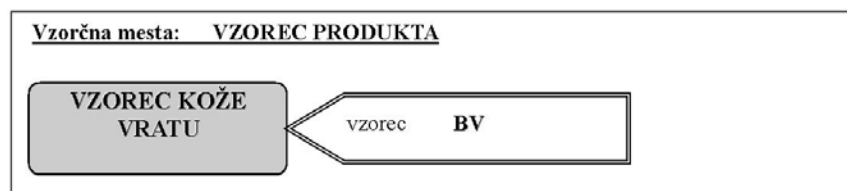
Slika 13: Procesna shema pakirnice piščančjega mesa z označenimi mesti vzorčenja

Odvzeti vzorci proizvodnega okolja so bili stena, stikalo, umivalnik, rokavice in predpasnik ter so označeni v klavnici kot HK (1-5) ter v pakirnici HP (1-5). Vzorci kljuke, vrtljive ograje in gobice so označeni s H (1-3) (slika 14).



Slika 14: Vzorci iz proizvodnega okolja z mesti vzorčenja in oznakami

Odvzeta je bila tudi koža vratu piščanca po standardnem postopku (oznaka BV) (slika 15).



Slika 15: Vzorec kože z vratu z oznako

4.2 UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV, KOLIFORMNIH M.O. IN BAKTERIJE *E. coli*

4.2.1 Skupno število mikroorganizmov, koliformni mikroorganizmi in *Escherichia coli* v obratu F1 in F2

Na slikah 16, 17 in 18 je podana primerjava med podjetjema F1 in F2 v skupnem številu mikroorganizmov (SŠM), koliformnih mikroorganizmov in *E. coli*. Razvidno je, da se število mikroorganizmov razlikuje med proizvodnjama. Pri podjetju F2 je skupno število mikroorganizmov nižje od 10^5 CFU/cm², le v primeru vzorca kljuka med klavnico in pakirnico je višje od 10^6 CFU/cm². Upoštevali smo kriterije prikazane v preglednici 10.

Preglednica 10: Kriteriji za oceno ustreznosti čistosti brisov

REFERENCA	KRITERIJ
Skupno število aerobnih mikroorganizmov (Commission Regulation..., 2005)	$m = 3,5 \log \text{CFU/cm}^2$ $M = 4,5 \log \text{CFU/cm}^2$
Enterobakterije (Commission Regulation..., 2005)	$m = 1,5 \log \text{CFU/cm}^2$ $M = 2,5 \log \text{CFU/cm}^2$
<i>Escherichia coli</i> (Debevere in sod., 2006)	odsotnost na kvadratni cm

Vzorci piščančjega vratu so bili vzeti po standardnem postopku in so v obeh proizvodnjah vsebovali več $> 6,5 \log \text{CFU/cm}^2$ skupnih mikroorganizmov. Prav tako so vsebovali $> 6,5 \log \text{CFU/cm}^2$ koliformnih mikroorganizmov in $> 6,5 \log \text{CFU/cm}^2$ bakterij vrste *Escherichia coli*.

4.2.1.1 Klavnica F1 in F2

Za klavnici F1 in F2 lahko povzamemo naslednje najpomembnejše rezultate ugotavljanja prisotnosti indikatorskih mikroorganizmov (slika 16):

V klavnici F1 je skupno število mikroorganizmov:

- V vseh vzorcih umazanih površin višje od $4,5 \log \text{CFU/cm}^2$.
- Na zgornji meji SŠM ($> 6,5 \log \text{CFU/cm}^2$) je bil vzorec trgalca glav (K5-d).
- V vzorcih čistih površin je bilo SŠM višje od $4,5 \log \text{CFU/cm}^2$: na čistih prstih skubilca (K3-F1-c), na čisti liri skubilca (K4-F1-c), na čistem rezilu trgalca glav (K5-F1-c) in na zaboju za drobovino (K6-F1-c).

Število koliformnih mikroorganizmov in prisotnost bakterij *E. coli* v klavnici F1:

- Prisotnost koliformnih mikroorganizmov in *E. coli* v vseh umazanih vzorcih. Koliformni mo. so bili prisotni v brisu čistih prstov skubilca (K3-F1-c), na trgalcu glav (K5-F1-c), na čistem zaboju za drobovino (K6-F1-c) in tekočem traku (K7-F1-c).
- Na trgalcu glav je prisotnih $> 6,5 \log \text{CFU/cm}^2$.

V klavnici F2 so bili rezultati analize indikatorskih mikroorganizmov sledeči:

- SŠM je bilo višje od 4,0 log CFU/cm²: na umazanem klavcu (K2-F2-d), umazanih in čistih prstih skubilca (K3-c in -d) ter na očiščenem tekočem traku hladilnega tunela (K7-F2-c).
- V vzorcu lire skubilca (K4-F2-d) in tekočega traku (K7-F2-d), odvzetem po začetku proizvodnje je SŠM preseglo 10⁵ CFU/cm².

Število koliformnih in *E. coli* v klavnici F2:

- Število koliformnih je bilo višje od 4,0 log CFU/cm² na umazanem vzorcu prstov skubilca (K3-F2-d) in na liri skubilca (K4-F2-d).
- Koliformni in *E. coli* so bili prisotni v koncentraciji večji od 2,5 log tudi na umazanem trgalcu glav (K5-d) in na čistem ter umazanem tekočem traku hladilnega tunela (K7-c in -d)

4.2.1.2 Pakirnica F1 in F2

Za pakirnici F1 in F2 lahko povzamemo naslednje najpomembnejše rezultate ugotavljanja prisotnosti indikatorskih mikroorganizmov (slika 17):

SŠM v pakirnici F1:

- V vseh vzorcih umazanih površin pakirnice je bilo SŠM višje od 4,5 log CFU/cm².
- Na zgornji meji (> 6,5 log CFU/ cm²) je vzorec čiste in umazane lire (P1-F1-d, P1-F1-c).
- SŠM je bilo višje od 6,0 log CFU/ cm² tudi v brisu čistega noža (P5-c) in v vzorcu že uporabljene embalaže (P7-F1-d).
- V vzorcih čistih površin (> 4,5 log CFU/cm²) je na čisti liri hladilnega tunela (P1-c), na površini za kalibracijo (P2-F1-c) in na vzorcu zaboja za razsek (P3-F1-c).

Število koliformnih mikroorganizmov in prisotnost bakterije *E. coli* v pakirnici F1:

- Prisotnost koliformnih mikroorganizmov in *E. coli* v vseh umazanih vzorcih.
- Število koliformnih mo. je bilo večje od 2,5 CFU/ cm² v vzorcih: površine za kalibracijo (P2-F1-c, P2-F1-d), na čistem in umazanem zaboju za razsek (P3-F1-c in -d), na umazani embalaži (P7-F1-d) in na umazanem vzorcu odcejalnega sita (P10-F1-d).

SŠM v pakirnici F2:

- Skupno število mikroorganizmov je bilo višje od 4,5 log CFU/cm²: na čistem in umazanem vzorcu noža (P5-F2-c, P5-F2-d), na vzorcu embalaže (P7-F2-d) in na odcejalnem situ (P10-F2-d).
- Čiste površine lire hladilnega tunela (P1-F2-c), površine za kalibracijo (P2-F2-c), čiste tehtnice (P4-F2-c) in odcejalnega sita (P10-F2-c) niso vsebovale zaznavnih koncentracij mikroorganizmov.

Število koliformnih in *E. coli* v pakirnici F2:

- Število koliformnih je bilo višje od 2,5 log CFU/cm² na že uporabljeni embalaži (P7-F2-d) in na umazanem odcejalnem situ (P10-F2-d).

- Koliformni in *E. coli* so bili prisotni v koncentraciji večji od 2,5 log na umazanem zaboju (P3-d), na umazani tehtnici (P4-F2-d), v čistem in umazanem brisu noža (P5-c in P5-d) in na umazani površini za razsek na uporabniške kose (P6-F2-d).

4.2.1.3 Vzorci brisov proizvodnega okolja v klavnici in pakirnici (F1 in F2)

Iz rezultatov vzorcev brisov proizvodnega okolja v klavnici in pakirnici (F1 in F2) lahko povzamemo naslednje najpomembnejše rezultate ugotavljanja prisotnosti indikatorskih mikroorganizmov (slika 18):

SŠM v obratu F1:

- SŠM je bilo višje od 4,5 log CFU/cm² v vzorcu umazanih rokavic (HK1-F1-d), v čistem in umazanem vzorcu predpasnika klavnice (HK2-F1-c in -d) in umazanem vzorcu predpasnika pakirnice (HP2-F1-d), v brisu umivalnika klavnice in pakirnice (HK4-F1, HP4-F1) ter v vzorcu ograje (H2-F1) in gobice (H3-F1).
- SŠM večje od 6,0 log CFU/ cm² smo detektirali na očiščenem predpasniku (HK2-F1-c) in na brisu odvzetem iz gobice (H3-F1).
- Vzorec brisa čiste rokavice iz klavnice (HK1-c-F1) in pakirnice (HP1-c-F1) nista vsebovale mikroorganizmov.

Število koliformnih mikroorganizmov in prisotnost bakterije *E. coli* v pakirnici F1:

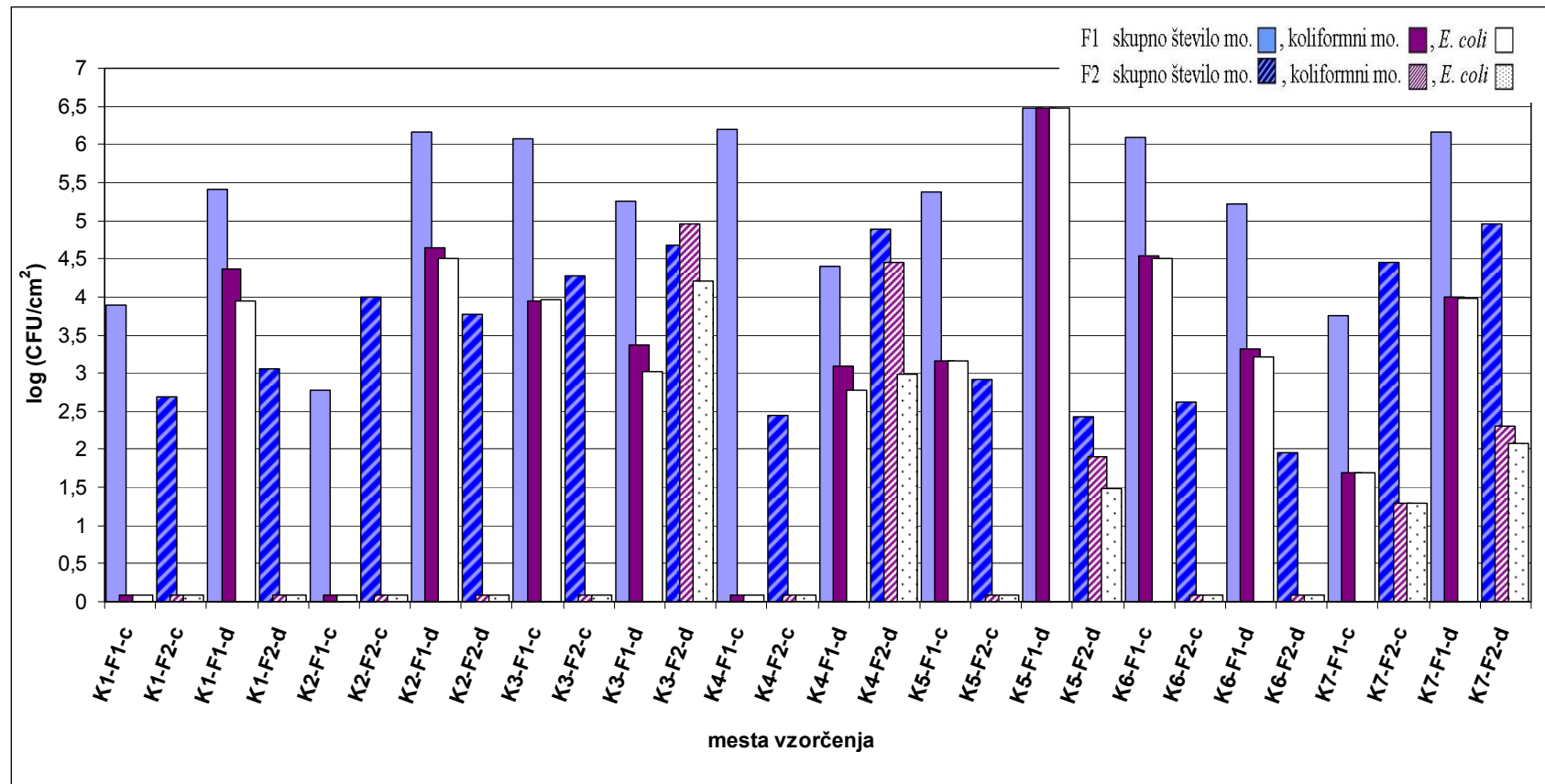
- Število koliformnih mo. je presegalo koncentracijo 2,5 log CFU/ cm² v vzorcu umazanih rokavic klavnice (HK1-F1-d), v vzorcu čistega in umazanega predpasnika (HK2-F1-c in HK2-F1-d), v vzorcu umivalnika v klavnici in pakirnici (HK4-F1, HP4-F1) ter v vzorcu umazanega predpasnika pakirnice (HP2-F1-d).

V obratu F2 je bilo skupno število mikroorganizmov naslednje:

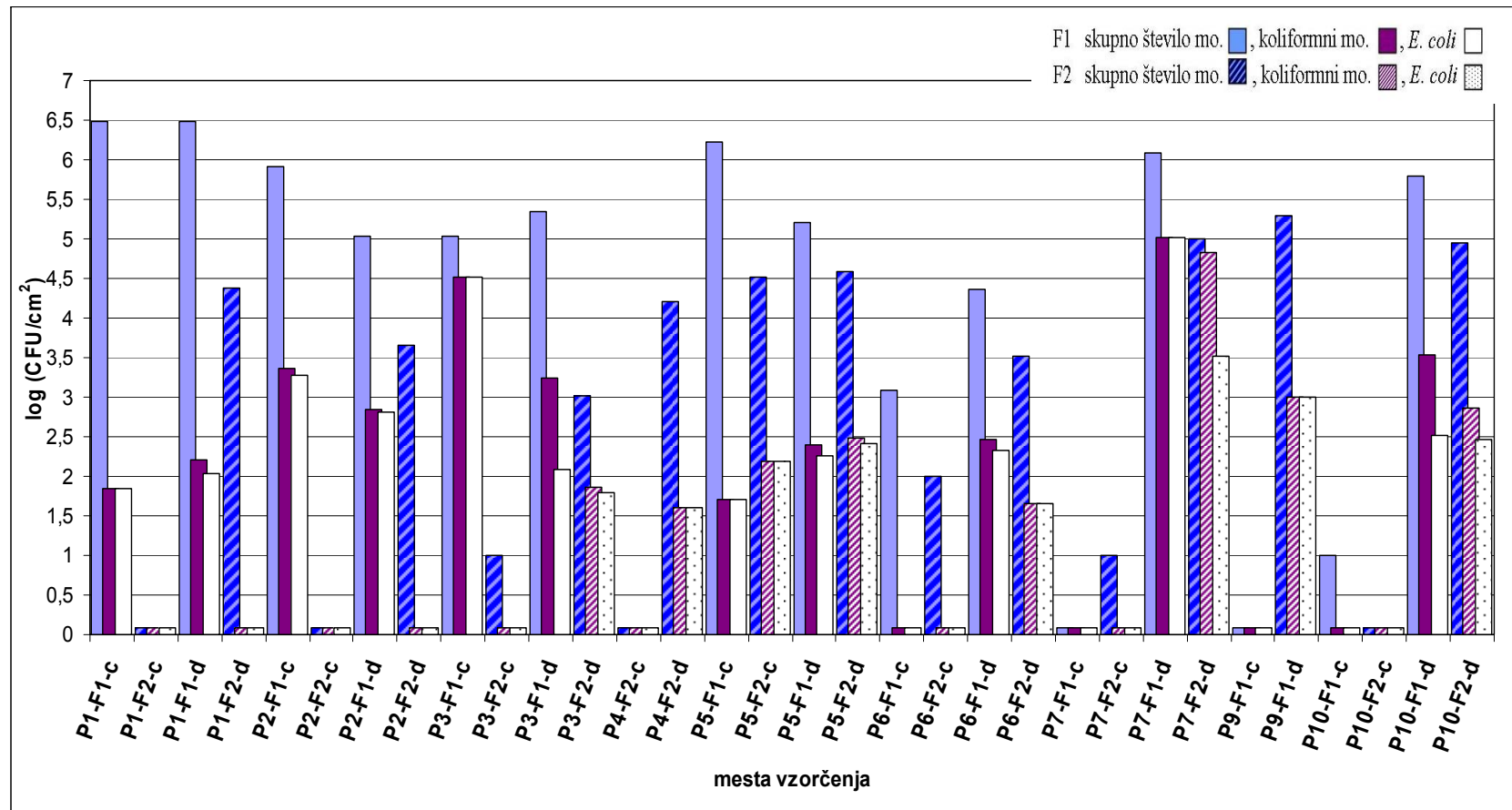
- SŠM je bilo višje od 4,5 log CFU/cm² na kljuki med klavnico in pakirnico (H1-F2) in na gobici za čiščenje (H3-F2).
- Vzorec H1-F2 je na zgornji meji (> 6,5 log CFU/ cm²).
- Vzorec brisa čiste rokavice iz klavnice (HK1-c-F2) in iz pakirnice (HP1-c-F2) ni vseboval mikroorganizmov. Prav tako ni bilo prisotnih živih mikroorganizmov na čistem predpasniku klavnice in pakirnice (HK2-c-F2 in HP2-c-F2).

Število koliformnih in *E. coli* v obratu F2:

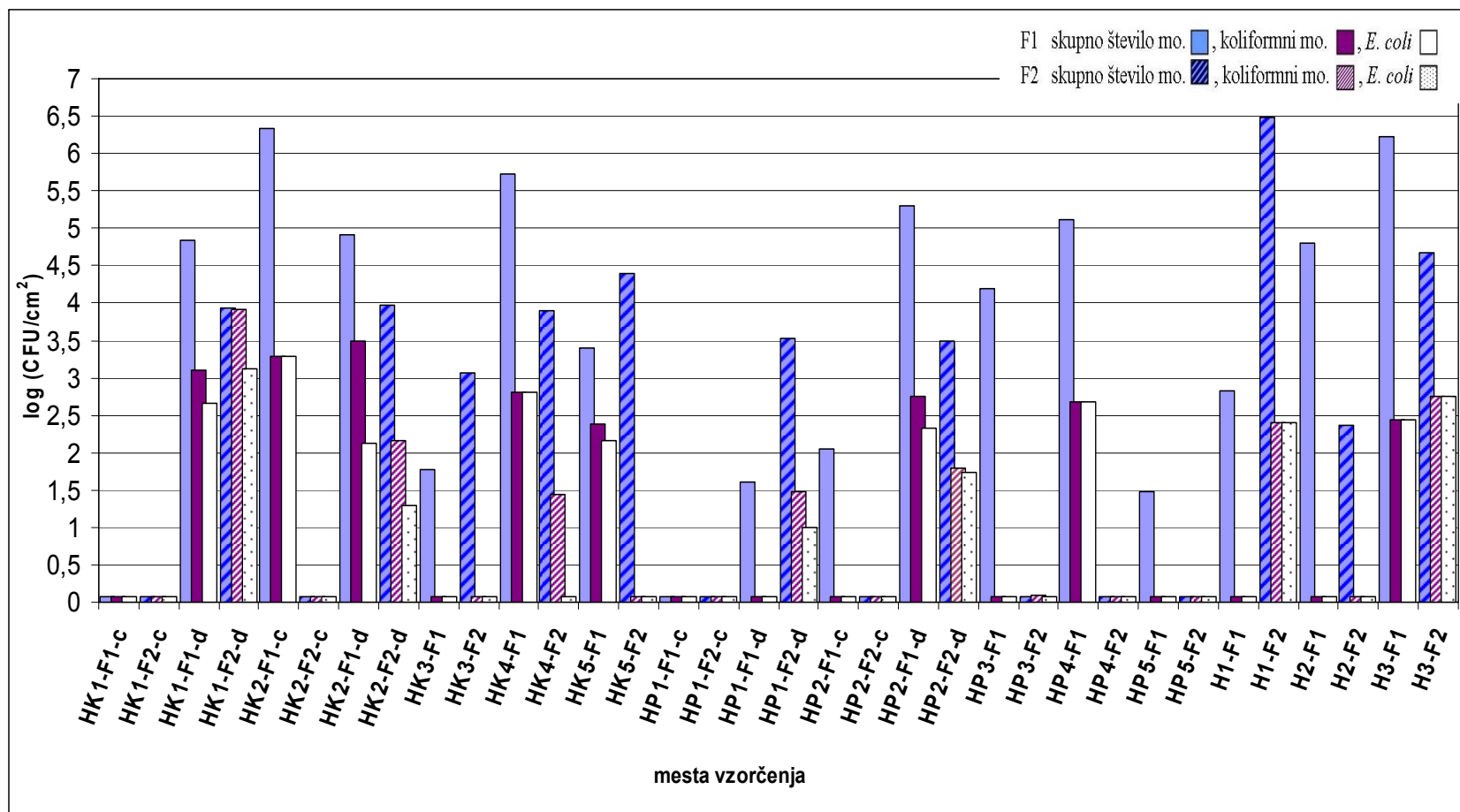
- Število koliformnih je bilo višje od 2,5 log CFU/cm² na umazanih rokavicah (HK1-F2-d) in na gobici za čiščenje (H3-F2).
- Koliformni in *E. coli* so bili prisotni v koncentraciji (< 2,5 log) na umazanem predpasniku klavnice HK2-F2-d in na umivalniku v klavnici (HK4-F2).



Slika 16: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov s številom koliformnih mikroorganizmov in *E. coli* v vzorcih brisov proizvodne linije v klavnici piščančjega mesa v podjetjih F1 in F2.



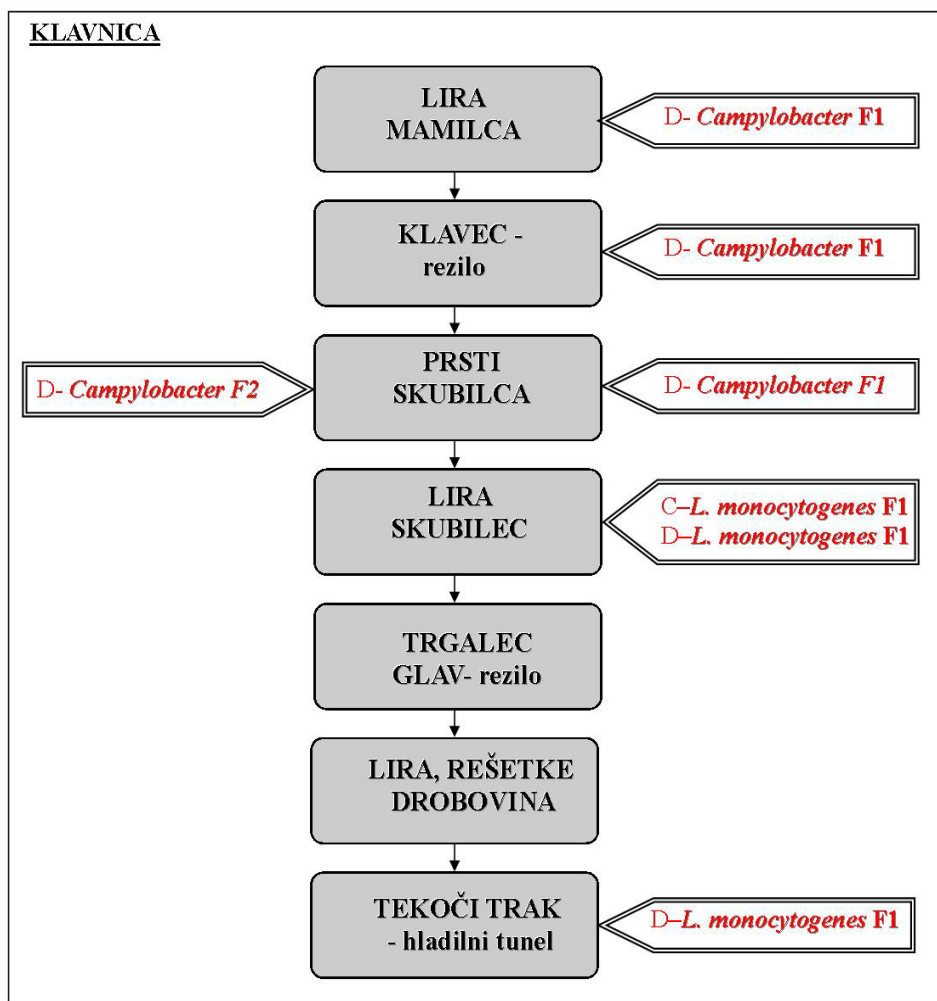
Slika 17: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov s številom koliformnih mikroorganizmov in *E. coli* v vzorcih brisov iz proizvodne linije pakirnice piščančjega mesa v podjetjih F1 in F2.



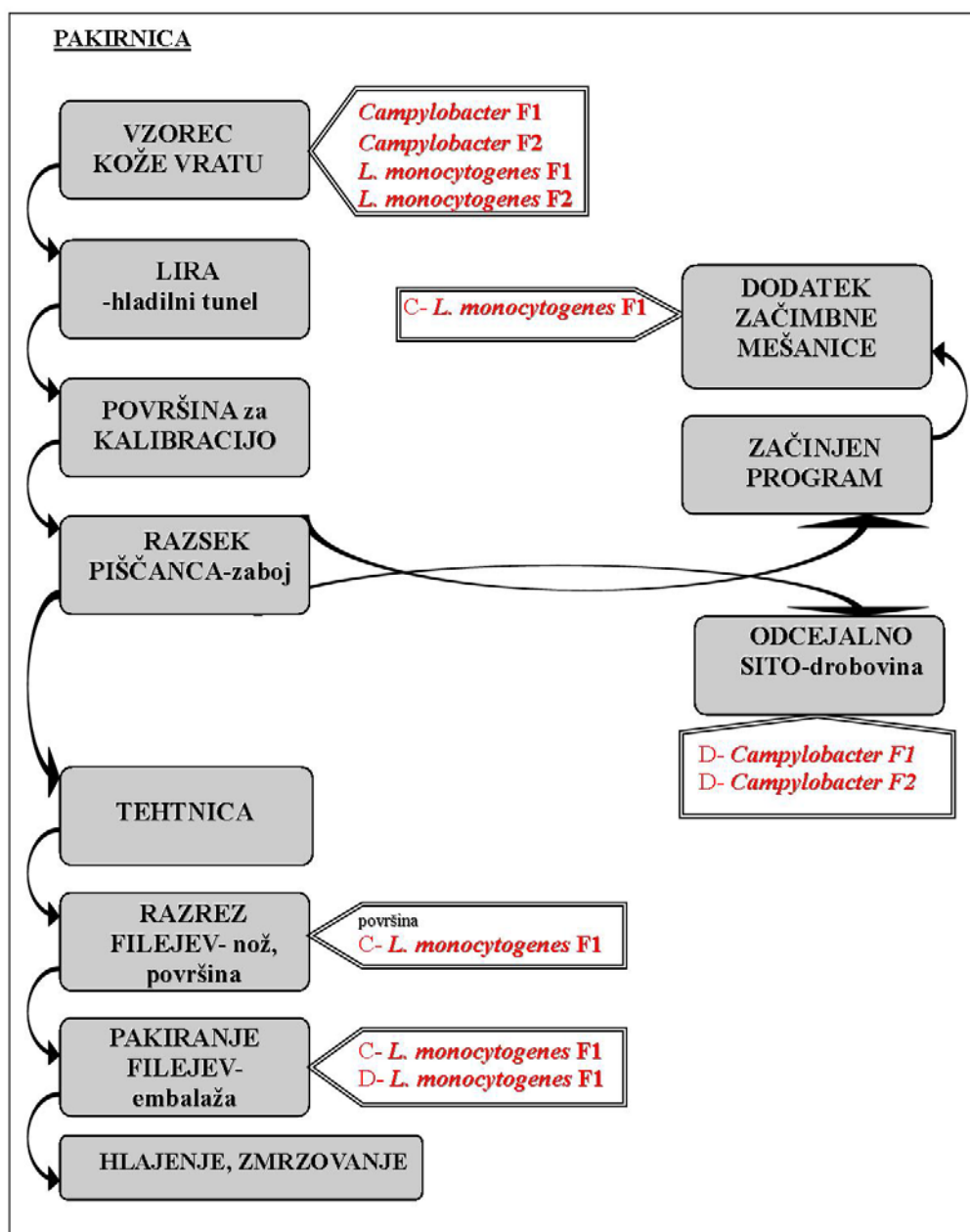
Slika 18: Primerjava skupnega števila mikroorganizmov s številom koliformnih mikroorganizmov in *E. coli* v vzorcih brisov iz proizvodnega okolja predelave piščančjega mesa v podjetjih F1 in F2.

4.3 PATOGENI MIKROORGANIZMI NA PROIZVODNI LINIJI

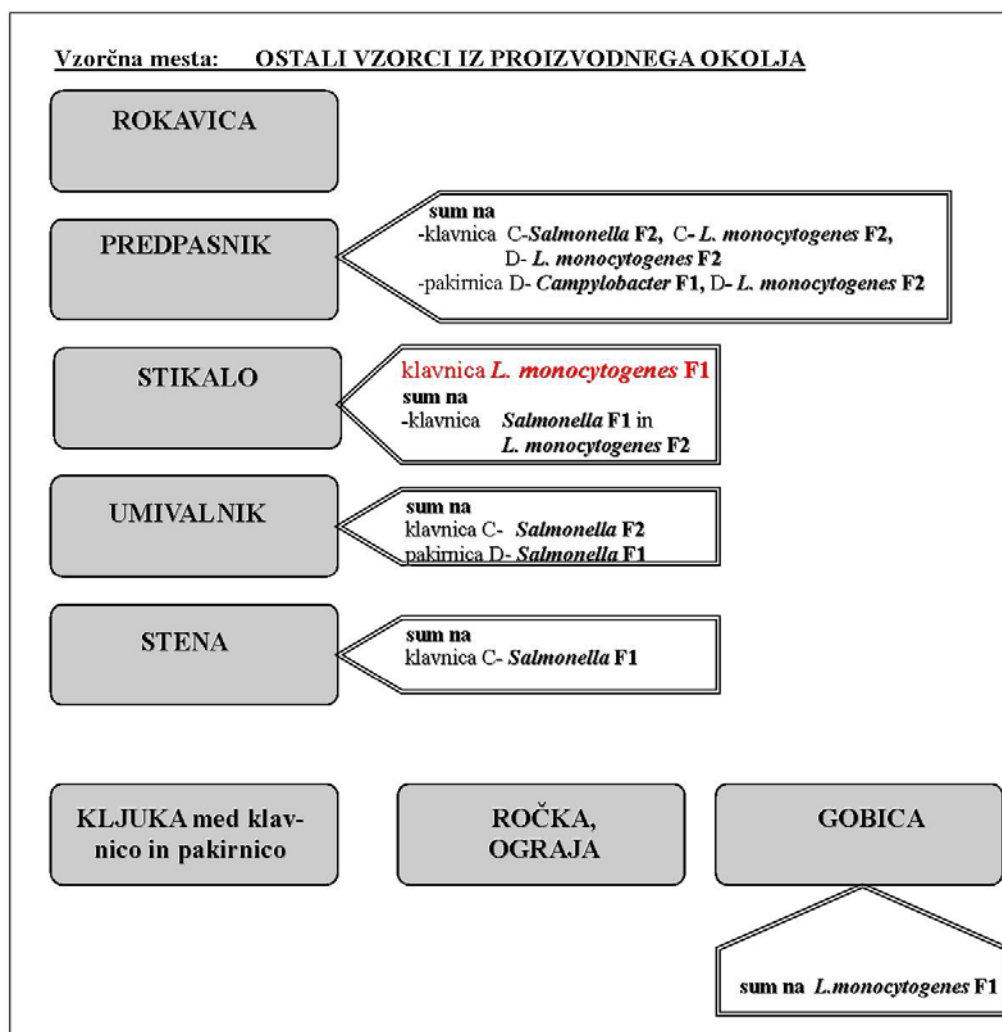
Na spodnjih procesnih shemah (slika 19, 20, 21) so razvidni pozitivni rezultati površin pakirnice in klavnice glede prisotnosti patogenih mikroorganizmov vrste: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* in *Campylobacter* spp. Pozitivni rezultati so bili potrjeni z obema metodama (klasična standardizirana preiskava na ploščah in PCR v realnem času). V primerih, ko so bili brisi potrjeni le z eno metodo, smo jih ocenili kot sumljive na prisotnost določene patogene bakterije.



Slika 19: Procesna shema klavnice z označenimi mesti vzorčenja, na katerih smo z obema metodama potrdili prisotne patogene mikroorganizme



Slika 20: Procesna shema pakirnice z označenimi mesti vzorčenja, na katerih smo z obema metodama potrdili prisotne patogene mikroorganizme



Slika 21: Shema vzorčnih mest prisotnih patogenih mikroorganizmov v vzorcih proizvodnega okolja

4.3.1 Ugotavljanje prisotnosti bakterij *Campylobacter* spp.

Kar 70 % izbranih vzorcev podjetja F1 je bilo pozitivnih na *Campylobacter* spp in 50 % iz podjetja F2. Devet od desetih vzorcev podjetja F2 pa je bilo pozitivnih s PCR metodo. V obeh proizvodnjah smo potrdili bakterijo v vzorcu kože iz piščančjega vratu. Potrdili smo jo tudi na umazanem mamilcu in klavcu proizvodnje F1, umazanem skubilcu (F1 in F2) in na umazanem odcejalnem situ za drobovino (F1 in F2). V pakirnici smo določili sum na bakterijo *Campylobacter* spp. na zaboju za ostanke razseka in na umazanem predpasniku pakirnice proizvodnje F1.

4.3.2 Ugotavljanje prisotnosti bakterij *Listeria monocytogenes*

Pregledali smo 51 vzorcev podjetja F1 in 59 vzorcev odvzetih z metodo brisov v podjetju F2. Za obe podjetji lahko potrdimo prisotnost mikroorganizmov vrste *Listeria monocytogenes*. Prisotnost te bakterije v brisih F1 je bila 17 %, v vzorcih obrata F2 pa le

3 %. Bakterijo smo z obema metodama potrdili v klavnici F1, v brisu lire skubilca in na tekočem traku, ki gre v hladilni tunel. V pakirnici smo potrdili *L. monocytogenes* na modelu za piščančja nabodala F1 in na površini za razrez piščančjih trupov. Detektirali smo jo tudi na čisti in že uporabljeni embalaži (F1). Bakterijo *Listeria monocytogenes* smo našli tudi na vzorcih kože piščančjega vratu. Izmed ostalih vzorcev iz proizvodnega okolja smo potrdili prisotnost *L. monocytogenes* samo na stikalu v klavnici (F1)

Sum na prisotnost bakterije *Listeria monocytogenes* (potrditev prisotnosti z eno od dveh uporabljenih metod):

V klavnici - na umazanem rezilu klavca F2,
 - na čistem vzorcu tekočega traku (potrjena v umazanem vzorcu) F1,
 - na umazanem tekočem traku F2.

V pakirnici - na čisti liri hladilnega tunela F2,
 - na čistem nožu in površini za razsek piščančjih trupov F2,
 - na čistem zaboju F1.

V vzorcih iz proizvodnega okolja

- na stikalu v klavnici (F2),
- v brisu umazanega predpasnik v klavnici (F1 in F2),
- v brisu predpasnika v pakirnici (F1),
- v brisu gobice za čiščenje površin (F1).

Prisotnost bakterij *Listeria monocytogenes* v klavnici smo odkrili na čisti in umazani liri skubilca. V brisu že uporabljenega tekočega traku hladilnega tunela podjetja F1 smo potrdili to bakterijo, z eno metodo pa smo jo potrdili tudi v čistem vzorcu. Sum na to bakterijo je bil tudi pri vzorcu klavca in umazanega tekočega traku v F2.

4.3.3 Ugotavljanje prisotnosti bakterij *Salmonella* spp.

51 vzorcev podjetja F1 in 55 vzorcev podjetja F2 je bilo testiranih na bakterije vrste *Salmonella* spp. Za noben obrat ne moremo z gotovostjo trditi, da je bila *Salmonella* prisotna, obstaja pa sum na prisotnost, ker smo v obratu F2 salmonele štirikrat ugotovili z metodo PCR, vendar je nismo uspeli potrditi s klasično metodo. V obratu F1 se je podobno zgodilo v enem primeru vzorca iz pakirnice.

4.4 TESTIRANJE PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI ČISTILNIH IN RAZKUŽILNIH SREDSTEV

4.4.1 Testiranje učinkovitosti inaktivacijske tekočine

Preglednica 11: Rezultati testiranja učinkovitosti inaktivacijske tekočine

Čistilo/ razkužilo	specifikacija/obrat	koncentracija testnega mikroorganizma (CFU/ml)
STERILIZIRANA PITNA VODA	voda	$2,5 \times 10^9$
T 99	razkužilo/F1	$3,1 \times 10^9$
TDS	razkužilo/F1	$2,5 \times 10^9$
N10	razkužilo/F2	$2,5 \times 10^9$
T19	bazično čistilo/F1	$2,4 \times 10^9$
T56	kislo čistilo/F1 in F2	$2,8 \times 10^9$
C10	kislo čistilo/razkužilo F2	$1,5 \times 10^8$
V10	bazično čistilo /F2	$6,0 \times 10^8$

Testiranje inaktivacijske tekočine smo opravili, tako, da smo bakterijsko suspenzijo izpostavili že inaktiviranemu razkužilu (čistilu) z inaktivacijsko tekočino. V primeru učinkovitega delovanja inaktivacijske tekočine, dodano razkužilo (čistilo) ni vplivalo na rast in razmnoževanje testnega mikroorganizma: *Staphylococcus aureus*. Prepričati smo se želeli tudi, da inaktivacijska tekočina sama, ne zaustavlja rasti testnih mikroorganizmov (poskus s sterilizirano pitno vodo). Rezultati poskusa s sterilno pitno vodo so pokazali, da inaktivacijska tekočina ne vpliva na rast in razmnoževanje testnega mikroorganizma *Staphylococcus aureus*. Inaktivacijska tekočina učinkovito inhibira delovanje razkužil: T99, TDS, N10 in čistilnih sredstev T19 in T56. Odstopanje smo ugotovili le pri čistilu C10 in čistilu V10, kar smo kasneje upoštevali pri obravnavi rezultatov (preglednica 11).

4.4.2 Rezultati testiranja protimikrobne aktivnosti čistil in razkužil

Preglednica 12: Primer označevanja rezultatov testov protimikrobne učinkovitosti čistil in razkužil

Razkužilo/ čistilno sredstvo	Uporabna koncentracija	Tip	Bakterija	ME
			<i>Campylobacter</i> spp.,	< 3log CFU/ml
			<i>Listeria monocytogenes</i> ,	>3 log CFU/ml
			<i>Salmonella</i> spp.	>5 log CFU/ml

Rezultati testiranja protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev so v enotah ME (poglavje 3.1.3.6). Rezultati so označeni zeleno, če v celoti ustrezajo zahtevam

standarda $> 5 \log \text{CFU/ml}$, z oranžno, če ne ustrezajo, a niso kritični in z rdečo, če kažejo slabo delovanje sredstva.

4.4.2.1 Rezultati suspenzijskega testa protimikrobne aktivnosti čistil in razkužil

Rezultati suspenzijskega testa so podani v preglednicah 13 in 14.

Preglednica 13: Rezultati suspenzijskega testa protimikrobne učinkovitosti razkužilnih sredstev (F1 in F2)

Razkužilo	Uporabna koncentracija	Tip	Bakterija	ME
T99	2%	Razkužilo	Campylobacter spp.	5,0
			Campylobacter spp. (P13-2-D-F2)	7,12
			Listeria monocytogenes	4,91
			Listeria monocytogenes (P9-2-C-F1)	4,45
			Listeria monocytogenes (GOBICA F2)	2,1
			Salmonella spp.	4,35
			Salmonella spp.	3,9
TDS	2%	Razkužilo	Campylobacter spp.	5,25
			Campylobacter spp. (K3-2-D-F2)	7,12
			Listeria monocytogenes	3,76
			Listeria monocytogenes (GOBICA F2)	3,0
			Listeria monocytogenes (Tehnološka voda)	4,45
			Salmonella spp.	6,06
			Salmonella spp. (P1-1-D-F2)	5,49
			Salmonella spp. (P5-1-D-F1)	3,2
N10	1%	Razkužilo	Campylobacter spp.	4,25
			Listeria monocytogenes	0,88
			Salmonella spp.	4,60
	2%		Campylobacter spp.	5,25
			Listeria monocytogenes	3,6
			Salmonella spp.	5,06

- Proti testnim mikroorganizmom *Campylobacter* so bila učinkovita vsa 3 razkužila; T99, TDS in N10- 2 %.

- Proti testnim mikroorganizmom vrste *Salmonella* sta bili učinkoviti razkužili N10 v 2 % koncentraciji in TDS.
- Proti testnim mikroorganizmov vrste *Listeria monocytogenes* nobeno od razkužil ni ustrezalo standardu.
- Rezultati so pokazali, da je povišanje koncentracije N10 (iz 1 % na 2 %) povišalo učinkovitost, med rezultati obeh koncentracij pa je razlika za vsaj eno ME enoto.

Preglednica 14: Rezultati suspenzijskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih sredstev (F1 in F2)

Detergent	Uporabna koncentracija	Tip	Bakterija	ME
T19	3 %	Bazično čistilno sredstvo	<i>Campylobacter</i> spp.	5,25
			<i>Listeria monocytogenes</i>	3,55
			<i>Salmonella</i> spp.	3,76
T56	3 %	Kislo čistilno sredstvo	<i>Campylobacter</i> spp.	3,24
			<i>Listeria monocytogenes</i>	1,68
			<i>Salmonella</i> spp.	5,17
C10	5 %	Kislo čistilno sredstvo /razkužilo	<i>Campylobacter</i> spp.	5,25
			<i>Listeria monocytogenes</i>	5,0
			<i>Salmonella</i> spp.	6,06
V10	5 %	Bazično čistilno sredstvo	<i>Campylobacter</i> spp.	5,25
			<i>Campylobacter</i> spp. (P13-2-D-F2)	7,12
			<i>Listeria monocytogenes</i>	3,47
			<i>Listeria monocytogenes</i> (P9-2-C-F1)	2,27
			<i>Listeria monocytogenes</i> (GOBICA F2)	3,29
			<i>Salmonella</i> spp.	3,96
			<i>Salmonella</i> spp. (P5-1-D-F1)	3,2
			<i>Salmonella</i> spp. (P1-1-D-F2)	1,49

- Kot najbolj učinkovito se je pokazalo čistilo C10, saj je koncentracijo testnih mikroorganizmov *Campylobacter*, *Salmonella* in *Listeria* znižalo za 5 enot ME.
- Proti testnim mikroorganizmom *Campylobacter* sta bili uspešni obe bazični čistili (T19, V10) in kislo čistilo ter razkužilo C10.
- Proti testnim mikroorganizmom vrste *Salmonella* sta bili učinkoviti kisli čistilni sredstvi C10 in T56.
- Proti testnim mikroorganizmom vrste *Listeria monocytogenes* ni bilo učinkovito nobeno od razkužil.

4.4.2.1 Rezultati površinskega testa protimikrobne aktivnosti čistil in razkužil

Površinski test je bil narejen po navodilih kot je opisano v metodiki (poglavje 3.4.5).

Preglednica 15: Rezultati površinskega testa protimikrobne učinkovitosti razkužilnih sredstev (F1 in F2)

Razkužilo	Uporabna koncentracija	Tip	Bakterija	ME
T99	2 %	Razkužilo	Campylobacter spp.	4,88
			Listeria monocytogenes	5,70
			Listeria monocytogenes (Teh. voda F1)	4,56
			Salmonella spp.	5,75
			Salmonella spp. (Teh. voda F1)	10,48
TDS	2 %	Razkužilo	Campylobacter spp.	4,88
			Listeria monocytogenes (Teh.voda F1)	0,22
			Listeria monocytogenes	4,70
			Salmonella spp.	5,75
			Salmonella spp. (Teh. voda F1)	8,94
N10	1 %	Razkužilo	Campylobacter spp.	4,48
			Listeria monocytogenes	1,69
			Salmonella spp.	0,88
	2 %		Campylobacter spp.	4,78
			Listeria monocytogenes	4,4
			Salmonella spp.	1,47

- Najbolj je bilo učinkovito razkužilo T99, ki je znižalo koncentracijo vseh 3 testnih mikroorganizmov (*Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*) za > 4,5 log enot.
- Najslabše se je obneslo razkužilo N10 v 1 % in 2 % koncentraciji.
- Proti testnim mikroorganizmom vrste *Salmonella* sta bili učinkoviti razkužili TDS in T99.
- Nobeno od izbranih razkužil ni popolnoma ustrezalo standardom površinskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih in razkužilnih sredstev.

Preglednica 16: Rezultati površinskega testa protimikrobne učinkovitosti čistilnih sredstev (F1 in F2)

ČISTILO	Uporabna koncentracija	Tip	Bakterija	ME
T19	3 %	Bazično čistilno sredstvo	<i>Campylobacter</i> spp.	5,78
			<i>Listeria monocytogenes</i>	1,71
			<i>Listeria monocytogenes</i> (Teh. voda F1)	3,11
			<i>Salmonella</i> spp.	5,86
			<i>Salmonella</i> spp. (Teh. voda F1)	7,36
T56	3 %	Kislo čistilno sredstvo	<i>Campylobacter</i> spp.	2,38
			<i>Listeria monocytogenes</i> (Teh. voda F1)	0,76
			<i>Listeria monocytogenes</i>	1,71
			<i>Salmonella</i> spp. (P1-1D-F2)	6,37
			<i>Salmonella</i> spp. (Teh. voda F1)	7,36
			<i>Salmonella</i> spp.	5,75
C10	5 %	Kislo čistilno sredstvo /razkužilo	<i>Campylobacter</i> spp.	5,78
			<i>Listeria monocytogenes</i>	5,70
			<i>Salmonella</i> spp.	5,75
			<i>Salmonella</i> spp. (P1-1D-F2)	6,37
V10	5 %	Bazično čistilno sredstvo	<i>Campylobacter</i> spp.	5,78
			<i>Listeria monocytogenes</i>	5,70
			<i>Salmonella</i> spp.	5,75
			<i>Salmonella</i> spp. (P1-1D-F2)	6,37

- Čistili C10 in V10 glede na zbrane rezultate v celoti ustrezali standardu in znižali koncentracijo vseh 3 testnih mikroorganizmov (*Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*) za vsaj 5 ME enot.
- Proti testnim mikroorganizmom *Campylobacter* sta bili učinkoviti obe bazični čistilni sredstvi (T19 in V10) ter kislo čistilo C10.
- Proti testnim mikroorganizmom vrste *Salmonella* so bila učinkovita vsa 4 čistila (T19, T56, C10 in V10).
- Proti testnim mikroorganizmom vrste *Listeria monocytogenes* sta ustrezali standardu čistili C10 in V10.

5 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo želeli podati oceno učinkovitosti sanitacijskih postopkov in čistilnih sredstev v klavnici in pakirnici perutnine. V vzorcih smo določali tudi patogene mikroorganizme in potrdili prisotnost *Campylobacter spp.* in *Listeria monocytogenes* v vzorcih. Nekaj rezultatov je izkazovalo sum na prisotnost bakterije *Salmonella spp.* vendar prisotnost le te ni bila potrjena z obema uporabljenima metodama.

5.1 DOLOČITEV VZORČNIH MEST

Vzorčna mesta smo določili po pregledu obeh predelovalnih obratov piščančjega mesa (F1 in F2). Uporabili smo že ovrednotene kritične točke in kritične kontrolne točke sistema HACCP. Določili smo tudi vzorce proizvodnega okolja, ki sestavljajo del opreme delavca (rokavice, predpasnik) ali se jih delavci dotikajo (umivalnik, stikalo, kljuka, ročka in gobica). Ugotovili smo, da so bila določena vzorčna mesta primerno izbrana. Za vodje proizvodnje in načrtovalce sistema HACCP so bile najbolj zanimive izbrane KT in KKT. Zanimivi pa so tudi rezultati površin proizvodnega okolja, ki so del opreme delavca, se jih delavec dotika, niso pa v neposrednem stiku z živilom.

5.2 UGOTAVLJANJE SKUPNEGA ŠTEVILA MIKROORGANIZMOV, KOLIFORMNIH M.O. IN BAKTERIJE *E. coli*

Najprej nas je zanimalo koliko mikroorganizmov vsebuje posamezna površina mesta vzorčenja. Naši rezultati so pokazali večjo snaznost površin v proizvodnji F2 kot v proizvodnji F1. Iz grafov je razvidna velika razlika med obratoma, tako v klavnici kot v pakirnici in v ostalih vzorcih proizvodnega okolja (slika 16, 17, 18). Če gledamo iz tehničnega stališča je proizvodnja F1 novejša in bolje organizirana po pravilih DDP (hitrejši pretok proizvodov, manj transporta, manj mrtvih kotov) in bi glede na to morala pokazati nižjo mikrobiološko onesnaženost. Eden od vzrokov za tako velika odstopanja je, da vzorčenja ni izvajala ista oseba. Pri rutinski analizi je smiselno, da odvzem brisov vedno opravi ista oseba in na isti točki. Količina mikroorganizmov, ki ostanejo na vateni palčki, je namreč lahko odvisna od pobrisane površine in pritiska vatenke na površino. Za lažjo in bolj natančno rutinsko analizo bi predlagala kromogene lističe, ki jih odtisnemo na površino in nato bakterije kultiviramo na isti podlagi ter se tako izognemo morebitnim razlikam med vzorčenji. Druga možnost pa je, da se v obratu F1 in izvaja manj učinkovita sanitacija. Literaturni podatki navajajo, da se s samim čiščenjem odstrani 10^5 CFU/ml, s čiščenjem in razkuževanjem pa 10^8 CFU/ml (Reuter, 1998).

Klavnica

Umazane površine klavnice F1 so vsebovale $> 4,5$ CFU/cm². V klavnici F1 je bilo skupno število mikroorganizmov v vseh vzorcih umazanih površin višje od $4,5 \log$ CFU/cm². Koliformni so bili prisotni tudi na domnevno očiščenih prstih skubilca (K3). V klavnici F2

je bilo SŠM samo na liri in na gumijastih prstih skubilca (K4) višje od 4 log stopenj. Pričakovali smo višje SŠM in prisotnih koliformnih mikroorganizmov predvsem na gumijastih prstih skubilca in na trgalcu vratov. Med skubljenjem perja največkrat pride do kontaminacije trupov zaradi iztekanja fekalnih snovi iz spodnjega dela črevesa (Berrang in Northcutt, 2006) in pri trgalcu glav zaradi odstranjevanja zgornjega dela prebavil (vratu).

Pakirnica

Pakirnica je čistejši del proizvodnje in naj bi vsebovala nižje število mikroorganizmov kot klavnica (Savić, 2003). To se lepo vidi tudi na naših grafično prikazanih rezultatih (slika 16 in 17). K znižanju skupnega števila in koliformnih mikroorganizmov na piščančjih trupih ima velik vpliv hlajenje (Huezo in sod., 2007). Po klanju gredo namreč piščančji trupi v hladilni tunel. Kljub temu je nekaj izjem, ki ne potrjujejo dejstva, da hlajenje znižuje število mikroorganizmov. Na čisti in umazani liri iz hladilnega tunela (P1-F1) smo ugotovili $>10^6$ SŠM. Koliformnih je bilo $< 2,0$ log enot CFU/cm². V pakirnici F2 so bili mikroorganizmi prisotni samo na umazani liri in nismo detektirali koliformnih organizmov. Veliko število v obeh pakirnicah je na čistih in umazanih nožih (P5). Detektirali smo prisotnost koliformnih mikroorganizmov v obeh pakirnicah, skupno število mikroorganizmov pa je bilo višje od 4,5 log enot CFU/cm². Površine za razsek (P6) so bile temeljiteje očiščene od nožev. Zaskrbljujoče je tudi število mikroorganizmov na uporabljeni embalaži s proizvodom (P7). Embalaža je v obeh pakirnicah vsebovala $> 4,5$ log enot CFU/cm² SŠM in koliformnih. Detektirali smo tudi veliko število *E.coli*. Po standardu mora biti *E.coli* odsotna na surovinah (LFMFP, Univerza v Ghentu, Belgija). Zelo primerljivo stanje smo dobili tudi pri preiskavi piščančjih vratov.

Vzorci proizvodnega okolja

Poleg površin, ki pridejo v direktni stik s piščančjim trupom na proizvodni liniji, nas je zanimalo tudi, koliko mikroorganizmov vsebujejo površine, ki se jih delavci dotikajo, vendar niso v direktnem stiku z živilom (stikalo, umivalnik, stena, kljuka, higienska postaja za dezinfekcijo rok, gobica) ali pa so del zaščitne obleke delavca (predpasnik, rokavice). Rezultati površin v indirektnem stiku s samim trupom so zanimivi, ker smo v obeh obratih našli prisotne mikroorganizme (SŠM), medtem ko koliformnih ali *E. coli* nismo detektirali. To velja za stikala, steno v pakirnici, ograjo higienske postaje za razkuževanje rok (F1), kljuko med klavnico in pakirnico (F1) ter gobico. Pri umivalnikih smo v klavnici detektirali tudi koliformne mikroorganizme, prav tako na steni v klavnici (F1). Umivalniki so pomemben del proizvodnje, saj z umivanjem rok ne prenašamo mikroorganizmov iz klavnice v pakirnico ali v druge dele proizvodnega obrata. Gobica je bila za nas še posebej zanimiva, ker jo uporabljajo za grobo odstranjevanje nečistoč iz površin in je lahko vzrok navzkrižne kontaminacije z mikroorganizmi prejšnjega dneva. Na gobici se namreč lahko zadržujejo mikroorganizmi in vsebuje dovolj vlage in hranil za morebitno razmnoževanje.

Odvzeli smo tudi vzorce zaščitnih oblek delavcev in rokavic. Naredila sem primerjavo med čistimi in umazanimi rokavicami ter čistimi in umazanimi predpasniki. Pričakovano se vidi razlika med obema sistemoma. Oba obrata uporabljata rokavice za enkratno uporabo in v obeh obratih smo našli na uporabljenih rokavicah v klavnici 10^5 CFU/ml mikroorganizmov, od tega koliformnih 10^3 - 10^4 CFU/ml, v pakirnici pa smo v brisih

rokavic našli le 10^3 - 10^4 CFU/ml. Čiste rokavice pričakovano niso vsebovale mikroorganizmov. Predpasniki so pokazali drugačno sliko. F1 uporablja pralne predpasnike, ki nudijo tudi zaščito pred morebitnimi nesrečami z ostrimi predmeti, medtem ko v F2 nosijo čez plastične predpasnike, ki jih na koncu dneva odvržejo. Čisti predpasniki pred začetkom dela iz obrata F1 so vsebovali 10^6 - 10^7 CFU/ml skupnih mikroorganizmov, od tega je bilo 10^4 CFU/ml koliformnih.

Na podlagi naših rezultatov je težko oceniti stanje v obeh proizvodnjah. Za bolj natančno oceno čistosti bi bilo smiselno spremljati točno določene točke vsaj 3 mesece v letu, 3 dni v mesecu, 3 krat dnevno, kot so to storili v raziskavi Jacxsens in sodelavci v obratu predelave svinjskega mesa (2009).

5.3 PATOGENI MIKROORGANIZMI NA PROIZVODNI LINIJI

V tem poglavju nas je zanimala prisotnost patogenov (*Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.) v vzorcih odvzetih iz delovnih površin, v proizvodnem okolju in v vzorcih kože vratu. Vzorce smo pregledovali po klasični metodi z ISO standardi in po metodi PCR v realnem času (BioRad IQ-Check, ZDA). V skladu z uredbo EU 2073/2005, morajo biti *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* in *Salmonella*, odsotni v 25 g vzorca živila oz. odsotni na testnem območju (100 cm^2). Preiskava identifikacije patogenih bakterij je potrdila prisotnost bakterijske vrste *Listeria monocytogenes* in *Campylobacter* spp. Obe vrsti smo potrdili z obema metodama in v obeh proizvodnjah (F1 in F2). Bakterije vrste *Salmonella* spp. nismo potrdili z obema metodama.

5.3.1 Ugotavljanje prisotnosti bakterij *Campylobacter* spp.

V treh zaporednih vzorcih iz klavnice F1 (bris lire, nož klavca, prsti skubilca) smo na koži piščančjega vratu in v vzorcu tehnološke vode smo identificirali in potrdili bakterijo *Campylobacter* spp. V kasnejšem poteku proizvodnje smo jo detektirali še v brisu odcejalnega sita za drobovino in na zaboju za uporabne kose po razseku piščanca ter v brisu umazanega predpasnika. V proizvodnem obratu F2 smo *Campylobacter* našli v vzorcu kože z vratov piščancev, na umazanih prstih skubilca in v umazanem vzorcu odcejalnega sita za drobovino. Iz danih podatkov lahko predvidevamo prisotnost te bakterijske vrste vzdolž celotne procesne linije, vendar so zaradi omejitve 20 vzorcev za oba obrata rezultati okrnjeni in nam ne pokažejo celotne slike. V obeh obratih smo namreč našli *Campylobacter* spp. na vzorcih kože piščančjih vratov, kar kaže na to, da je vnos tega mikroorganizma reden. Pri sevih *Campylobacter* spp. smo zaradi omejitve preiskave na 20 vzorcev, pri evalvaciji rezultatov, le sklepali na prisotnost te bakterije vzdolž cele procesne linije. V Franciji je Peyrat s sodelavci (2008) preiskoval podoben primer. Primerjali so količino bakterij *Campylobacter jejuni* izoliranih v klavnici iz umazanih površin, s številom bakterij izoliranih iz čistih in razkuženih površin. Izmed 41 odvzetih vzorcev iz umazanih površin so v 30 vzorcih izolirali *C. jejuni*. Na čistih in razkuženih površinah pa so našli 9 pozitivnih vzorcev izmed 51 odvzetih. S sanitacijskimi postopki so v preiskovanem obratu sicer znižali količino patogenega mikroorganizma za 55 %, vendar to pri povzročiteljih okužb ni dovolj. Očiščene, razkužene in osušene površine ne bi smele vsebovati patogenih mikroorganizmov. Na sliki 19 in 20 vidimo, da smo detektirali vse

izbrane patogene na očiščenih površinah vzdolž cele proizvodne linije. Splošno velja *Campylobacter* za dokaj občutljivo mikroaerofilno bakterijo, ki jo zlahka odstranimo z običajnimi čistili in razkužili, ki se uporabljajo v domačem gospodinjstvu (Cogan in sod., 1999) in v živilski industriji. Tudi v našem primeru smo te bakterije našli le na umazanih površinah, izjema je le plastičen zaboj za shranjevanje odpadnih kosov piščanca (P3).

5.3.2 Ugotavljanje prisotnosti bakterij *Listeria monocytogenes*

Pregledali smo 51 vzorcev iz podjetja F1 in 59 vzorcev iz podjetja F2. *L. monocytogenes* smo identificirali po tradicionalni metodi in potrdili s PCR v realnem času ter dodatnimi testi. Sevi *Listeria monocytogenes* so ubikvitarni in izredno prilagodljivi na okoljske spremembe in so zato trdovratni za odstranjevanje iz proizvodnje linije. Iz proizvodnega okolja jo odstranimo šele s temeljitim čiščenjem in močnimi čistilnimi sredstvi (Maukonen, 2003). Običajno čiščenje in razkuževanje je pogosto ne odstrani popolnoma. Po naših rezultatih je predvsem problematična v pakirnici, kjer jo najdemo na rezalnih deskah, strojih za predelavo, nožih in čistilnih pripomočkih. Torej je posledično pogostejše navzoča v perutninskih produktih kot so piščančja prsa, file, nabodala, mletu meso itd. (Mahmood in sod., 2003). Pomembno je, da so našli *Listeria* spp., dnevno na površinah tudi takrat, ko je niso detektirali na celih piščancih. To nam pove, da je ostala na procesni liniji kljub čiščenju in razkuževanju in da ima velik potencial preživetja na proizvodni liniji. Mikroorganizmi *Listeria* spp. so se sposobni pritrditi na površine v industrijskem obratu v minimalnem času 20 minut in tvoriti multicelični biofilm, ki je odporen pred sanitacijo in povzroča kontaminacijo produktov (Moesteller in Bishop, 1993).

5.3.3 Ugotavljanje prisotnosti bakterij *Salmonella* spp.

51 vzorcev podjetja F1 in 55 vzorcev podjetja F2 je bilo testiranih na bakterijsko vrsto *Salmonella* spp. V nobeni proizvodnji ne moremo z gotovostjo trditi, da je bila *Salmonella* prisotna, saj noben vzorec ni bil pozitiven po obeh uporabljenih metodah. Kljub temu pa je bil test na bakterije *Salmonella* 4x pozitiven v proizvodnji F2 z metodo PCR v realnem času, v obratu F1 pa samo v enem primeru v pakirnici.

5.4 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST ČISTILNIH IN RAZKUŽILNIH SREDSTEV

Prisotnost patogenih mikroorganizmov na očiščenih in suhih površinah (po sliki 19, 20), kaže na starejšo okužbo in nezadovoljiv plan čiščenja ali pa neučinkovita sanitacijska sredstva. Ker sklepamo, da imata oba obrata dobro načrtovane postopke čiščenja in sanitacije, smo se osredotočili na učinkovitost čistilnih in razkužilnih sredstev. Rezultati so pokazali, da nobeno od čistil ne ustreza standardu pri vseh treh testnih mikroorganizmih (*Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.).

Uporabljeni metodi, standardni suspenzijski test (EN 1276: 1997) in površinski test (Charaf, 2000), sta se v praksi izkazali kot zelo slabo primerljivi. V nasprotju s predvidevanji so bila čistilna ter razkužilna sredstva bolj učinkovita v površinskem testu,

kot pri suspenzijskem testu. Po obeh testih je bilo najbolj uspešno čistilo C10, ki je kislo čistilo in razkužilo hkrati. Domnevni vzroki za tako veliko uspešnost čistil C10 in V10 lahko izvirajo iz nepopolne inhibicije čistil inaktivacijske tekočine (preglednica 11). To se je pokazalo pri površinskem testu pa tudi delno pri suspenzijskem testu.

Enote za oceno učinkovitosti sanitacijskih sredstev se podajajo v ME enotah (3). Pri evalvaciji pa sem prišla do zaključka, da ME število ni najboljša enota za oceno učinkovitosti čistilnih sredstev, ker se število kolonij mikroorganizmov tekom raziskave spreminja. Naprimer, če je začetno število kolonij nižje od zahtevanih 7 log enot, kar se pogosto zgodi pri površinskem testu, kjer gojimo mikroorganizme na kupončkih iz jekla. Drug primer je, če mikroorganizem slabše raste v mediju, kar se pogosto dogaja pri vrsti *Campylobacter* spp. avtomatično slabše ovrednotimo tudi razkužilo. Tako rezultat ne odraža realne slike pri evalvaciji rezultatov.

5.4.1 *Campylobacter* spp.

V suspenzijskem testu so se proti vrsti *Campylobacter* dobro obnesla vsa čistila, razen kislo čistilo T56 in N10 v 1 % raztopini. Površinski test je pokazal slabšo učinkovitost čistil proti vrsti *Campylobacter*. Razkužili N10 (kislo čistilo s HCl) in TDS (kislo razkužilo s perocetno kislino) nista znižali števila bakterij vrste *Campylobacter* za > 5 log CFU/ml in zato ne ustrezata standardu. Prav tako ne ustreza kislo čistilo T56. Naši rezultati obeh testov so pokazali, da se izbrana bazična čistila in razkužila (T99, T19, V10) bolje obnesejo pri odstranjevanju vrste *Campylobacter* spp. Kar je v nasprotju s trditvami Rieman in njegovih sodelavcev (2006). Trdijo namreč, da so psihrotrofi (*L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophilia* itd.) in izjema *Campylobacter* spp., bolj odporni na bazična čistila. Za odstranjevanje kvarljivcev in patogenih mikroorganizmov na proizvodni liniji, pa svetujejo kombinacijo kislih in bazičnih čistil (Rieman in sod., 2006). Suspenzijski test je pokazal relativno dobro učinkovitost razkužil proti sevom *Campylobacter* iz zbirke ter proti izoliranim sevom iz preiskovanih perutninskih obratov.

5.4.2 *Listeria monocytogenes*

Prav tako Riemanovih trditev nismo potrdili v primeru testnega mikroorganizma *Listeria monocytogenes*. Po suspenzijskem testu protimikrobne učinkovitosti se nobeno od izbranih čistil in razkužil, ni dobro obneslo proti vrsti *Listeria monocytogenes*. Površinski test je pokazal uspešnost kislega penečega čistila C10 in bazičnega čistila V10. Po podatkih ICMSF je *L. monocytogenes* veliko bolj odporna na razkužila na suhih površinah v primerjavi z mokrimi. Uspešnejša čistila v boju z *L. monocytogenes* so čistila, ki vsebujejo natrijev hipoklorit (200 ppm), jodid, peroksid ali KAS (ICMSF, 1996). Samo razkužilo TDS je vsebovalo navedeno sestavino – vodikov peroksid. Po naših rezultatih se TDS ni izkazal učinkovitejši pri odstranjevanju bakterij vrste *L. monocytogenes*.

5.4.3 *Salmonella* spp.

Suspenzijski test je pokazal slabšo sliko razkužila T99 z aktivnim kloridom in bazičnih čistil z natrijevim hidroksidom (T19, V10) proti vrsti *Salmonella*. Površinski test je pokazal dobro učinkovitost izbranih čistil proti bakterijam *Salmonella*. Edino čistilo, ki ni ustrezalo standardu v obeh koncentracijah je bilo čistilo N10 v 1 % koncentraciji, ki je predvidena po navodilih proizvajalca. 2 % koncentracija razkužila je v suspenzijskem testu znižala število testnih mikroorganizmov *Salmonella* za > 5 log enot.

Razkužila so bila najbolj uspešna proti sevu *Campylobacter* spp. in najmanj proti vrsti *Listeria monocytogenes*. Incidenca s patogeno listerijo je redkejša od kampilobaktra, vendar je bolj trdovratna za odstranjevanje. Zelo redka čistila so uspešna pri odstranjevanju *L. monocytogenes*, predvsem zaradi hitre tvorbe biofilma na površinah (Wirtanen, 1995). Zelo malo je znanega o odpornosti vrst *Campylobacter jejuni* in *C. coli* na čistila in razkužila. Optimalna temperatura termotolerantnih vrst *Campylobacter* spp. je 42 °C in znano je, da ne raste v razmerah klavnice, pakirnice ali hladilnice (min T je 32 °C). Vzdrževanje nizkih temperatur škoduje bakterijski vrsti *Campylobacter*, v primerjavi z bakterijami *Listeria monocytogenes*, ki preživi tudi temperature hlajenja in počasnega zmrzovanja (Mahmood in sod., 2003). *Salmonella* prav tako preživi temperaturo hladilnika.

Po podatkih preiskave 18 razkužil (Taylor in sod., 1999) se je glede na sestavine testiranih čistil v našem delu najbolje obneslo čistilo na osnovi perocetne kisline v kombinaciji s vodikovim peroksidom (TDS). Pomankljivost tega čistila je, da se ne priporoča redna uporaba zaradi razvitja odpornosti bakterij na razkužilo in zaradi korozivnosti. Njegove prednosti pa so netoksičnost in razgradljivost (preglednica 5). Kvarterne amonijeve spojine so dokazano manj učinkovite proti G negativnim bakterijam (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *E. coli*), kar je potrdil tudi Taylor s sodelavci (1999) po standardu EN 1276: 1997 na treh preiskanih razkužilih. Uspešnejša so bila razkužila, ki so vsebovala kombinacijo KAS z amfoternimi spojinami. Kvarterne spojine so delovale uspešneje pri temperaturi 20 °C kot pri 10 °C. N10 vsebuje bigvanid (poliheksametilendigvanid hidroklorid). Bigvanid se je slabo odrezal v majhni koncentraciji (0,5-1,0 %) in v prisotnosti serumskega albumina 0,3 ut. (prisotnost ostankov, ki lahko moti razkužilo). Uspešen pa je bil v kombinaciji s KAS. Podobno je pokazal naš poskus. 1 % koncentracija razkužila N10 je bila relativno neuspešna, s povišanjem koncentracije na 2 % pa se je učinkovitost povprečno povišala v suspenzijskem testu za 2 ME enoti. Razkužilo po površinskem testu še zmeraj pri nobenem testnem mikroorganizmu ni ustrezalo standardu. Pri suspenzijskem testu (2 %) je razkužilo uspešno znižalo mikroorganizme vrste *Campylobacter* spp. in *Salmonella* spp. Vsekakor bi bilo zanimivo preveriti, kakšna je optimalna baktericidna koncentracija čistilnega sredstva za uničenje najpogostejših patogenih mikroorganizmov izoliranih iz industrije.

6 SKLEPI

Iz rezultatov diplomske naloge smo prišli do naslednjih sklepov:

- Rezultati identifikacije patogenih mikroorganizmov so potrdili prisotnost dveh preiskovanih patogenih bakterij *Campylobacter* spp. in *Listeria monocytogenes* na umazanih, pa tudi domnevno čistih in razkuženih površinah preiskovanih klavnic in pakirnic piščančjega mesa.
- V nekaterih primerih smo ugotovili preveliko koncentracijo indikatorskih mikroorganizmov in/ali prisotnost patogenih vrst *Listeria monocytogenes* in *Campylobacter* spp. na že znanih kontrolnih točkah proizvodnje, pa tudi v brisih nekaterih drugih površin iz proizvodnega okolja (naprimer električno stikalo na steni in umivalnik v klavnici).
- Glede na pridobljene rezultate testiranja učinkovitosti uporabljenih čistil in razkužil se je njihova protimikrobna učinkovitost razlikovala, nobeno sredstvo pa ni v celoti ustrezalo zahtevam površinskega testa protimikrobne učinkovitosti (Charaf, 2000) in standardnega suspenzijskega testa (EN 1276, 1997).
- Predlagana rešitev je zamenjava manj učinkovitih čistilnih in razkužilnih sredstev in optimizacija postopka čiščenja.

7 POVZETEK

Vpeljava dobre proizvodne prakse (DPP) in sistema HACCP, izboljšanje opreme, ki je lažja za čiščenje in vzdrževanje, ter dober prezračevalni sistem ni odpravil možnosti okužbe s patogenimi mikroorganizmi v perutninsko predelovalnih industrijskih obratih. Sicer je znižal možnosti okužbe z nekaterimi mezofilnimi mikroorganizmi (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*), vendar v ospredje prihajajo zastrupitve s psihrotrofnimi mikroorganizmi, kot so *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* in *Aeromonas hydrophilia* (Rieman, 2006).

Diplomska naloga je nastala kot rezultat sodelovanja v evropskem raziskovalnem projektu in s slovensko industrijo. Na podlagi obstoječega sistema HACCP smo določili točke vzorčenja in dodali točke vzorčenja iz proizvodnega okolja ter končnega izdelka. Z metodo brisov smo vzorčili očiščene in razkužene površine pred začetkom proizvodnje ter umazane površine med potekom proizvodnje. Po standardnem postopku smo aseptično odvzeli brise površin in vzorce kože z vratu piščancev. V brisih smo najprej določali skupno število mikroorganizmov in koliformne mikroorganizme ter *E. coli*. Rezultati so pokazali razlike v higieni med obema obratoma. Skupno število mikroorganizmov ter prisotnost koliformnih mikroorganizmov ter *E. coli* tudi na čistih suhih površinah so nam nakazovali, kje je bilo čiščenje pomanjkljivo.

Vzorce smo testirali tudi na prisotnost treh patogenih bakterij rodu: *Salmonella* in *Campylobacter* ter vrste *Listeria monocytogenes*. Prav ti trije mikroorganizmi so pogosti onesnaževalci perutninskega obrata in predstavljajo večje potencialno tveganje za zdravje potrošnika kot ostala mikrobna združba. Mikroorganizme smo detektirali po standardni metodi in potrdili s tehniko PCR v realnem času. Prisotnost sevov bakterij *Campylobacter* in *Listeria monocytogenes* smo potrdili po obeh metodah na čistih in umazanih površinah. *Salmonella* pa ni bila potrjena z obema metodama v nobenem obratu.

Izolirane seve smo shranili in jih nadalje uporabili za testiranje čistilnih in razkužilnih sredstev. Uspešnost čistilnih in razkužilnih sredstev smo preverili s standardnim testom v tekočini (EN 1276, 1997) in testom protimikrobne učinkovitosti čistilnih sredstev proti bakterijam pritrdjenim na površino (Charaf, 2000). Nobeno od čistil po naših rezultatih ni v celoti ustrezalo standardu (znižanje koncentracije CFU/cm² za > 5 log enot). V nasprotju s pričakovanji so bila čistila v površinskem testu učinkovitejša kot pri suspenzijskem testu. Razkužila so bila najbolj uspešna proti vrsti *Campylobacter* in najmanj proti vrsti *Listeria monocytogenes*. Med čistili je bil po pričakovanju najbolj uspešen C10, ki je kislo čistilo in razkužilo hkrati. Oba testa sta pokazala uspešnost kislih čistil (C10 in T56) in razkužila TDS (peroksid in perocetna kislina) proti sevu *Salmonella* spp. Nobeno od čistil se ni izkazalo za učinkovito v obeh testih proti vrsti *Listeria monocytogenes*.

Rešitev je optimizacija postopka čiščenja, ponovno preverjanje primernosti in zamenjava določenih manj učinkovitih čistilnih in razkužilnih sredstev.

8 VIRI

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17-23

Aho M., Kurki M., Rautelin H., Ksunen A. 1989. Waterborne outbreak of campylobacter enteritis after outdoors infantry drill in Utti, Finland. *Epidemiology and Infection*, 103, 1: 133-141

Anonymous. 2004. Appréciation des risques alimentaires liés aux campylobacters. Application au couple poulet/*Campylobacter jejuni*. Paris, AFSSA - Agence Française de securite sanitaire des aliments: 96 str.
<http://www.anses.fr/Documents/MIC-Ra-campylobacter.pdf>

Anonymous. 2002. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuffs, food and man in the European Union and Norway in 2002. Berlin, European Commission, Health and Consumer Protection Directorate D — Food safety: 191–197.

Bio-Rad Laboratories. 2006. Applications Guide: Real-time PCR. München, Bio-Rad Laboratories: 105 str.
<http://www.bio-rad.com> (23. maj. 2010)

Blackburn C.W., Curtis L.M., Humpheson L., Billon C., McClure P.J. 1997. Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 1: 31-44

Borck B., Pedersen K. 2005. Pulsed-field gel electrophoresis types of *Campylobacter* spp. in Danish turkeys before and after slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 1: 63–72

Charaf U.K., Bakich S.L., Falbo D.M. 1999. A model biofilm for efficacy assessment of antimicrobials versus biofilm bacteria. V: Biofilms—The Good, the Bad and the Ugly. Wimpenny J., Gilbert P., Walker J., Brading M., Bayston R. (eds.). Cardiff, BioLine: 171–177

Charaf U.K. 2000. A model biofilm for efficacy assessment of antimicrobials. WIPO-World Intellectual Property Organization WO2000077162 A1: 25 str.

Characklis W.G. 1981. Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 9: 1923-1960

Clover D.O. 1990. Foodborne diseases. London, Academic Press: 395 str.

Codex Alimentarius Commission. 2003. Recommended international code of practice: General principles of food hygiene. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: 31 str.

<http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do> (junij, 2011)

Cogan T.A., Bloomfield S.F., Humphrey T.J. 1999. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. Letters in Applied Microbiology, 29, 5: 354–358

Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 2007. Official Journal of the European Union, 48, L322: 12-29

Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance). 2005. Official Journal of the European Union, 48, L338: 1-26

Council Directive No 93/43/EEC 14 June 1993 on the hygiene and foodstuffs. 1993. Official Journal of the European Union, 36, L175: 1-11

D' Aoust J.Y. 1989. *Salmonella*. V: Foodborne bacterial pathogens. Doyle M.P. (ed.). New York, Marcel Dekker: 311-325

Debevere J., Uyttendaele M., Devlieghere F., Jaxsens L. 2006. Microbiological guide values and legal microbiological criteria. Gent, Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation (LFMFP-UGent), Ghent University: 66 str.

DIN 10516. Lebensmittelhygiene - Reinigung und Desinfektion verabschiedet: Leitlinien für eine gute Lebensmittelhygienepaxis. Food hygiene - cleaning and disinfection passed : Contribution for guidelines for good hygiene practice. 2001: 2 str.

Doyle M.P., Roman D.J. 1981. Growth and survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* as a function of temperature and pH. Journal of Food Protection, 44, 8: 596-601

EN 1276. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1). 1997: 26 str.

EFSA. 2010a. Scientific Opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. EFSA Journal, 8, 1: 1437-1526

EFSA. 2010b. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. EFSA Journal, 8, 3: 1503-1602

EFSA. 2010c. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008. Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. EFSA Journal, 8, 8: 1522-1654

EFSA. 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal, 9, 3: 2090-2468

European Parliament resolution on the Commission: White Paper on food safety. 2001. Official Journal of the European Communities, 43, C197: 203 – 211

Flemming H.C. 1991. Biofouling in water treatment. V: Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. Geesey G.G., Lewandowski L., Flemming H.C (eds.). Boca Raton, CRC Press: 47-80

Forsythe S.J., Hayes P.R. 1998. Food hygiene, microbiology and HACCP. 3rd ed. Gaithersburg, Aspen Publishers: 449 str.

Garritty M.G., Bell J.A., Lilburn T. 2005. The revised road map to the manual. V: Bergey's manual of systematic bacteriology: The Proteobacteria. Part A: Introductory essays. Vol. 2. 2nd ed. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds.). New York, Springer: 159-220

Gašperlin L., Bem Z. 2003. Perutninsko meso. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 425-445

Gerardi M.H., Zimmerman M.C. 2005. Wastewater pathogens. New Jersey, John Wiley-Interscience: 145-146

Ghafir Y., China B., Dierick K., De Zutter L., Daube G. 2007. A seven-year survey of *Campylobacter* contamination meat at different production stages in Belgium. International Journal of Food Microbiology, 116, 1: 111-120

Holah J., Timperley A. 1999. Hygienic design of food processing facilities and equipment. V: R3-Nordic contamination control symposium. 30. VTT symposium. Wirtanen G., Salo S., Mikkola A. (eds.). Espoo, VTT Publications: 11-39

Holah J.T. 2003. Cleaning and disinfection. V: Hygiene in food processing. Leliveld H.L.M., Mostert M.A., Holah J., White B. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 245-245

Hudson J.A., Mott S., Penney N., 1994. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. Journal of Food Protection, 57, 3: 204-208

Huezo R., Northcutt J.K., Smith D.P., Fletcher D.L., Ingram K.D. 2007. Effect of dry air or immersion chilling on recovery of bacteria from broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 70, 8: 1829-1834

Humphrey T.J., Mason M., Martin K. 1995. The isolation of *Campylobacter jejuni* from contaminated surfaces and its survival in diluents. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 295–303

Hyserve. 2005. Compact Dry: Easy test method for counting micro-organisms. Uffing, Hyserve GmbH&Co. KG.: 4 str.

ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications of Foods, 1996. Microorganisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, str. 534

ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications of Foods, 2002. Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: str. 362

ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 1: Detection method. 1996: 16 str.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 2002: 46 str.

ISO 4833. Microbiology- General guidance for the enumeration of microorganisms- colony count technique at 30 °C. 1991: 5 str.

IVZ. 2007. Osnovna higienska stališča za higieno živil, namenjena delavcem v živilski dejavnosti. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije: 32 str.
<http://www.zzv-ce.si/uploads/higienska%20stalisca.pdf>

IVZ. 2008a. Spremljanje salmonel in PFGE diagnostika salmonel izoliranih v izbruhih. Letno (2008) poročilo oddelka za MM (bakteriologija). Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 1 str.

IVZ. 2008b. Letno (2008) poročilo oddelka za MM (bakteriologija): Spremljanje pojavljanja kampilobakterioz v Sloveniji. Oddelek za sanitarno mikrobiologijo monitoring zoonoz.
<http://ivz.arhiv.over.net/index.php?akcija=novica&n=1929> (maj 2010)

Jacxsens L., Kussaga J., Luning P.A. Van der Spiegel M., Devlieghere F., Uyttendaele M. 2009. A microbial assessment scheme to measure microbial performance of food safety management systems. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 1-2: 113-125

Jeršek B. 2010. Navodila in delovni zvezek za vaje pri predmetu praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 6-20

Jeršek, B. 2009. Higiena živil. Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 79 str.

Kegl B. 2003. Čistilna sredstva. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski institut za kakovost in meroslovje, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 553-566

Mahmood M.S., Ahmed A.N., Hussain I., 2003. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat, poultry meat products and other related inanimates at Faisalabad. Pakistan Journal of Nutrition, 2, 6: 346-349

Marriot N.G. 1995. Principles of food sanitation. 3rd ed. New York, Chapman & Hall: 421 str.

Marshall K.C., Stout R., Mitchell R. 1971. Mechanism of the initial events in sorption of marine bacteria to surfaces. Journal of General Microbiology, 68, 3: 337-348

Maukonen J., Mättö J., Wirtanen G., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Saarela M. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30, 6: 327-356

Mead, P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5, 5: 607-625

MKGP. 2010. Higiena živil in krme. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 3 str.
www.mkgp.gov.si/si/o_ministrstvu/direktorati/direktorat_za_varno_hrano/starasektor_za_varnost_in_kakovost_hrane_in_krme/higiena_zivil_in_krme/higiena_zivil/ (julij 2011)

Miller A.J. 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Food Protection, 55, 6: 414-418

Milohnoja M., Tomašič A. 1996. Higiena v proizvodnji in prometu z živili. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 146 str.

Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 119-122

Moesteller T.M., Bishop J.R. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. Journal of Food Protection 56, 1: 34-41

Nahberger Marčič V., Vidovič R. 2002. HACCP v predelavi perutnine. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski Institut za kakovost in meroslovje, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 329-341

Northcutt J.K., Berrang M.E. 2006. Influence of a chicken transport cage-washing system on wastewater characteristics and bacteria recovery from cage flooring. Journal of Applied Poultry Research, 15: 457-463

Nolan D.A., Chamblin D.C., Troller J.A. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. International Journal of Food Microbiology, 16, 4: 323-335

Pečoler A. 1996. Mikrobiološka slika perutninskega mesa med distribucijo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.

Petran R.L., Zottola E.A. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Food Science, 54: 458-460

Peyrat M.B., Soumet C., Maris P., Sanders P. 2008. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfection procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. International Journal of Food Microbiology, 124, 2: 188-194

Polanc J., Raspor P. 2002. Ugotavljanje možnih tveganj in določitev nadzornih ukrepov. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski institut za kakovost in meroslovje, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 329-341

Ponikvar M., Jeršek B. 2002. Tehnično higienski pogoji v procesu. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski institut za kakovost in meroslovje, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 329-341

Ponikvar M. 2006. Čiščenje in dezinfekcija prehranskih obratov. Celje, ZZV Celje, Inštitut za sanitarno inženirstvo: 8 str.
www.zzv-ce.si/uploads/ciscenje%20v%20zivilskih%20obratih.pdf (10. jun. 2011).

Potočnik V. 2001. Namen in uporaba HACCP sistema. Ljubljana, Zavod za zdravstveno varstvo: 100 str.

Pravilnik o prenehanju veljavnosti Pravilnika o higieni živil. 2007. Uradni list Republike Slovenije, 17, 54: 7422-7422

Raspor P. 2003. Kritične točke v proizvodnji in predelavi živil (HACCP). V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-219

Raspor P. 2004. Sedanji pogled na varnost živil. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi, Radenci 18. in 19.marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 2-12.

Raspor P. 2007. Izzivi sedanjosti v živilsko prehrabeni verigi. V: Zbornik predavanj: Varna in zdrava hrana na mizi potrošnika. Posvetovanje, 7. december 2007. Rugelj D. (ur.). Ljubljana, Visoka šola za zdravstvo

Regulation (EC) No 178/2002 of the European parliament and of the council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. 2002. Official Journal of the European Communities, 45, L31: 1-24.

Regulation (EC) No 852/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. 2004. Official Journal of the European Union, 47, L139: 1-54

Reuter G. 1998. Disinfection and hygiene in the field of food of animal origin. International Biodeterioration and Biodegradation, 41, 3-4: 209-215

Riemann H.P., Riemann H., Cliver D.O. 2006. Foodborne infections and intoxications. 3rd ed. San Diego, Elsevier: 903 str.

Salo S., Wirtanen G. 2005. Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains. Food and Bioproducts Processing, 83, 4: 288-296

Savić I. 2003. Čiščenje in dezinfekcija v mesno-predelovalnih obratih. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 609-629

Seme K. 2002. Sterilizacija in razkuževanje. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 417-426

Shahamat M., Seaman A., Woodbine M. 1980. Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. Zentralblatt für Bakteriologie, 246, 4: 506-511

Slutsker L., Schuchat A. 1999. Listeriosis in humans. V: *Listeria*, listeriosis, and food safety. 2nd ed. Ryser E.T., Marth E.H. (eds.). New York, Marcel Dekker: 75-95

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: 87-113

Smole Možina S. 2002. Določanje kritičnih mej. V: Priročnik za postavljanje in vodenje sistema HACCP. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Slovenski institut za kakovost in meroslovje, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 215-226

Tapia de Daza M.S., Y. Villegas, A. Martinez, 1991. Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. International Journal of Food Microbiology, 14, 3-4: 333-337

Taylor J.H., Rogers S.J., Holah J.T. 1999. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 degrees C. Journal of Applied Microbiology, 87, 5: 718-725

Troller J.A. 1993. Sanitation in food processing. San Diego, Academic Press, 30-70: 263-286.

Vomberger B., Arzenšek Pinter R. 2008. Učbenik: Tehnologija Mesa. Gradivo za 2.letnik. Ljubljana, Ministrstvo za šolstvo in šport: 207 str.

VTT-4377-91. Detection of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* in food and feed. 1991: 23 str.

VTT-4278-96. Testing of biocidal efficacy on stainless steel surface. 1996: 20 str.

Wutor V.C., Togo C.A., Pletschke B.I. 2009. Suitability of total coliform β -D-galactosidase activity and CFU counts in monitoring faecal contamination of environmental water samples. Water SA, 35, 1: 85-88

WFK. 2007. Higiena in mikrobiologija - modul 1. WFK- Krefeld, Cleaning Technology Research Institute.
<http://hygiene-for-cleaners.eu/pages/slhome/moduli-1-do-6/ml-mikroorganizmi.php>
(4.januar, 2011)

Wirtanen G. 1995. Biofilm formation and its elimination from food processing equipment. Espoo, VTT Publications: 106 str.

Wirtanen G., Salo S., Maukonen J., Bredholt S., Mattila-Sandholm T. 1997. Nordfood sanitation in dairies. Espoo, VTT Publications: 46 str.

ZZUZIS- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949-6955

ZZUZIS-A-Zakon o spremembah in dopolnitvah zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 42: 4072-4075

ZdZPZ-Zakon o spremembah in dopolnitvah določenih zakonov na področju zdravja. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 47: 6280-6282

Zobell C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. Journal of Bacteriology, 46: 39-56

ZZVMS. 2011. Higiena v živilskih obratih. Murska Sobota, Zavod za zdravstveno varstvo Murska Sobota.

<http://www.zzv-ms.si/si/varnost-zivila/higiena-zivilskih-obratih.htm> (4.januar.2011)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici diplomske naloge prof. dr. Sonji Smole Možina za trud, strokovno pomoč, prijaznost in potrpežljivost.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Lei Gašperlin za hiter pregled in uporabne napotke.

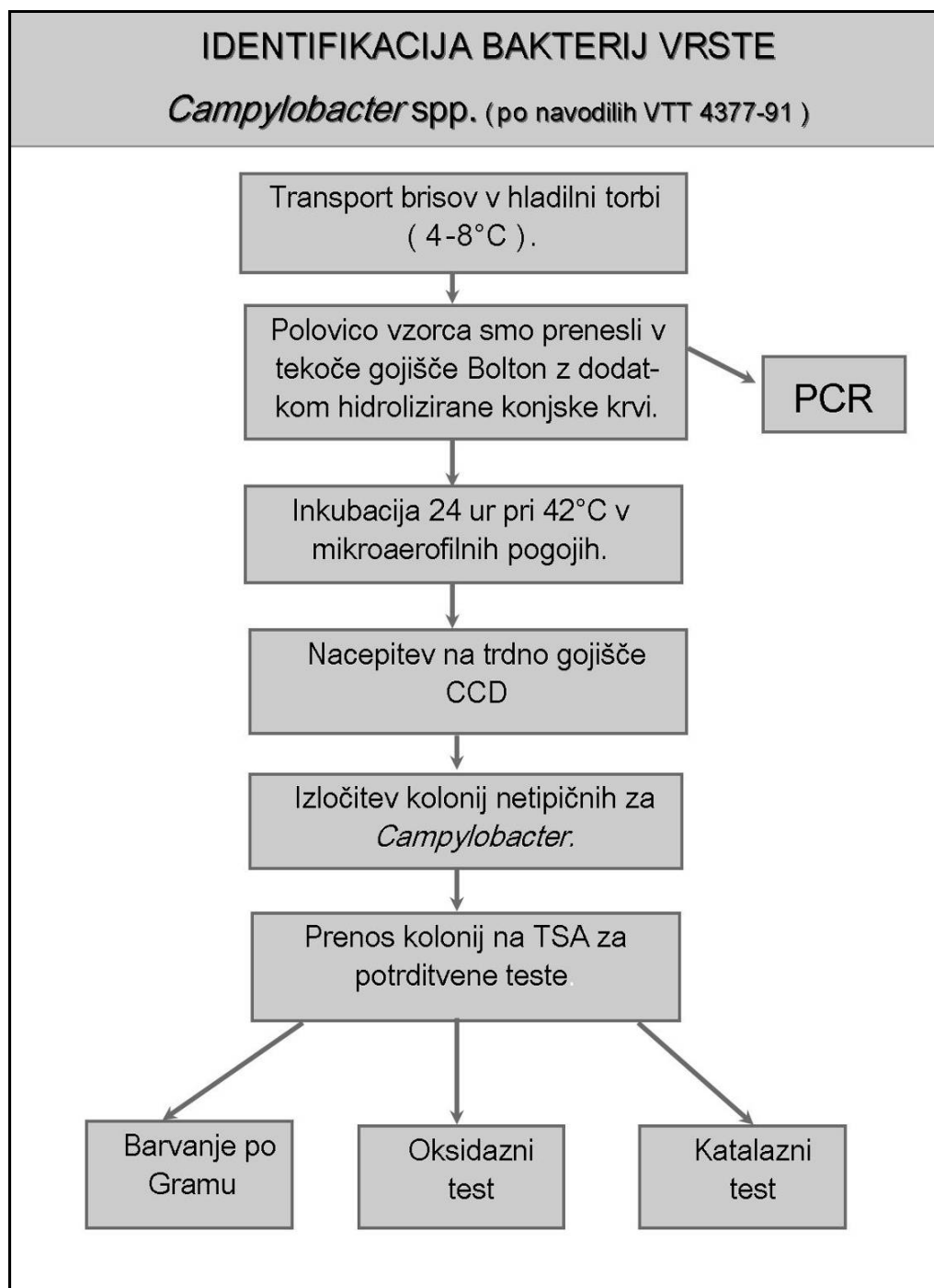
Posebna zahvala gre Tehniškemu inštitutu na Finskem (VTT), še posebej dr. Satu Salo in dr. Gun Wirtanen, ki sta nas povabile k sodelovanju pri projektu Safoodnet in omogočile nastanek zelo uporabne diplomske naloge. Zahvala gre tudi mag. Jani Ramuš iz Gospodarske zbornice za pomoč pri koordinaciji pilotnega projekta.

Sošolki Vanji Uhan za podporo in uspešno sodelovanje v času projekta in nastanka diplomske naloge.

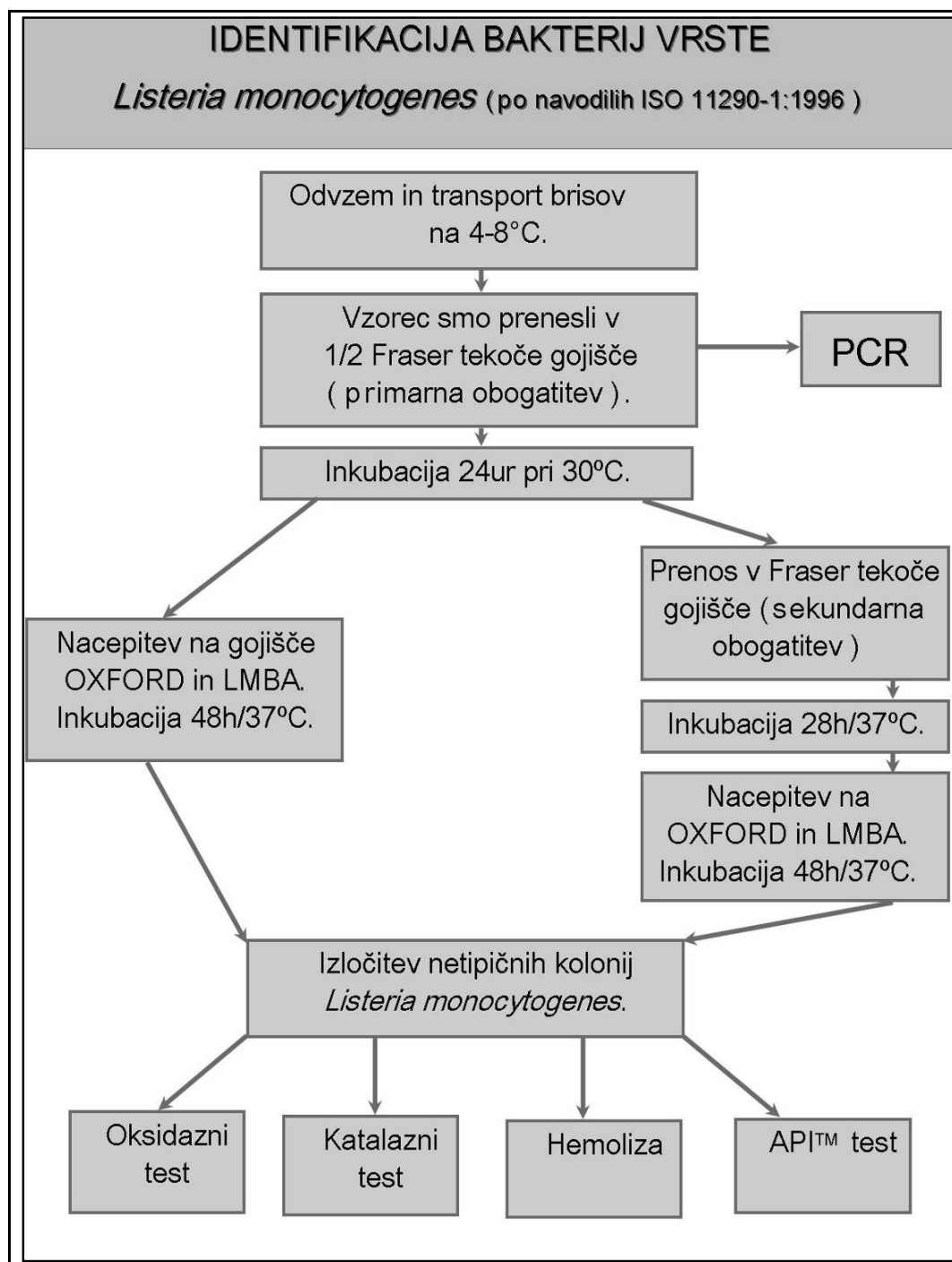
Za tehnični pregled diplomske naloge se zahvaljujem Lini Burkan.

Hvala družini in prijateljem, ki so mi v času nastanka stali ob strani. Nalogo posvečam najboljši mami Lei Tušar, ki me je vedno spodbujala in je ni dočakala. Hvala mami.

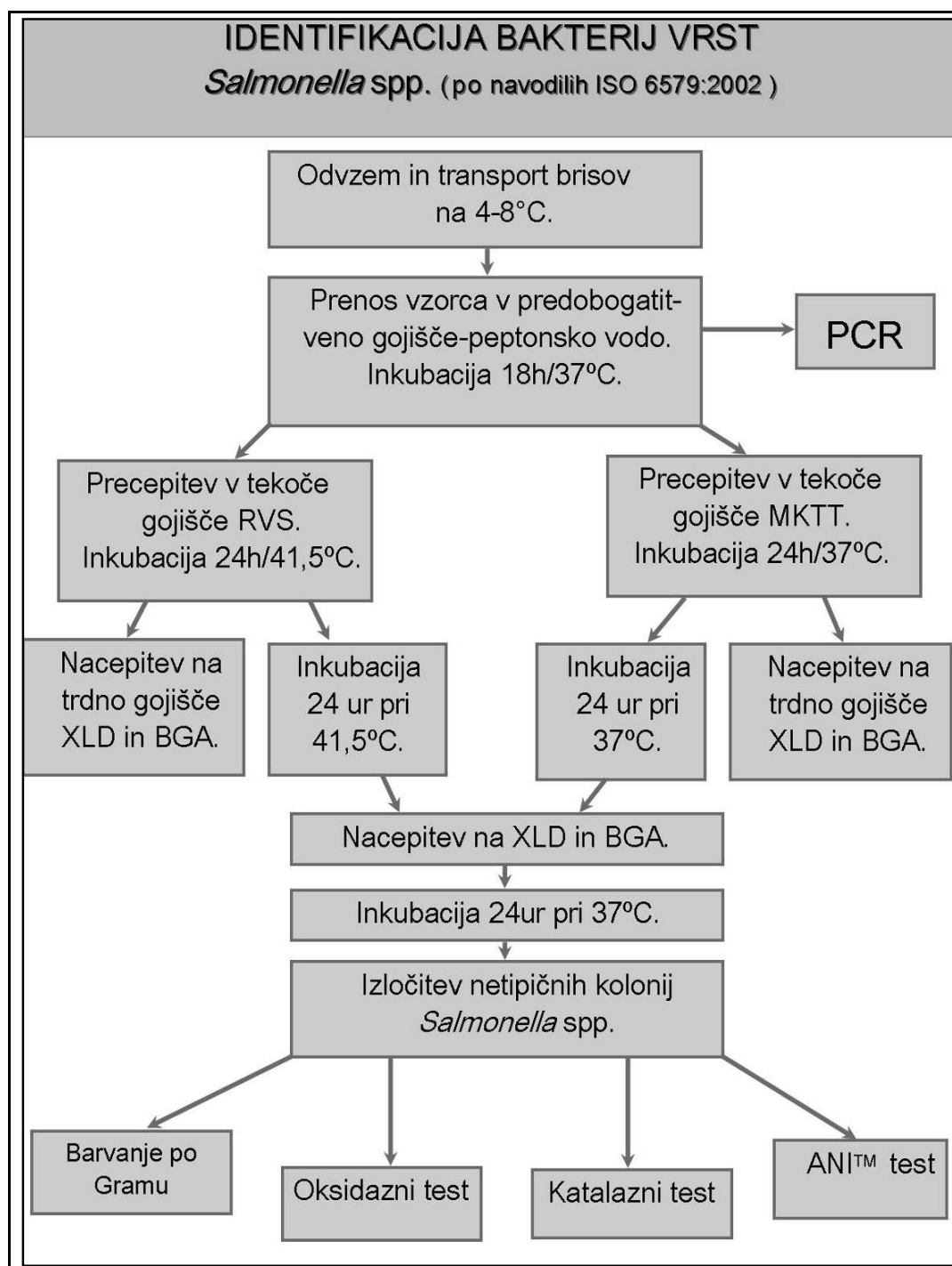
PRILOGE



Priloga A: Diagram poteka identifikacije bakterij *Campylobacter* spp.



Priloga A: Diagram poteka identifikacije bakterij *Listeria monocytogenes*



Priloga B Diagram poteka identifikacije bakterij *Salmonella* spp.

Priloga C: Seznam uporabljenih trdnih gojišč glede na mikroorganizem

Mikroorganizem	Gojišče	Izdelovalec	Država
<i>Campylobacter</i> spp.	CCDA (<i>Campylobacter</i> Blood Free Selective Medium)	LAB M, LAB 112	Lancashire, ANGLIJA
<i>Listeria</i> spp.	Kromogeni agar	OXOID LTD., CM1084	Basingstoke, ANGLIJA
<i>Listeria</i> spp.	LAMMASVER I AGAR	TAMMER- TUTKAN Maljat OY	Tampere, Finska
<i>Listeria</i> spp.	LMBA	TAMMER- TUTKAN Maljat OY	Tampere, Finska
<i>Listeria</i> spp.	OXFORD AGAR	MERCK, 1.07006.0010	Basingstoke, NEMČIJA
<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp.	TSA (Tryptični sojin agar)	Difco™, 236940	Le Pont de Claix, Francija
<i>Salmonella</i> spp.	XLD	Biolife, 4022062	Milano, Italija
<i>Salmonella</i> spp.	BGA (Brilliant Green Agar)	Difco™ 228530	Le Pont de Claix, FRancija
Splošno gojišče	MHA (Mueller- Hinton Agar)	OXOID LTD., CM 0337	Oxoid, Anglija
<i>Campylobacter</i> spp.	Columbia	OXOID LTD., CM0331	Oxoid, Anglija
<i>Campylobacter</i> spp.	Columbia- <i>Campylobacter</i> agar base	OXOID LTD., CM0689	Oxoid, Anglija
<i>Campylobacter</i> spp.	AHB-Bacto Heart infusion Agar	OXOID LTD., CM 375	Oxoid, Anglija
<i>Campylobacter</i>	AHB-Yeast Extract	OXOID LTD., CM 19	Oxoid, Anglija

Priloga D: Seznam uporabljenih tekočih gojišč glede na mikroorganizem

Mikroorganizem	Gojišče	Izdelovalec	Država
<i>Campylobacter</i> spp.	Tekoče gojišče BOLTON	LAB M, LAB 135	Lancashire, ANGLIJA
<i>Salmonella</i> spp.	PBS (Phosphate Buffered Saline)	OXOID LTD. BR0014	Basingstoke, ANGLIJA
<i>Listeria</i> spp.	Tekoče gojišče FRASER	OXOID LTD., CM 0895	Basingstoke, ANGLIJA
<i>Salmonella</i> spp.	MKTTn tekoče gojišče (Mueller Kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth)	LAB M, LAB 202	Lancashire, Anglija
<i>Salmonella</i> spp.	Tekoče gojišče RVS	BD, BA-257257.01	Le Pont de Claix,FR
Splošno gojišče	MHB (Mueller- Hinton Broth)	OXOID LTD. CM 0405	Oxoid, Anglija

Priloga E: Seznam uporabljenih dodatkov in raztopin

Gojišče	Dodatek, raztopina	Izdelovalec	Država
COLUMBIA	<i>Campylobacter</i> growth supplement	OXOID LTD., SR 232E	Basingstoke, ANGLIJA
COLUMBIA	Lysed horse blood	OXOID LTD., SR 0048	Basingstoke, ANGLIJA
OXFORD	Oxford <i>Listeria</i> supplement	MERCK, 1.07006.0010	Merck, Nemčija
INAKTIVACIJSKA TEKOČINA	Tween 80	MERCK, 8.22187.0500	Merck, Nemčija
INAKTIVACIJSKA TEKOČINA	Lecitin (L- α - Phosphatidylcholin e, Type X-E)	Sigma, P5394-100	SIGMA, St.Louis-ZDA
INAKTIVACIJSKA TEKOČINA	Albumin iz govejega seruma	SIGMA-Aldrich, A4503	SIGMA, St.Louis-ZDA
INAKTIVACIJSKA TEKOČINA	Sorensov fosfatni pufer KH ₂ PO ₄		
INAKTIVACIJSKA TEKOČINA	L-histidine monohidroklorid monohidrat	Merck, 4350.0025.	SIGMA, St.Louis-ZDA
INAKTIVACIJSKA TEKOČINA	Na-tiosulfat	Merck, 106535	Merck, Nemčija

Priloga F: Učinkovitost čistil, bolj pregledna in skrajšana verzija

čistilo	suspenzijski test <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	površinski test <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	suspenzijski test <i>Salmonella</i>	površinski test <i>Salmonella</i>	suspenzijski test <i>Campylobacter</i>	površinski <i>Campylobacter</i>
N10	N/N	N/N	N/D	N/N	N/D	N/N
TDS	N	N	D	D	D	N
T99	N	N	N	D	D	D
T19	N	N	N	D	D	D
T56	N	N	D	D	N	N
C10	N	D	D	D	D	D
V10	N	D	N	D	D	D

Legenda: N- ne ustreza standardu, D- ustreza standardu