

Mikrobiološka čistoća površina u hladnjacima za čuvanje hrane

Vujić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:977176>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

Kristina Vujić

**MIKROBIOLOŠKA ČISTOĆA POVRŠINA U HLADNJACIMA
ZA ČUVANJE HRANE**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2020.

**VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU I SIGURNOST HRANE**

Predstojnik:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva:

Prof.dr.sc. Lidija Kozačinski

Prof.dr.sc. Žaljka Cvrtila

Izv.prof.dr.sc. Nevijo Zdolec

SADRŽAJ

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 2. | PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA | 2 |
| 2.1. | Temperatura i rast mikroorganizama | 2 |
| 2.2. | Psihrofilne bakterije | 3 |
| 2.3. | Psihrotrofne bakterije | 4 |
| 2.4. | Kvarenje hrane | 4 |
| 2.4.1. | <i>Važni čimbenici u mikrobnom kvarenju hrane</i> | 5 |
| 2.5. | Značaj mikroorganizama | 5 |
| 2.5.1. | <i>Vrste mikroorganizama</i> | 5 |
| 2.5.2. | <i>Plijesni koje uzrokuju kvarenje</i> | 6 |
| 2.5.3. | <i>Kvasci koji uzrokuju kvarenje</i> | 6 |
| 2.5.4. | <i>Bakterije koje uzrokuju kvarenje</i> | 6 |
| 2.6. | Hlađenje kao metoda čuvanja hrane | 7 |
| 2.6.1. | <i>Mehanizam hladno-inducirane inaktivacije</i> | 7 |
| 3. | MATERIJAL I METODE | 8 |
| 3.1. | Uzorkovanje | 8 |
| 3.2. | Mikrobiološka obrada uzoraka | 8 |
| 3.3. | Očitavanje rezultata | 9 |
| 3.4. | Statistička obrada | 9 |
| 4. | REZULTATI | 10 |
| 5. | RASPRAVA | 12 |
| 6. | ZAKLJUČCI | 14 |
| 7. | LITERATURA | 15 |
| 8. | SAŽETAK | 17 |
| 9. | SUMMARY | 18 |
| 10. | ŽIVOTOPIS | 19 |

1.UVOD

Tehnologija hlađenja uvelike je promijenila koncept sigurnosti hrane u smislu očuvanja održivosti i dostupnosti hrane. U domaćinstvima se hladnjaci koriste *non-stop* i bitno je stoga provoditi redovito i primjereno održavanje uređaja, ali i njegovu higijenu. Temperature hlađenja hrane u kućanstvima koje se preporučuju su u rasponu od 0 do 5 °C (JAMES i sur., 2016.). Međutim, taj raspon se rijetko bilježi u velikom broju kućanstava, a česte su temperaturne oscilacije odnosno povišenje temperature hladnjaka uslijed različitih čimbenika poput frekvencije otvaranja hladnjaka, lošeg održavanja sustava hlađenja i sl.

Mikroorganizmi koji rastu na temperaturama hlađenja hrane mogu prouzročiti brže kvarenje hrane, kao i zadržavati se na kontaminiranim površinama hladnjaka. Od patogenih bakterija, mogu se očekivati *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*, kao i nalaz drugih mikroorganizama is skupine psihrofilnih mikroorganizama poput kvasaca i plijesni, *Pseudomonas* spp. i drugih (RAY I BHUNIA, 2013.). Općenito, nalaz mikroorganizama na unutarnjim površinama hladnjaka uvjetovan je kontaminacijom preko hrane i drugih hlađenih artikala, a opstanak i rast te mikroflore uvjetuju postupci (ne)čišćenja i dezinfekcije te temperatura hlađenja i oscilacije temperatura. Istraživanja mikrobne kontaminacije površina hladnjaka razlikuju se značajno s obzirom na utvrđeni broj pojedinih mikrobnih skupina, što je razumljivo zbog utjecaja brojnih čimbenika, od ljudskog faktora, hrane koja se čuva u hladnjaku, režima hlađenja itd. Npr., YE i sur. (2019.) su na površinama hladnjaka utvrdili ukupni broj bakterija od 3.18–7.82 log CFU/100 cm², psihrotrofnih bakterija 2.37–8.13 log CFU/100 cm², a gljivica 3.57–7.46 log CFU/100 cm² što pokazuje veliku varijabilnost. Patogeni mikroorganizmi rijetko se izoliraju, no ima izuzetaka posebno u slučaju *L. monocytogenes* pa se hladnjaci iz kućanstava smatraju potencijalnim izvorom uzročnika te alimentarne infekcije (JAMES i sur., 2016.).

U skladu s navedenim, cilj je ovog diplomskog rada bio istražiti mikrobiološku čistoću unutarnjih površina hladnjaka za čuvanje hrane u kućanstvima na području Zagreba i okolice, uglavnom u kućanstvima s mlađom populacijom. Istovremeno je popraćena temperatura hlađenja hrane u svakom hladnjaku radi uvid povezanosti iste s brojem mikroorganizama na površinama.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Čuvanje hrane u hladnjacima u kućanstvima uobičajen je postupak održavanja hrane do njene konzumacije. U ovom je poglavlju prikazan odnos mikroorganizama prema temperaturi i načela mikrobnog kvarenja hrane te značaj higijene u hladnoj pohrani hrane.

2.1. Temperatura i rast mikroorganizama

Hrana je izložena različitim temperaturama od proizvodnje do konzumacije. Pri pripremanju hrane, često je podvrgavamo visokim temperaturama od 65 do 100 °C i više. Kako bismo skladištili hranu na duže vremenske periode, koristimo temperature do 5 °C (hlađenje) ili do – 20 °C (zamrzavanje). Neka hrana stabilne strukture se može čuvati na sobnoj temperaturi (od 10 °C do 35 °C). Hrana koja je spremna za konzumaciju se često održava toplom na 50-60 °C i po nekoliko sati.

Mikroorganizmi važni u hrani se dijele u tri skupine na temelju temperature na kojoj rastu, a svaka ima svoju optimalnu temperaturu te temperaturni opseg rasta. Termofili rastu na relativno visokim temperaturama. Optimalna temperatura za rast im je 55 °C, a rastu u rasponu između 45 °C i 70 °C. Mezofili rastu na sobnoj temperaturi uz optimalnu temperaturu od 35 °C, a u rasponu od 10 °C do 45 °C. Psihofili rastu na hladnijim temperaturama od -5 °C do 20 °C, a optimalna temperatura im je 15 °C. Ova podjela nije strogo određena te se kategorije često preklapaju (RAY i BHUNIA, 2013.). Psihrotrofi su pak mikroorganizmi koji rastu na temperaturi hladnjaka (0 °C – 5 °C) bez obzira na njihovu optimalnu temperaturu rasta. Imaju brzi rast između 10 °C i 30 °C, a uključuju plijesni, kvasce, mnoge gram negativne bakterije rodova *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Yersinia*, *Serratia* i *Aeromonas* te gram pozitivne bakterije rodova *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* i *Listeria*. Termorezistentni mikroorganizmi su oni koji preživljavaju temperaturu pasterizacije. U njih se ubrajaju vrste iz rodova *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Enterococcus*. Bakterijske spore, također, spadaju u ovu skupinu. Spore mogu rasti na različitim temperaturama, od temperature hladnjaka do temperatura koje pogoduju rastu termofila (RAY i BHUNIA, 2013.). Odnos mikroorganizama prema temperaturi je vrlo bitan u sprečavanju kvarenja, pa tako i u hladnoj pohrani. Dakle, utjecaj temperature na rast mikroorganizama i na njihovu sposobnost rasta koristimo u prevenciji kvarenja hrane, povećanju sigurnosti od patogena te u obradi namirnica.

2.2. Psihrofilne bakterije

Temperatura skladištenja namirnica je ključna u očuvanju njihove zdravstvene ispravnosti. Temperatura je jedan od vanjskih čimbenika i najvažnijih parametara koji utječu na rast bakterija. Kako smo naveli, među mikroorganizmima koji rastu pri niskim temperaturama mogu se razlikovati dvije skupine: pravi ili striktni psihrofili – imaju optimalni raspon temperature rasta od 12 do 15 °C i ne rastu iznad 20 °C. Psihrotrofi ili fakultativni psihrofili rastu jedino pri niskim temperaturama kao i striktni psihrofili, ali imaju višu optimalnu i maksimalnu temperaturu rasta (DURAKOVIĆ i sur., 2002.). One mogu rasti i razmnožavati se na niskim temperaturama zbog adaptacijom uvjetovanog obogaćenja membranskih lipida poluzasićenim masnim kiselinama (SAMARDŽIJA i sur., 2012.). Na taj način, promijenjena stanična membrana ima dovoljnu propusnost za aktivni transport metabolita potrebnih za rast i razmnožavanje na niskim temperaturama (SCHINIK, 1999.). Ta tolerancija širokog raspona temperature uvjetuje da psihrotrofi imaju i značaj u kvarenju smrznutih namirnica. Neke vrste psihrofilnih bakterija mogu rasti i ispod temperature od 0 °C, dokle god im je u okolišu na raspolaganju slobodna voda. Povremeno ih nalazimo i u kućnim hladnjacima (5 °C), gdje su važni uzročnici kvarenja hrane (DURAKOVIĆ i sur., 2002.). Psihrofili imaju svoje karakteristične enzime koji se inaktiviraju čak pri srednjim temperaturama dok su djelotvorni pri niskim temperaturama kao i njihovi ribosomi. Nije dokazano koja je apsolutno najniža temperatura pri kojoj se još odvijaju metabolički procesi u psihrofila. Smanjenje i eventualni izostanak mikrobnog rasta pri niskim temperaturama uzrokovano je promjenama u ustrojstvu citoplazmatske membrane, koje promjene omogućuju nadoknadu hranjivih tvari za enzimske sustave unutar stanice. Oni povećavaju količinu nezasićenih masnih kiselina u svojim membranama pa tako imaju ukupno veću količinu nezasićenih masnih kiselina od mezofila (CHINTALAPATI i sur., 2004.). Povećanjem stupnja nezasićenosti smanjuje se točka taljenja pa tako membrane zadržavaju tekućinu i djelotvorne su pri niskim temperaturama (DURAKOVIĆ i sur., 2002.).

2.3. Psihrotrofne bakterije

Kao što je naznačeno ranije, psihrotrofne bakterije označavaju bakterijske vrste koje imaju sposobnost rasta na 5 °C i niže, ali se dosta brzo umnažaju na 10 °C – 25 °C te čak i na višim temperaturama (GRAM i sur., 2002.) Mnogo hrane se čuva u ledu i u hladnjacima te se očekuje da će imati duži vijek trajanja (50 dana i više). Između proizvodnje i konzumacije te

hrane može doći do promjene temperature i do 10 °C i više. Psihrotrofne bakterije (također i kvasci i plijesni koji su psihrotrofni) tada mogu uzrokovati kvarenje. Ako je hrana uskladištena pod aerobnim uvjetima, psihrotrofni aerobi će biti odgovorni za kvarenje hrane. Kod hrane uskladištene pod anaerobnim uvjetima, za kvarenje će biti odgovorni anaerobi i fakultativni anaerobi. Ukoliko je hrana skladištena na niskim temperaturama i ta temperatura nije rasla tijekom skladištenja, kvarenje mogu uzrokovati termorezistentne psihrotrofne bakterije (RAY i BHUNIA, 2013.)

Važne psihrotrofne aerobne bakterije su *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. fragi* te ostale vrste roda *Pseudomonas*, potom *Acinetobacter*, *Moraxella* i *Flavobacterium*. U aerobe također spadaju i neke vrste kvasaca i plijesni. Od fakultativno anaerobnih psihrofila treba spomenuti *Brochothrix thermosphacta*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* te ostali *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides* te ostali *Leuconostoc* spp., neki *Enterococcus* spp., *Alcaligenes* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia liquefaciens*, neke *Hafnia* i *Proteus* spp. i *Shewanella putrefaciens* (i neke mikroaerofilne plijesni). Termorezistentni psihrotrofi podrazumijevaju fakultativne anaerobe kao što su spore *Bacillus coagulans* i *Bacillus megaterium*, neki rodovi *Lb. viridescens* te anaerobe poput spora *Clostridium laramie*, *Clostridium estertheticum*, *Clostridium algidicarnis*, *Clostridium putrefaciens* te ostale *Clostridium* spp. Ove spore preživljavaju na niskim temperaturama skladištenja. Kada se temperatura skladištenja povisi iznad 5 °C (npr. tijekom transporta ili prodaje u trgovini) postoji mogućnost rasta i nekih mezofila. Međutim, na temperaturi od 10 °C do 15 °C, psihrotrofi će rasti puno brže od mezofila (RAY i BHUNIA, 2013.).

2.4. Kvarenje hrane

Hrana se smatra pokvarenom kada izgubi svoja svojstva. Faktori prosuđivanja svojstava hrane su boja, tekstura, miris, okus, oblik i prisutnost abnormalnosti. Gubitkom jednog od tih svojstava, hrana se smatra pokvarenom. Kvarenje hrane dovodi do velikih ekonomskih gubitaka, ali i do gubitka jestive hrane. Budući da svjetska populacija ljudi raste, velika važnost se treba pridodati ne samo povećanju proizvodnje hrane nego i smanjenju kvarenja hrane. Svjetska organizacija za hranu (FAO) Ujedinjenih naroda i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procjenjuju da se trećina hrane proizvedene za ljudsku prehranu baca.

2.4.1. Važni čimbenici u mikrobnom kvarenju hrane

Mikrobno kvarenje hrane je posljedica rasta mikroorganizama u hrani ili otpuštanja njihovih ekstracelularnih i intracelularnih enzima u hrani. Parametri koje povezujemo s kvarenjem različite vrste hrane su promjene u boji, mirisu i teksturi, stvaranje taloga; nakupljanje plina (ili pjene); i nakupljanje tekućine. Kvarenje rastom mikroba se događa mnogo brže od kvarenja mikrobnim ekstracelularnim ili intracelularnim enzimima u prisustvu mikrobnih stanica sposobnih za rast. Različite metode očuvanja kvalitete namirnica se koriste između primarne proizvodnje i konačne konzumacije, koje uključuju smanjenje broja mikroba i njihovog rasta, a uključuju upravljanje temperaturnim režimom (RAY i BHUNIA, 2013.).

Općenito, za mikrobno kvarenje hrane treba se poklopiti nekoliko čimbenika. Mikroorganizmi moraju ući u hranu iz jednog ili više izvora. Okoliš koji predstavlja hrana treba pogodovati rastu jedne ili više vrsta kontaminirajućih mikroorganizama (pH, aktivitet vode, O-R potencijal, nutrijenti i inhibirajući faktori). Hrana mora biti skladištena na temperaturi koja omogućava umnažanje jedne ili više vrsta mikroba. I konačno, hrana mora biti skladištena u uvjetima rasta mikroorganizama dovoljno dugo za njihovo umnažanje kako bi dostigli dovoljan broj potreban za uzrokovanje vidljivih promjena u hrani (RAY i BHUNIA, 2013.).

2.5. Značaj mikroorganizama

2.5.1. Vrste mikroorganizama

Svježa hrana i većina prerađene hrane normalno sadrži mnogo vrsta plijesni, kvasaca i bakterija koje su sposobne se umnažati i uzrokovati kvarenje. Virusi i paraziti se ne umnažaju u hrani. Bakterije i kvasci češći su uzročnici kvarenja od plijesni zbog kraćeg generacijskog vremena. Ipak, u hrani gdje bakterije i kvasci nemaju zadovoljavajuće uvjete i u hrani koja se skladišti na duži vremenski period, kao npr. kruh, tvrdi sirevi, fermentirane suhe kobasice i kiselo voće i povrće, veća je mogućnost da će kvarenje izazvati plijesni. Napredak je postignut pakiranjem hrane u anaerobnim uvjetima što je smanjilo kvarenje hrane plijesnima i u nekoj mjeri kvascima, ali ne i anaerobnim i fakultativno anaerobnim bakterijama. Dakle, hrana se najbrže kvari pod utjecajem bakterija, zatim kvascima i plijesni (SINELL, 1980.; RAY, 1992.; KRAFT, 1992.; GRAM, 2002.).

2.5.2. Plijesni koje uzrokuju kvarenje

Mnoge vrste plijesni uzrokuju kvarenje prvenstveno čvrste hrane s vrlo niskim aktivitetom vode (0.7-0.8). Rastu u širokom rasponu pH od 3 do 8. Najučestalije vrste su *Mucor*, *Rhizopus*, *Botrytis*, *Penicillium* i *Aspergillus*. Neke vrste plijesni poput *Penicillium* i *Aspergillus* stvaraju toksične mikotoksine. Voće i povrće je posebno osjetljivo na kvarenje plijesnima (MOSS, 2008.)

2.5.3. Kvasci koji uzrokuju kvarenje

Kvasci općenito uzrokuju kvarenje hrane koja sadrži veliku količinu šećera ili soli, kao npr. sirup, fermentirana hrana i alkoholna pića. Uz to, također rastu u voću i sokovima s niskim pH te na površini mesa i sira. Najčešće susrećemo vrste *Saccharomyces* spp., *Zygosaccharomyces*, *Candida* i *Dekkera/Brettanomyces* (STRATFORD, 2006.).

2.5.4. Bakterije koje uzrokuju kvarenje

Teoretski, bilo koji mikroorganizam (uključujući mikroorganizma koji se koriste u fermentaciji hrane i patogene) koji se može umnažati u hrani i doseći veliki broj može izazvati kvarenje. U stvarnosti, samo je nekoliko rodova bakterija uključeno u kvarenje većine vrsta hrane. To je određeno svojstvima bakterije, karakteristikama hrane i uvjerima skladištenja hrane (RAY i BHUNIA, 2013.).

2.6. Hlađenje kao metoda čuvanja hrane

Učinkovitost čuvanja hrane na niskim temperaturama je poznata od davnina. Procvat proizvodnje hladnjaka je bio u drugoj polovici 19. stoljeća kada su se počeli koristiti na brodovima i vlakovima u Europi za prijevoz mesa i ribe u druge države. Linde, u Njemačkoj, proizveo je prvi hladnjak za domaćinstva otprilike 1874. te započeo komercijalnu proizvodnju prije 1890. Tijekom Drugog svjetskog rata interes ljudi za ohlađenom i smrznutom hranom dramatično raste što je pomoglo razvoju tehnologije potrebne za proizvodnju, transport, prodaju i čuvanje ohlađene i smrznute hrane. Najveća mana različite ohlađene hrane bila je kratak rok trajanja, otprilike dva tjedna (JAMES i sur., 2016.).

Posljednjih godina mnogi tehnološki napretci kao što su pakiranje hrane u pakiranja koja ne propuštaju kisik, dobra vakumirajuća oprema, inovacije u pakiranjima, hladnjače za skladištenje s niskim temperaturama i sl., pomogli su očuvanju namirnica na policama do 60 dana, a za neke i do 90 dana. Glavni mikrobiološki cilj u čuvanju hrane na niskim temperaturama je sprječavanje ili smanjivanje rasta mikroorganizama. Niska temperatura također smanjuje i sprječava katalitičku aktivnost enzima, posebno termostabilne proteinaze i lipaze. Smanjeno je i klijanje spora (RAY i BHUNIA, 2013.).

2.6.1. Mehanizam hladno-inducirane inaktivacije

Metabolička aktivnost, enzimatske reakcije i stopa rasta mikroorganizama su najveće na optimalnoj temperaturi rasta. Sa smanjenjem temperature smanjuje se i rast mikroorganizama. U normalnim uvjetima, vrijeme generacije, unutar određenog razmaka, poduplava se smanjenjem svakih 10 °C. Tako vrstama koje se dijele svakih 60 minuta u hrani na 22 °C trebat će 120 minuta da se podijele ako temperaturu spustimo na 12 °C. Na nižim temperaturama, vrijeme dijeljenja može biti i dulje od dva puta. Na primjer, ako je temperatura snižena s 12 °C na 2 °C i određena vrsta može rasti na 2 °C, generacijsko vrijeme te vrste može biti više od 240 minuta. Zaostajanje u rastu, eksponencijalne faze i germinativno vrijeme (spora) nekih psihrotrofa postaju sve duži kako se temperatura smanjuje na 0 °C do -1°C. (RAY i BHUNIA, 2013.).

Na temperaturi iznad smrzavanja vode ($\leq -2^\circ$), različite vrste bakterija, plijesni i kvasaca mogu rasti u hrani. Zaostajanje i eksponencijalna faza rasta postaju duži kako se temperatura smanjuje. U malom rasponu, promjena za manje od 1 °C može biti vrlo važna. Za *Pseudomonas fluorescens* je određeno vrijeme generacije na otprilike 6,7 sati na 0,5 °C, ali 32,2 sata na 0°C. Tako je smanjenje od 0,5 °C povećalo generacijsko vrijeme 4,5 puta. Ovo je mnogo više od teoretske procjene da se generacijsko vrijeme povećava dva puta smanjenjem svakih 10 °C. Spore nekih *Bacillus* i *Clostridium* spp. koje uzrokuju kvarenje mogu klijeti na temperaturama hladnjaka (RAY i BHUNIA, 2013.).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje

Za potrebe istraživanja uzorkovane su unutarnje površine hladnjaka za čuvanje hrane iz 25 kućanstava. Po uzorkovanju su uzeta tri brisa. Prije uzorkovanja vlasnici su obavješteni o planu i vremenu uzorkovanja, a svoj pristanak su potvrdili potpisom u obrazac.

Primijenjeni su sterilni brisovi, a uzorkovano je po 25 cm² površina hladnjaka na kojoj je čuvana hrana. Prilikom uzorkovanja izmjerena je temperatura u hladnjaku umjerenim termometrom. Bris je dopremljen na analizu u mikrobiološki laboratorij Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta u roku 12 sati od uzorkovanja.

3.2. Mikrobiološka obrada uzoraka

Radi određivanja broja mikroorganizama u 1 ml obriska, u bris je dodano 10 ml slane peptonske vode te je napravljena homogenizacija i daljnja serijska razrjeđenja. Utvrđivan je broj *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas* spp., enterobakterija, enterokoka, kvasaca i plijesni te psihrofilnih bakterija.

Nakon homogenizacije i serijskih razrjeđivanja uzet je 1 ml ili 0,1 ml inokuluma na hranjive podloge: Plate Count Agar (BioMerieux, Francuska) za psihrofilne bakterije uz inkubaciju 10 dana na 6.5 °C, VRBG agar (Merck, Njemačka) za enterobakterije uz inkubaciju 24 sata na 30 °C, CIN agar (Merck, Njemačka) za *Y. enterocolitica* tijekom 24 h na 30 °C, cetrimidni agar (Merck, Njemačka) za *Pseudomonas* spp. tijekom 48 h na 25 °C, Compass Enterococcus agar (Biorad, SAD) za enterokoke tijekom 37 h na 44 °C, i YGC agar (Merck, Njemačka) za kvasce i plijesni tijekom 72 h na 25 °C.

Određivana je prisutnost *Salmonella* spp. dodavanjem 10 ml puferirane peptonske vode (Biorad, SAD). Nakon inkubacije od 24 h na 37 °C prebačeno je 1 ml u 10 ml Rappaport Vasiliadis bujona (Biorad, SAD). Po inkubaciji na 41.5 °C tijekom 24 h izvršeno je naciepljivanje na XLD agar (Biolife, Italija) koji je potom inkubiran tijekom 24 h na 37 °C. *Listeria* spp. određivana je dodavanjem 10 ml Half-Fraser bujona (Biorad, SAD) u bris što je inkubirano tijekom 24 h na 30 °C. Potom je 0,1 ml kulture prebačeno u 10 ml Fraser bujona, inkubirano 48 h na 37 °C i naciepljeno na ALOA agar (24 h na 37 °C).

3.3. Očitavanje rezultata

Nakon provedenih inkubiranja provedena su očitavanja rezultata u smislu provjere porasta i morfologije kolonija na selektivnim agarima za *Salmonella* spp. i *Listeria* spp. Porasle kolonije na preostalim agarima su izbrojene te je izračunat broj mikroorganizama (N) u 1 ml brisa prema formuli:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

gdje je:

$\sum C$ - zbroj prebrojanih kolonija poraslih mikroorganizama na dvije petrijeve zdjelice od dva uzastopna razrjeđenja, od kojih najmanje jedna sadrži 10 kolonija;

V - volumen inokuluma (ml);

d - faktor razrjeđenja - prvo (najniže) razrjeđenje (iz kojeg su prebrojane kolonije) (10^{-n}); kada se koristi tekući testni uzorak – nerazrijeđen $d=1$

1,1 – faktor razrjeđenja koji se uzima kod dva uzastopna razrjeđenja (svako po 1 petrijeva zdjelica)

Nakon toga izračunat je broj mikroorganizama po cm^2 koristeći formulu:

$$\frac{N \times F}{A} \times D = \text{cfu/cm}^2$$

gdje je:

N – broj cfu u 1 ml otopine

F - količina dodane otopine (10 ml)

A - uzorkovana površina (100 cm^2)

D - recipročna vrijednost faktora razrjeđenja

3.4. Statistička obrada

Rezultati su obrađeni metodama deskriptivne statistike (Excell, 2013). Statistički je provjerena povezanost broja mikroorganizama s temperaturom hladnjaka testom korelacije (r).

4. REZULTATI

Tablica 2. Rezultati mikrobiološke pretrage (CFU/cm²) obrisaka unutarnjih površina hladnjaka za čuvanje hrane u kućanstvima

| Oznaka uzorka | <i>Salmonella</i> spp. | <i>Listeria</i> spp. | Enterokoki | <i>Y. enterocolitica</i> | Psihrofilni | <i>Pseudomonas</i> spp. | Kvasci plijesni | Enterobakterije |
|---------------|------------------------|----------------------|------------|--------------------------|-------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| 1 | neg | neg | <10* | neg | <1 | <10* | <10 | <1 |
| 2 | neg | neg | <10 | neg | 1 | <10 | <10 | <1 |
| 3 | neg | neg | <10 | neg | 1 | <10 | <10 | <1 |
| 4 | neg | neg | <10 | neg | 77 | <10 | 280 | <1 |
| 5 | neg | neg | <10 | neg | 1.5 | <10 | 6 | <1 |
| 6 | neg | neg | <10 | neg | 126 | <10 | 30 | 2.6 |
| 7 | neg | neg | <10 | neg | 3 | <10 | 2 | <1 |
| 8 | neg | neg | <10 | neg | 20 | <10 | <10 | <1 |
| 9 | neg | neg | <10 | neg | 3 | <10 | 10 | <1 |
| 10 | neg | neg | <10 | neg | 2 | <10 | 10 | <1 |
| 11 | neg | neg | <10 | neg | 1 | <10 | 3 | <1 |
| 12 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |
| 13 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | 0.1 | <1 |
| 14 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |
| 15 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |
| 16 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |
| 17 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |
| 18 | neg | neg | <10 | neg | 10 | <10 | <10 | <1 |
| 19 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | 0.5 | <1 |
| 20 | neg | neg | <10 | neg | 141 | <10 | 0.4 | <1 |
| 21 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |
| 22 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | 0.1 | <1 |
| 23 | neg | neg | <10 | neg | 38 | <10 | <10 | <1 |
| 24 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |
| 25 | neg | neg | <10 | neg | <1 | <10 | <10 | <1 |

* <10 CFU/ml - uzeto kao pokazatelj negativnog nalaza u brisu (CFU/cm²)

Iz tablice 2 vidljivo je da s površina hladnjaka za hranu nisu izolirane *Salmonella* spp., *Listeria* spp. ni *Y. enterocolitica*. Broj enterokoka i *Pseudomonas* spp. bio je ispod granica detekcije metoda (<10 CFU/ml) što je uzeto kao pokazatelj negativnog nalaza u brisu (CFU/cm²). Psihrofilne bakterije utvrđene su u 13 obrisaka (52 % hladnjaka), a njihov se broj kretao u rasponu od 1 do 141 kolonije po cm². Kvasci i plijesni su utvrđene u 11 obrisaka (44 % hladnjaka) i njihov se broj kretao od 0,1 do 280 CFU/cm². Obje skupine mikroorganizama, odnosno psihrofilne bakterije i gljivice su istovremeno bile prisutne u osam hladnjaka (Tablica 3). Enterobakterije su pronađene na površini jednog hladnjaka u broju 2,6 CFU/cm².

Tablica 3. Vrijednosti temperature izmjerene u hladnjacima tijekom uzimanja obrisaka, te broj psihrofilnih bakterija i gljivica (CFU/cm²)

| Oznaka uzorka | T (°C) | Psihrofilni | Kvasci i plijesni |
|---------------|--------|-------------|-------------------|
| 1 | 8,2 | <1 | <10 |
| 2 | 7,3 | 1 | <10 |
| 3 | 8 | 1 | <10 |
| 4 | 3,5 | 77 | 280 |
| 5 | 8,3 | 1.5 | 6 |
| 6 | 6,4 | 126 | 30 |
| 7 | 6,4 | 3 | 2 |
| 8 | 4,7 | 20 | <10 |
| 9 | 8,5 | 3 | 10 |
| 10 | 7,2 | 2 | 10 |
| 11 | 6,7 | 1 | 3 |
| 12 | 7,5 | <1 | <10 |
| 13 | 6,2 | <1 | 0.1 |
| 14 | 9,0 | <1 | <10 |
| 15 | 4,7 | <1 | <10 |
| 16 | 3,5 | <1 | <10 |
| 17 | 1,0 | <1 | <10 |
| 18 | 6,0 | 10 | <10 |
| 19 | 5,0 | <1 | 0.5 |
| 20 | 8,0 | 141 | 0.4 |
| 21 | 4,0 | <1 | <10 |
| 22 | 7,2 | <1 | 0.1 |
| 23 | 11,3 | 38 | <10 |
| 24 | 8,5 | <1 | <10 |
| 25 | 7,0 | <1 | <10 |

Tablica 4. Deskriptivna statistika broja mikroorganizama (CFU/cm²) i temperature hladnjaka (°C)

| | Temperatura | Psihrofilni | Kvasci i plijesni |
|----------------|-------------|-------------|-------------------|
| X | 6,56 | 32,65 | 31,1 |
| SD | 2,18 | 49,82 | 83,01 |
| Min-Max | 1-11,3 | 1-141 | 0,1-280 |
| Median | 7 | 3 | 3 |

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem pokazalo se da je mikrobiološka čistoća hladnjaka za čuvanje hrane u pretraženim domaćinstvima zadovoljavajuća. Tome ide u prilog odsutnost najvažnijih patogena *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica*. Pretpostavka mogućnosti nalaza *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* temelji se na njihovoj psihrotrofnosti, odnosno sposobnosti rasta na temperaturama hladnjaka. Također, pokazatelji onečišćenja - enterobakterije i enterokoki nisu utvrđeni, osim jednog hladnjaka (enterobakterije). S druge strane, varijabilna populacija psihrofilnih bakterija i gljivica je prisutna u približno pola pretraženih hladnjaka što ukazuje na moguće propuste u održavanju higijene skladištenja hrane. YE i sur. (2019.) su na površinama hladnjaka utvrdili ukupni broj bakterija od 3.18–7.82 log CFU/100 cm², psihrotrofnih bakterija 2.37–8.13 log CFU/100 cm², a gljivica 3.57–7.46 log CFU/100 cm² što pokazuje veliku varijabilnost mikrobne populacije utvrđene i u našem istraživanju.

Niz različitih patogenih bakterija su pronađene u kuhinjama i na specifičnim pozicijama, poput ručke vrata hladnjaka koje su najčešći izvor (HAYSOM i SHARP, 2006.; AZEVEDO i sur., 2005.). Stoga je uloga hladnjaka u trovanjima hranom u kućanstvima postala zadnjih godina česta tema istraživanja, a poznato je da su *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* jedine patogene bakterije iz hrane sposobne rasti ispod 5 °C. Naši rezultati u pogledu nalaza patogena u hladnjacima suglasni su većini istraživanja koji pokazuju njihovu nisku incidenciju u unutrašnjosti hladnjaka (JAMES i sur., 2016.). Ipak, MACÍAS-RODRÍGUEZ i sur. (2013.) izvješćuju o čestom nalazu *L. monocytogenes* (20,5 – 59,5 %) i *Salmonella* spp. (8 – 32,5 %) u hladnjacima na području Meksika. Pri usporedbama ovakvih istraživanja treba u obzir uzeti demografske, kulturološke i socijalne čimbenike koje se znatno razlikuju u različitim regijama svijeta. KENNEDY i sur. (2005.) su utvrdili da je veća incidencija patogena i veći broj aerobnih bakterija u hladnjacima urbanih sredina u odnosu na kućanstva ruralnog područja, kao i da je nalaz patogenih bakterija u hladnjacima vjerojatniji u kućanstvima s mlađim ukućanima (<25 godina). U našem istraživanju nismo uspoređivali rezultate s obzirom na podrijetlo uzorka (adresu kućanstva) jer su svi bili na području Zagreba, ali se većinom radilo o studentskoj populaciji.

Istraživanja povezanosti čistoće hladnjaka te ostalih uvjeta u hladnjaka s pojavom trovanja hrane su oskudna, ali sugeriraju mogućnost pozitivne korelacije (JAMES i sur., 2016.). Osim opće higijene i sanitacije hladnjaka kao preduvjeta nalaza mikroorganizama, njihov je rast ovisan o temperaturi. U našem istraživanju temperature hladnjaka u

kućanstvima su se kretale od 1 pa sve do 11,3 °C. Opsežan pregled temperatura hladnjaka u kućanstvima proveli su JAMES i sur. (2016.) te navode ukupnu ponderiranu aritmetičku srednju vrijednost srednjih temperatura izmjerenih u svijetu oko 6,1 °C i da preko 50 % hladnjaka djeluju na srednjoj temperaturi iznad ove. Obično se preporuča da hladnjak treba hladiti na temperaturama između 0 i 5 °C. S obzirom na te preporuke, u našem istraživanju tek je sedam hladnjaka radilo u tom rasponu. Srednja vrijednost temperature hladnjaka u našem je istraživanja (6,56 °C) bila nešto iznad svjetskog prosjeka, no razvidne su velike oscilacije odnosno širok raspon izmjerenih vrijednosti. Posebno se širok raspon vrijednosti vidi i u broju psihofilnih bakterija te gljivica, dok im je prosječan broj po cm² podjednak. S tim u vezi, povezanost temperature s brojem psihofilnih bakterija i gljivica nije statistički potvrđena, dok su međusobno slabo korelirali broj gljivica i psihofilnih bakterija. Mjerenja temperature u našem istraživanju provedena su jednokratno prilikom uzorkovanja, te u obzir nisu uzete moguće oscilacije u temperaturama istog hladnjaka, što je uobičajeno i uvjetovano frekvencijom otvaranja vrata i dr. Ankete o temperaturama hladnjaka su pokazale da temperaturne fluktuacije u hladnjacima slične srednje temperature mogu biti vrlo različite no ne postoje istraživanja dinamike rasta i preživljavanja patogenim bakterija u hladnjacima u kućanstvu (JAMES i sur., 2016.).

6. ZAKLJUČCI

Mikrobiološka čistoća unutrašnjih površina hladnjaka u smislu sigurnosti potrošača je zadovoljavajuća zbog odsustva patogenih bakterija *L. monocytogenes* i *Y. enterocolitica* koje rastu na temperaturama hlađenja hrane. U onečišćenim hladnjacima prisutne su psihrofilne bakterije te kvasci, a njihov broj kao i temperature hladnjaka kreću se u širokim rasponima što je vjerojatno posljedica različitosti navika i životnog stila vlasnika kućanstava.

7. LITERATURA

1. AZEVEDO, I., M. REGALO, C. MENA, G. ALMEIDA, L. CARNEIRO, P. TEIXEIRA, T. HOGG, P.A. GIBBS (2005.): Incidence of *Listeria monocytogenes* in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control*, 16, 121-124.
2. CHINTALAPATI, S., M. D. KIRAN, S. SHIVAJI (2004.): Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell. Mol. Biol.*, 50, 631 – 642.
3. DURAKOVIĆ, S., DELAŠ, F., STILINOVIĆ, B., DURAKOVIĆ, L. (2002.): Moderna mikrobiologija namirnica, knjiga prva.
4. GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J. B., CHRISTENSEN, A. B., GIVSKOV, M. (2002.): Food spoilage: interactions between food spoilage bacteria, *Int. J. Food Microbiol.*, 78, 79.
5. HAYSOM, I. W. , A. K. SHARP. (2005.): Bacterial contamination of domestic kitchens over a 24-hours period. *Brit. Food J.* 107, 453 – 466.
6. JAMES, C., B. A. ONARINDE, S. J. JAMES (2016.): The use and performance of household refrigerators: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 160 – 179.
7. KENEDDY, J., V. JACKSON, I.S. BLAIR, D.A. MCDOWELL, C. COWAN, D.J. BOLTON (2005.): Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *J. food prot.* 68, 1421-1430.
8. KRAFT A. A. (1992.): Psychotrophic bacteria in foods. Health hazard vs. food spoilage, str. 113.
9. MACIAS-RODRIGUEZ, M.E., V. HAVARRO-HIDALGO, J.R. LINARES-MORALES, M.A. OLEA-RODRIGUEZ, A. VILLARUEL-LOPEZ, J. CASTRO-ROSAS, C.A. GOMEZ-ALDAPA, M.R. TORRES-VITELA (2013.): Microbiological safety of domestic refrigerators and the dishcloths used to clean them in Guadalajara, Jalisco, Mexico. *J. Food prot.* 76, 984 – 990.
10. MOSS, M. O. (2008.): Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables, *J. Appl. Microbiol.*, 104, 1239-1243.
11. RAY, B., A. BHUNIA (2013.): Fundamental food microbiology. Important factors in microbial food spoilage 245, 248-249. Control by low temperature 459, 460-464.

12. RAY, B. (1992.): Food biopreservatives of microbial origin. Foods and microorganisms of concern str. 25.
13. SAMARDŽIJA, D. , ZAMBERLIN, Š., POGAČIĆ, T. (2012.): Psihrotrofne bakterije i njihovi negativni utjecaji na kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda. Mljekarstvo 62 (2), 77-95.
14. SCHINIK, B. (1999.): Biology of Prokaryotes. Habitats of Prokaryotes, 763-801.
15. SINELL, H. J. (1980.): Microbial ecology of foods, vol. 1. Interacting factors affecting mixed populations str. 215.
16. STRATFORD, M. (2006.): Food and beverage spoilage yeasts. U: Yeast in food and beverages. Querol, A., G. Fleet (ur.), Spriger, str. 335-379.
17. YE, K., J. WANG, Y. HAN, C. WANG, C. QI, X. GE (2019): Investigation on microbial contamination in the cold storage room of domestic refrigerators, Food Control, 99, 64-67.

8. SAŽETAK

U radu je istražena mikrobiološka čistoća unutrašnjih površina hladnjaka za čuvanje hrane u kućanstvima. Obrisci su uzeti u 25 hladnjaka te je određivana prisutnost *Salmonella* spp. i *Listeria* spp. te broj *Y. enterocolitica*, psihofilnih bakterija, kvasaca i plijesni, enterokoka, enterobakterija i *Pseudomonas* spp. *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Y. enterocolitica*, *Pseudomonas* spp. i enterokoki nisu izolirani. Psihofilne bakterije utvrđene su u 13 obrisaka (52 % hladnjaka), a njihov se broj kretao u rasponu od 1 do 141 kolonije po cm². Kvasci i plijesni su utvrđene u 11 obrisaka (44 % hladnjaka) u broju od 0,1 do 280 CFU/cm². Enterobakterije su pronađene na površini jednog hladnjaka u broju 2,6 CFU/cm². Temperature hladnjaka kretale su se u rasponu od 1 do 11,3 °C uz srednju vrijednost od 6,56 °C. Nije utvrđena povezanost temperature hladnjaka s brojem psihofilnih bakterija i gljivica. Varijabilnost mikrobnih populacija i temperaturnog režima hladnjaka vjerojatno je posljedica različitosti navika i životnog stila vlasnika kućanstava.

Ključne riječi: hladnjak u kućanstvu, mikrobiološka čistoća, temperatura

9. SUMMARY

MICROBIAL CONTAMINATION OF FOOD REFRIGERATORS IN HOUSEHOLDS

The paper investigates the microbiological cleanliness of the inner surfaces of refrigerators for storing food in households. Swabs were taken in 25 refrigerators and the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. and the number of *Y. enterocolitica*, psychophilic bacteria, yeasts and molds, enterococci, enterobacteria and *Pseudomonas* spp. were evaluated. *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Y. enterocolitica*, *Pseudomonas* spp. and enterococci were not isolated. Psychophilic bacteria were found in 13 swabs (52% of samples), and their number ranged from 1 to 141 CFU/cm². Yeasts and molds were found in 11 swabs (44%) in numbers from 0.1 to 280 CFU/cm². Enterobacteria were found on the surface of one refrigerator at 2.6 CFU/cm². Refrigerator temperatures ranged from 1 to 11.3 °C with a mean value of 6.56 °C. The correlation of refrigerator temperature with the number of psychophilic bacteria and fungi has not been found. The variability of microbial populations and temperature regime of refrigerators was probably due to the diversity of habits and lifestyles of household owners.

Key words: food refrigerators, households, microbial contamination, temperature

10. ŽIVOTOPIS

Kristina Vujić rođena je 18. kolovoza 1991. godine u Splitu. Osnovnu školu završila je u Visu kao i opću gimnaziju u srednjoj školi Antun Matijašević Karamaneo. Veterinarski fakultet u Zagrebu upisala je 2010. godine, a apsolvirala 2020. godine.