

MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST LEDA U UGOSTITELJSKOM OBJEKTIMA NA PODRUČJU PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE

Hajdarević, Belma

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:667450>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Belma Hajdarević

MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST LEDA U UGOSTITELJSKIM OBJEKTIMA NA
PODRUČJU PRIMORSKO – GORANSKE ŽUPANIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Belma Hajdarević

MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST LEDA U UGOSTITELJSKIM OBJEKTIMA NA
PODRUČJU PRIMORSKO – GORANSKE ŽUPANIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: Doc.dr.sc. Dijana Tomić Linšak, dipl. sanit. ing.

Diplomski rad obranjen je dana 24. rujna 2019. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.
2. izv. prof. dr. sc. Sandra Pavičić Žeželj, dipl. sanit. ing.
3. doc. dr. sc. Dijana Tomić Linšak, dipl. sanit. ing.

Rad ima 39 stranica, 19 slika, 2 tablice, 30 literaturnih navoda.

SAŽETAK

Led, kruta tvar nastala smrzavanjem tekućeg ili plinovitog oblika vode pri temperaturi od 0°C, zbog svoje široke uporabe u ugostiteljstvu i mogućnosti zaraze čovjeka ima izniman javnozdravstveni značaj te je upravo zbog toga potrebno osigurati njegovu mikrobiološku ispravnost. Provedenim istraživanjem prikazani su rezultati mikrobiološke analize uzoraka leda uzorkovanih na području Primorsko – goranske županije, popularnog turističkog odredišta. Istraživanje se sastojalo od uzorkovanja leda u sterilne staklenke, popunjavanja anketnog upitnika te mikrobiološke analize uzoraka prema preporučenim parametrima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu iz 2011. godine, a provedeno je tijekom proljetnih i ljetnih mjeseci 2018. godine. Cilj istraživanja bio je mikrobiološkom analizom utvrditi sukladnost uzoraka leda s parametrima navedenog Vodiča te na temelju dobivenih rezultata i rezultata ankete dobiti uvid u moguće uzroke kontaminacije nesukladnih uzoraka i načine sprječavanja istog u budućnosti. Rezultati su pokazali da je od 91 uzroka, njih čak 39 nesukladno. Kako to čini gotovo polovinu uzoraka, rizik od pojave bolesti poput gastroenteritisa je značajan te je potrebno daljnje provođenje sličnih istraživanja, ne bi li se time postigla viša razina higijenske prakse ugostiteljskih objekata, kao i potaknulo stvaranje zakonske regulative koja bi olakšala uzorkovanje i analizu leda stručnjacima te naposljetku osigurala njegovu dostatnu mikrobiološku kvalitetu.

Ključne riječi: voda, led, ugostiteljstvo, mikrobiologija, zakonodavstvo.

SUMMARY

Ice, also known as solid matter of liquid or gaseous water formed at the temperature of 0°C, has an immense public health significance because of its often usage in food and drinking establishments and subsequently potential risk of causing outbreaks in human population. That's why it is important to ensure its microbiological quality. Conducted research represented the results of microbiological analysis of sampled ice in Primorje – Gorski kotar County, a popular tourist destination. Consisting of ice sampling, filling in the questionnaire and microbiological analysis of samples according to recommended parameters of Guidance on microbiological food criteria, 2011, this study was carried out throughout the spring and summer months of 2018. The aim of the research was to determine whether or not the results of the microbiological analysis are compatible with the values of the said Guidance, combine it with the results of the questionnaire and finally, gain insight into potential contamination cause of incompatible samples, what would eventually help preventing of same in the future. The results showed that almost half of the samples, actually 39 out of total 91 were unsuited to the parameters. Therefore, the risk of disease outbreaks like gastroenteritis is great and it is essential to engage in further similar studies in order to enhance good hygiene practice level in food and drinking establishments and encourage the creation of law regulations related to food grade ice.

Key words: water, ice, food and drinking establishments, microbiology, legislative.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Voda.....	1
1.2. Voda za ljudsku potrošnju	3
1.3. Led.....	6
1.4. Led kao namirnica	7
1.5. Mikrobiološki pokazatelji kvalitete leda i bolesti koje uzrokuju	8
1.5.1. Aerobne mezofilne bakterije	8
1.5.2. <i>Escherichia coli</i>	9
1.5.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.5.4. Enterokoki	11
1.5.5. Sulfitreducirajuće klostridije	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Materijali	16
3.2. Metode	17
4. REZULTATI.....	24
5. RASPRAVA	29
6. ZAKLJUČCI.....	33
7. LITERATURA	34
ŽIVOTOPIS	38
PRILOG I (ANKETNI UPITNIK).....	39

1. UVOD

U proljetnim i ljetnim mjesecima, led se upotrebljava u ugostiteljskim objektima kao sredstvo za rashlađivanje kako alkoholnih, tako i bezalkoholnih pića. Upravo zbog direktnog kontakta s pićem, a nerijetko i hranom, potrebno je osigurati mikrobiološku ispravnost leda na način da se proizvodi od vode dostatne kvalitete, odnosno vode za ljudsku potrošnju, priprema i skladišti u higijenskim uvjetima te da se njime pravilno rukuje kako ne bi došlo do njegove naknadne kontaminacije. Dakle, važno je da led kao namirnica ne sadrži biološke, kemijske ni fizičke opasnosti koje bi mogle predstavljati rizik za oboljenje čovjeka.

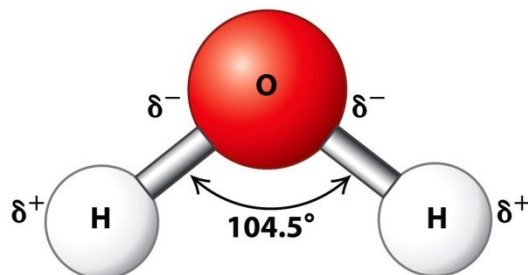
Područje Primorsko – goranske županije, a posebno njezini otoci, su u ljetnim mjesecima popularno turističko odredište. Stoga, u brojnim postojećim ugostiteljskim objektima, očekivana je velika konzumacija leda u pićima, što u slučaju odsustva dobre higijenske prakse i nedovoljnog monitoringa može dovesti do pojave epidemije bolesti poput gastroenteritisa.

1.1. Voda

Voda, poznata i po svojoj kemijskoj formuli H_2O , smatra se najmnogobrojnijim i najvažnijim kemijskim spojem na Zemlji bez čijeg kruženja u prirodi život ne bi bio moguć u postojećem obliku. Na sobnoj temperaturi je tekućina bez mirisa, boje i okusa, a osim u tekućem, javlja se i u krutom i plinovitom agregatnom stanju [1]. Važan je i sastavni dio živih organizama te zauzima oko 71% Zemljine površine [2].

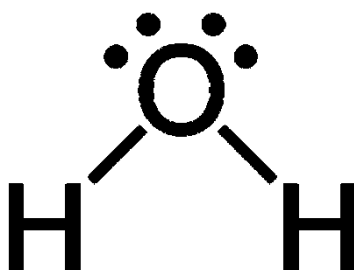
Iako je kemijska struktura molekule vode jednostavna, njena kemijska i fizikalna svojstva iznimno su neobična i složena [1]. Samu molekulu čine dva atoma kemijskog elementa vodika, na slici 1. prikazani bijelom bojom, koja su kovalentnim vezama vezani za jedan atom kisika, na slici prikazan crvenom bojom [3].

Molekula nije linearna nego su vodikovi atomi vezani na kisik pod kutem od $104,5^\circ$, a s obzirom da je atom kisika elektronegativniji od atoma vodika, veza između njih je polarna [4]. Stoga, kisik ima parcijalni negativni naboj (δ^-), dok vodici imaju parcijalno pozitivni naboj (δ^+) [1]. (Slika 1.)



Slika 1. Prikaz kemijske strukture molekule vode. [5]

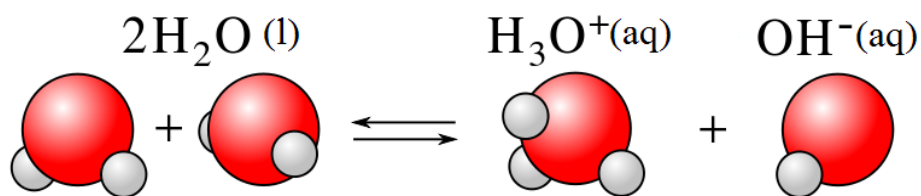
Također, atom kisika nosi šest elektrona u vanjskoj ljusci te kada tvori dvije jednostruke kemijske veze s vodicima, ostaju mu četiri nepodijeljena elektrona (na slici 2. prikazani kao parovi točkica). Zbog toga, međusobno molekule vode tvore vodikove veze koje su također iznimno polarne [4], što im, osim disocijacije iona u solima, omogućuje i razrjeđivanje drugih polarnih tvari, poput kiselina i alkohola, vezanjem za iste [1].



Slika 2. Prikaz podjele elektrona unutar molekule vode. [6]

Upravo je međusobno povezivanje vodikovim vezama odgovorno za jedinstvena svojstva vode, a samo neka od njih su anomalija vode, visoka temperatura vrelišta (100°C) s obzirom na malu molarnu masu te visok toplinski kapacitet [4].

Osim navedenog, voda je i amfoterna, odnosno, ovisno o pH otopine u kojoj se nalazi, može se ponašati kao kiselina (proton-donor) ili kao baza (proton-akceptor). Zbog tog svojstva ulazi u reakciju autoprotolize, gdje se jedna molekula vode ponaša kao kiselina, a druga kao baza [1]. Na slici 3. oznaka (*l*) predstavlja tekuće stanje, a (*aq*) vodenu otopinu, dok strelice u oba smjera kazuju da se navedena reakcija može odvijati u oba smjera i da kemijska ravnoteža postoji.



Slika 3. Prikaz kemijske reakcije autoprotolize vode. [7]

1.2. Voda za ljudsku potrošnju

Pitka voda, bila ona podzemna, površinska ili bunarska, bistra je, bez boje i mirisa te sadrži otopljeni ugljikov dioksid, kisik i topljive soli. Ukoliko sadrži patogene bakterije, organske tvari, amonijak, nitrite, željezne i manganove soli ili ostale štetne tvari, potrebno ju je pročistiti, najčešće dezinfekcijom klorom ili ozonom [5].

Zakon o vodi za ljudsku potrošnju (NN 56/13, 64/15, 104/17, 115/18) pitku vodu definira kao vodu za ljudsku potrošnju, a u članku 4. tog Zakona navodi se: „Voda namijenjena za ljudsku potrošnju je:

- a) sva voda koja je u svojem izvornom stanju ili nakon obrade namijenjena za piće, kuhanje, pripremu hrane ili druge potrebe kućanstava, neovisno o njezinom

porijeklu te neovisno o tome potječe li iz sustava javne vodoopskrbe, iz cisterni ili iz boca, odnosno posuda za vodu,

b) sva voda koja se rabi u industrijama za proizvodnju hrane u svrhu proizvodnje, obrade, očuvanja ili stavljanja na tržište proizvoda ili tvari namijenjenih za ljudsku potrošnju, osim ako nadležno tijelo ne utvrdi da kakvoća vode ne može utjecati na zdravstvenu ispravnost hrane u njezinom konačnom obliku.“ [8].

Zdravstvena ispravnost vode za ljudsku potrošnju redovito se prati i kontrolira sukladno Zakonu o vodi za ljudsku potrošnju (NN 56/13, 64/15, 104/17, 115/18) i Pravilniku o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnosti javne vodoopskrbe (NN 125/17) [9].

Parametri, njihove maksimalno dozvoljene koncentracije, učestalost uzorkovanja, kao i vrste te opseg analiza uzoraka vode za ljudsku potrošnju u vodoopskrbnim sustavima definirani su Pravilnikom. Sukladno tome, na području Primorsko – goranske županije, Odsjek za kontrolu voda za piće i voda u prirodi Zdravstveno – ekološkog odjela Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije redovito prati i ispituje fizikalno – kemijske, kemijske i mikrobiološke pokazatelje u vodi za ljudsku potrošnju (Tablica 1.) [9].

Tablica 1. Obvezni parametri ispitivanja u monitoringu vode za ljudsku potrošnju. [9]

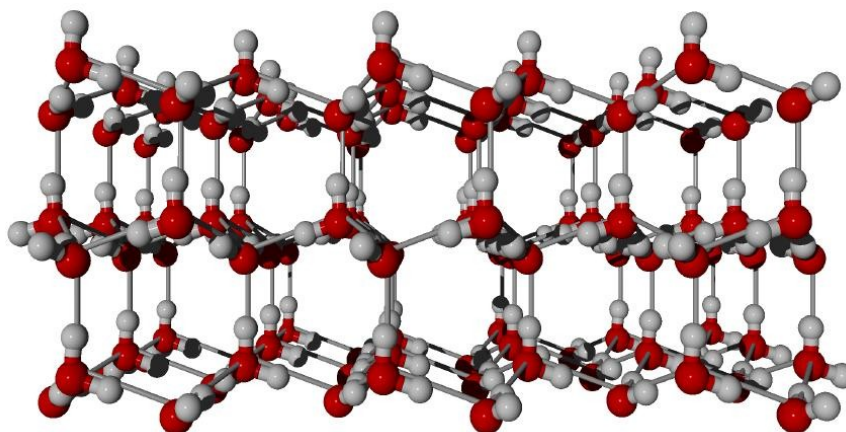
Pokazatelj	Maksimalno dozvoljena koncentracija	Mjerna jedinica
Fizikalno-kemijski i kemijski pokazatelji		
Boja	20	Mg/PtCo skale
Mutnoća	4	NTU
Okus	bez	-
Miris	bez	-
pH vrijednost	6,5 – 9,5	pH jedinica
Vodljivost	2500	$\mu\text{S}/\text{cm}/20^\circ\text{C}$
Amonij	0,50	mgNH_4/l
Nitriti	0,50	mgNO_2/l
Nitrati	50	mgNO_3/l
Kloridi	250	mg/l
Utrošak KMnO_4	5,0	mgO_2/l
Slobodni klor	0,5	mg/l
THM – ukupni	100	$\mu\text{g}/\text{l}$
Klorit, klorat	400	$\mu\text{g}/\text{l}$
Temperatura	25	$^\circ\text{C}$
Aluminij	200	$\mu\text{g}/\text{l}$
Željezo	200	$\mu\text{g}/\text{l}$
Arsen	10	$\mu\text{g}/\text{l}$
Mangan	50,0	$\mu\text{g}/\text{l}$
Mikrobiološki pokazatelji		
<i>Escherichia coli</i>	0	broj/100 ml
Ukupni koliformi	0	broj/100 ml
Enterokoki	0	broj/100 ml
Broj kolonija 22°C	100	broj/1 ml
Broj kolonija 36°C	100	broj/1 ml
<i>Clostridium perfringens</i> (uključujući spore)	0	broj/100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	broj/100 ml

1.3. Led

Led je kruto agregatno stanje vode, nastalo smrzavanjem njenog tekućeg ili plinovitog oblika pri 0°C. Prekriva mnoga područja Zemlje u raznim oblicima, pa tako na Antartici nalazimo ledenjake, dok u Kanadi nalazimo polarne kape, a u oceanima ledene sante. U iznimno hladnim područjima, poznato je i trajno smrznuto tlo koje se naziva permafrost [10].

Dok je interakcija molekula vode u plinovitom stanju neznatna, u tekućem i krutom stanju ona je gotovo stalna. Voda kao tekućina tvori lance molekula vezane slabim vodikovim vezama, a kao krutina tvori kristalnu rešetku u kojoj je svaki atom kisika okružen s četiri najbliža atoma vodika, s dva povezan kovalentnim, a s preostala dva vodikovim vezama [10].

(Slika 4.)



Slika 4. Prikaz strukture leda. [11]

Takva struktura čini led čvršćim, ali stanjem manje gustoće od tekuće vode te zbog toga pluta na površini, umjesto da potone. Takva pojava, zvana anomalija vode, iznimno je neobična, ali i važna za opstanak živih organizama [12].

1.4. Led kao namirnica

Osim što je prirodno prisutan u okolišu, led se može pripremljati i koristiti za rashlađivanje pića i hrane te za održavanje svježine namirnica poput ribe i ribljih proizvoda, osobito u ljetnim mjesecima [13].

S obzirom da je Vodičem za mikrobiološke kriterije za hranu Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja iz 2011. godine led definiran kao namirnica, mora biti kemijski i mikrobiološki siguran jer u suprotnom predstavlja potencijalni rizik za zdravlje čovjeka [14].

Led se može pripremljati na samom mjestu konzumacije ili industrijski nakon čega se pakira i transportira do krajnjeg potrošača [14]. Ukoliko se radi o prvom slučaju, tj. vlastitoj proizvodnji (što najčešće i je slučaj u ugostiteljskim objektima) [15], proizvodnja leda se provodi pomoću kalupa u ledenici ili uređaja za spravljanje leda – ledomata [16].

Svjetska zdravstvena organizacije navodi da led koji je namijenjen za konzumaciju ili je u neposrednom kontaktu s hranom, treba biti jednake kvalitete i jednako siguran za čovjeka kao voda za piće [17]. Stoga je za proizvodnju leda, prije svega, potrebno osigurati vodu prikladnu za ljudsku potrošnju, odnosno vodu kontroliranu i analiziranu na parametre iz tablice 1. [9], a ukoliko je njena kvaliteta upitna, potrebno ju je filtrirati i prokuhati [18, 19]. Također je potrebno educirati osoblje koje rukuje ledom o pravilnom pranju ruku, održavanju čistoće pribora koji dolazi u kontakt s njim, kao i o redovitoj i učinkovitoj sanitaciji ledomata, kako ne bi došlo do naknadne mikrobiološke kontaminacije [20].

Iako je u društvu uvriježeno mišljenje o zdravstvenoj ispravnosti i sigurnosti leda zbog njegove niske temperature i kiselosti pića u kojima se poslužuje, razna istraživanja su dokazala prisutnost patogena te uzročnika gastroenteritisa u kockama leda korištenim u ugostiteljstvu jer ih niske temperature ne eliminiraju u potpunosti nego samo smanjuju njihov

broj [17]. Samo neki od njih su bakterije *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* i *Pseudomonas aeruginosa* [14]. Dokazana je i bakterija *Escherichia coli* koja je znak nedavne fekalne kontaminacije [21]. Osim mikrobiološke kontaminacije uzrokovane djelovanjem čovjeka, led je podložan i okolišnoj kontaminaciji jer se nerijetko nalazi u neadekvatno spremljenim otvorenim posudama [22], a to potvrđuju dokazi bakterije *Clostridium perfringens* i njenih spora [20].

1.5. Mikrobiološki pokazatelji kvalitete leda i bolesti koje uzrokuju

Otpornost mikroorganizama na temperature pri kojima voda prelazi iz tekućeg u kruto agregatno stanje ovisi isključivo o njihovoj citoplazmatskoj membrani. Kako bi bakterijska stanica osigurala fluidnost membrane te time i preživjela smanjenje temperature, dolazi do promjene rasporeda lipida u membrani i funkcije membranskih enzima i transportera [23].

U dosad provedenim istraživanjima leda korištenog u ugostiteljskim objektima, između ostalih, pronađene su bakterije roda *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Pseudomonas* i *Yersinia* [20].

Sukladno Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja iz 2011. godine, led se analizira na pet preporučenih parametara:

1. aerobne mezofilne bakterije,
2. *Escherichia coli*,
3. *Pseudomonas aeruginosa*,
4. *Enterococcus spp.*,
5. sulfitreducirajuće klostridije [24].

1.5.1. Aerobne mezofilne bakterije

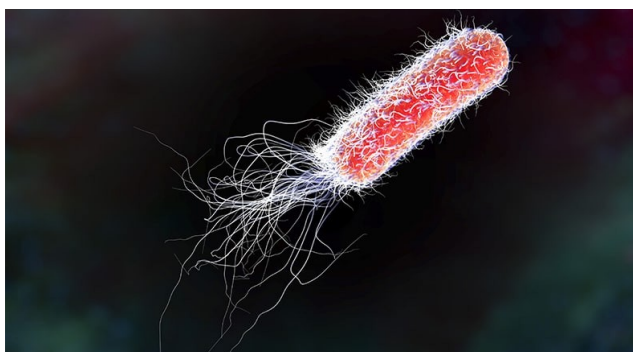
Kako im i samo ime kaže, aerobne mezofilne bakterije su one koje rastu u prisustvu zraka pri temperaturi od 20 do 45°C. Nalaze se u vodi, zraku i ljudskom organizmu, a većini

je upravo čovjekova tjelesna temperatura (37°C) optimalna. Dakle, ovoj skupini pripada većina patogenih bakterija [25].

Osim što povećan broj aerobnih mezofilnih bakterija ukazuje na lošu mikrobiološku kvalitetu raznih namirnica, indikatori su i loše higijenske prakse, tj. ukazuju na nedovoljno čišćenje i dezinfekciju [25].

1.5.2. *Escherichia coli*

Rod *Escherichia* ima pet poznatih vrsta, od kojih je *Escherichia coli* najznačajnija [26]. To je Gram negativni, asporogeni, fakultativno anaerobni štapić, koji fermentira ugljikohidrate pritom stvarajući plin [27]. (Slika 5.)



Slika 5. *Escherichia coli*. [28]

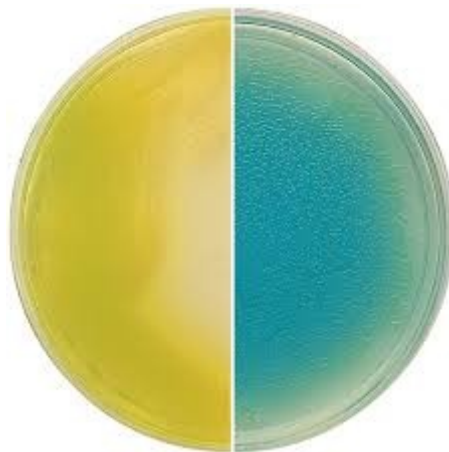
E. coli, koliformna bakterija, dio je normalne crijevne flore čovjeka od prvih dana rođenja te se javlja u fecesu svih sisavaca [26]. Lako se kultivira na uobičajenim hranjivim podlogama, a njen dokaz u uzorku primarni je indikator fekalne kontaminacije vode [27], pa je time i pokazatelj loše higijenske prakse u proizvodnji i distribuciji leda.

Sojevi karakteristični samo za čovjeka prenose se izravnim fekalno – oralnim putem, putem kontaminirane hrane i vode, a sojevi karakteristični za životinje i čovjeka na isti način ili izravnim kontaktom sa životinjama [26].

Iako su dio normalne flore čovjeka, neki sojevi prodorom u unutrašnjost uzrokuju infekcije što je čini oportunističkim patogenom. Oni posjeduju čimbenike virulencije karakteristične za razvoj gastroenteritisa – adhezine, endotoksine te čak i hemolizine [26].

1.5.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Rod *Pseudomonas* čine asporogene, aerobne, fermentativne, Gram negativne štapićaste bakterije. Zbog posjedovanja jednog ili više polarnih bičeva, pokretne su. Posjeduju i enzim oksidazu, koji je bitan za njihovo razlikovanje od enterobakterija koje navedeni enzim ne posjeduju. Stvaraju četiri pigmenta topiva u vodi: piocijanin – plavi pigment, pioverdin – žuti pigment, piorubin – crveni pigment i piomelanin – crni pigment [26]. (Slika 6.)



Slika 6. Pigmenti bakterije *P. aeruginosa*. Pioverdin (lijevo) i piocijanin (desno). [29]

Iako mogu rasti i razmnožavati se u raznim životnim uvjetima i prisutne su u gotovo svim medijima, preferiraju vlažni okoliš te optimalnu temperaturu u rasponu od 30°C do 37°C, što ih čini mezofilnim bakterijama [26].

Medicinski najznačajnija bakterija roda *Pseudomonas* je *P. aeruginosa*. Primarno je oportunistička bakterija, zbog čega se javlja uglavnom kod osoba oslabljene imunosti [26].

P. aeruginosa ima sposobnost invazije čovjekova organizma zbog mnogih čimbenika virulencije i toksičnosti, raste i razmnožava se u gotovo svim uvjetima te razvija rezistenciju

na razne antibiotike. Također, ima sposobnost preživljavanja u raznim tekućinama, pa čak i u dezinficijensima. Nerijetko se pronalazi i u umivaonicima, kadama i sanitarnim odvodima. Zbog *quorum – sensinga* sudjeluje u stvaranju biofilma, zajednica mikroorganizama koji oblažu mukozne površine, što im omogućava bolje uvjete za opstanak zbog gotovo nemoguće eradikacije. Može zahvatiti sve organske sustave čovjeka i pritom uzrokovati sepse i bakterijemije [26].

Lako raste na uobičajenim krutim hranjivim podlogama, zbog čega nije zahtjevna za uzgoj u laboratorijskim uvjetima, a u tekućim podlogama raste uglavnom pri površini zbog veće koncentracije kisika. Porastom na hranjivim podlogama stvara slatkast voćni miris, miris lipe [26].

1.5.4. Enterokoki

Enterokoki, još poznati kao fekalni streptokoki, su bakterije roda *Enterococcus* koji čini 16 vrsta [27]. Ranije su bile svrstani u rod streptokoka, no zbog svojih karakteristika koje uključuju jaču otpornost na fizikalne i kemijske agense, svrstane su u vlastiti rod [26].

To su Gram pozitivni, a katalaza negativni izduženi ovalni koki, koji rastu u prisutnosti visokih koncentracija žuči i natrijevog klorida. U prisutnosti žučnih soli, hidroliziraju eskulin što ih čini žuč – eskulin pozitivnima [27]. Fakultativni su anaerobi s fermentativnim metabolizmom te rastu i razmnožavaju se u rasponu temperatura od 10°C do 45°C, pri čemu je temperatura od 35°C do 37°C optimalna [26].

Perzistiraju gotovo svuda, u prirodi, biljkama, tlu, hrani, životinjama i čovjeku zbog karakteristika koje im omogućuju rast i opstanak u nepovoljnim uvjetima [26].

Dio su uobičajene flore probavnog sustava čovjeka, a broj im visoko kolerira s prisutnošću fekalnih, patogenih bakterija, ukupnih koliformnih bakterija i enterovirusa, zbog

čega su važna skupina bakterija u vrednovanju zdravstvene ispravnosti vode. Jedina negativna strana je ta što se u okolišu ne mogu dokazati pri temperaturama višim od 55°C [27].

Iako su nekada smatrani bezopasnima, danas su od iznimnog javnozdravstvenog i medicinskog značaja. Oportunistički su patogeni, zbog čega se gastrointestinalni sustav čovjeka smatra njihovim rezervoarom otkud se, u povoljnim uvjetima, dalje šire u druge organske sustave. Sposobnost stvaranja biofilma ističe se kao najvažniji čimbenik virulencije enterokoka, a poznata je i njihova rezistencija na često propisivane antibiotike [26].

Najčešće izolirane vrste u humanim uzorcima su *E. fecalis*, u 80 do 90% uzoraka, i *E. faecium*, u 5 do 10% uzoraka. Još se mogu izolirati *E. casseliflavus*, *E. durans* i *E. gallinarum* [26].

Infekcije uzrokovane enterokokima najčešće se javljaju u starijih, kronično bolesnih osoba te kod hospitaliziranih i imunokompromitiranih. Takve infekcije uglavnom nisu teške, ali ne postoji njihova jasna klinička slika [26].

1.5.5. Sulfitreducirajuće klostridije

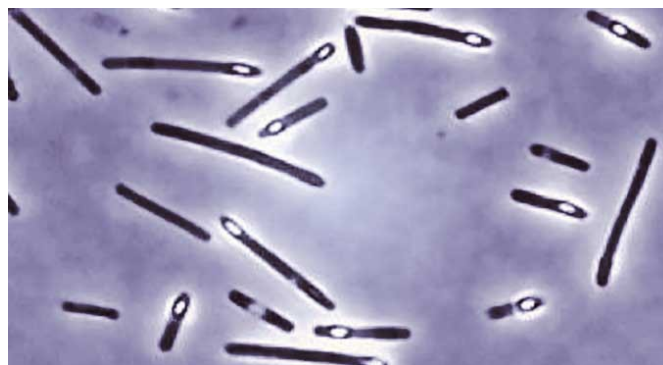
Sulfitreducirajuće klostridije čini grupa Gram pozitivnih štapića koji vrše redukciju sulfita do sulfida, pri čemu, zbog reakcije sa soli nekog teškog metala u hranjivoj podlozi, stvaraju crni talog koji se taloži na porasle bakterijske kolonije. Široko su rasprostranjene u okolišu zbog vlastitih spora koje imaju sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima i koriste se kao indikatori fekalne kontaminacije. Obligatni su anaerobi, zbog čega se moraju kultivirati na podlogama bez otopljenog kisika [27].

Dakle, anaerobne bakterije ne rastu na površini krutih podloga u prisutnosti kisika te ih većina pri izlaganju kisiku ugiba. To je posljedica nedostatka enzima katalaze i superoksid dismutaze jer kisikovi radikali u aerobnoj atmosferi inaktiviraju ostale enzime anaerobne bakterije i pritom uzrokuju njenu smrt. Samo pojedine bakterije mogu preživjeti pri niskim

koncentracijama kisika, što ih čini aerotolerantnim, a ne striktnim anaerobima. Iako su dio normalne flore sluznica i kože čovjeka, uzročnici su većine infekcija te se tako dijele na endogene uzročnike, koji mogu biti sporogeni i asporogeni anaerobi, i na egzogene uzročnike, koji su sporogeni anaerobi [26].

Klostridiji, tj. bakterije roda *Clostridium*, čine Gram pozitivni štapići koji su dio prirode i uobičajene flore gastrointestinalnog sustava čovjeka i životinja. Većinom su pokretni i imaju mogućnost stvaranja spora u nepovoljnim uvjetima, a tijekom sporulacije tvore oblik vretena [27]. Proizvode više proteinskih toksina od bilo kojeg drugog bakterijskog roda, koji zajedno s enzimima tvore čimbenike virulencije i sudjeluju u patogenezi infekcija. Ukoliko su uvjeti anaerobni, vrlo se brzo kultiviraju na standardnim hranjivim podlogama [26].

Clostridium perfringens, predstavnik sulfitreducirajućih klostridija, odnosno roda *Clostridium*, je aerotolerantni štapić čije su spore ovalne i smještene subterminalno, kako je prikazano na slici 7. Nema flagelu, pa stoga nije pokretan [27]. Brzo raste u tekućoj i na krutoj hranjivoj podlozi, pritom stvarajući zone hemolize. Tijekom rasta i razvoja stvara najmanje 12 toksina koji sudjeluju u razvoju infekcija, a najznačajniji sojevi ove vrste podijeljeni su u pet skupina, od A do E [26].



Slika 7. Prikaz bakterije *Clostridium perfringens* i njenih subterminalno smještenih spora.

[30]

Široko je rasprostranjen u prirodi, genitalnom sustavu žena i ljudskom gastrointestinalnom sustavu. Najčešći je klostridij koji uzrokuje infekcije u čovjeka, a do njih najčešće dolazi ingestijom namirnica koje su kontaminirane velikom količinom spora *C. perfringens* tipa A koji stvara enterotoksine. Simptomi takvog gastroenteritisa su jaki grčevi i dijareja, bez temperature i povraćanja, a javljaju se brzo zbog kratke inkubacije. Prolaze kroz 24 do 48 sati, bez liječenja [26].

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je u sklopu redovitog monitoringa ugostiteljskih objekata na području Primorsko – goranske županije uzorkovati led iz ugostiteljskih objekata uz dobrovoljno anketiranje te ga sukladno parametrima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja iz 2011. godine analizirati. Također, cilj je bio na temelju dobivenih laboratorijskih rezultata i rezultata ankete istražiti potencijalne uzroke eventualne kontaminacije uzorkovanog leda i načine kojima bi se to u budućnosti spriječilo.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Tijekom provođenja istraživanja, odnosno tijekom uzorkovanja, korištene su sterilne staklenke za pohranu uzoraka leda i temperirani spremnici (hladnjaci) za njihov transport. Također je korišten i anketni upitnik koji je prikazan u prilogu I.

Prilikom provedbe laboratorijske analize uzoraka korišteni su Sartorius uređaj za membransku filtraciju, filter papiri promjera pora 0,45 μm , Petrijeve ploče, jednokratne sterilne pipete, epruvete, Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja iz 2011. godine prema kojem su ispitani parametri prikazani u tablici 2., gdje n predstavlja broj elementarnih jedinica uzorka koji čine uzorak, c broj jedinica uzorka, u kojima se dobivene vrijednosti ispitivanja mogu nalaziti između „ m “ i „ M “, pri čemu se uzorak smatra prihvatljivim, ukoliko je dobivena vrijednost ispitivanja u ostalim jedinicama uzorka jednaka „ m “ ili manja od „ m “, m graničnu vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim, M graničnu dopuštenu vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim i *n.n.* nije nađeno. Korištene su i slijedeće čvrste hranjive podloge:

- Tryptic glucose yeast agar za dokazivanje aerobnih mezofilnih bakterija
- TBX agar za dokazivanje bakterije *E.coli*
- Pseudomonas Base/CN agar i Nutrijent agar za dokazivanje bakterije *Pseudomonas aeruginosa*
- Slanetz i Bartley medij i žučni-eskulin-azid agar za dokazivanje enterokoka
- Iron sulfit agar i krvni agar za dokazivanje sulfid reducirajućih klostridija.

Za pojedine dokazne testove korišteni su još acetamid broth, Nessler reagens i King's B medij.

Tablica 2. Preporučeni parametri za led Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja iz 2011. godine. [24]

	Hrana	Mikroorganizmi/njihovi toksini i metaboliti	Plan uzorkovanja		Kriteriji
10.8.	Led	Preporučeni			
		Aerobne mezofilne bakterije	5	0	$M \leq 10^2$ cfu/ml
		<i>Escherichia coli</i>	5	0	n.n. u 100ml
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	0	n.n. u 100ml
		<i>Enterococcus spp.</i>	5	0	n.n. u 100ml
		Sulfitreducirajuće klostridije	5	0	n.n. u 50ml

3.2. Metode

Proces uzorkovanja leda izveden je ručno, a budući da se testiraju mikrobiološki pokazatelji, pritom se pazilo na očuvanje aseptičnih uvjeta, postignutih prethodnom sterilizacijom staklenki korištenih u svrhu spremnika i kontroliranim rukovanjem istih kako ne bi došlo do nehotične kontaminacije. Spremnici za led nisu punjeni do kraja, a led je uzorkovan u duploj količini. Spremnik je po uzorkovanju čvrsto zatvoren te prenesen u transportni hladnjak i naposljetku transportiran u kontroliranim temperaturnim uvjetima do laboratorija u što kraćem roku.

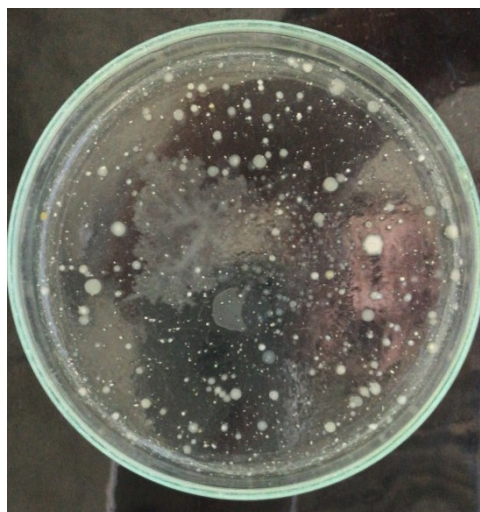
S obzirom da se led smatra kombinacijom hrane i pića, tj. vode, a ne postoje standardne, pripremljene metode za njegovu analizu, koriste se hranjive podloge propisane normama za namirnice te tehnika membranske filtracije propisana normama za vodu.

Kako je led ipak u ovom kontekstu hrana, prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu, kada postoji norma za hranu, ona se primjenjuje. Takve se norme primjenjuju za

aerobne mezofilne bakterije, *E.coli* i sulfitreducirajuće klostridije, dok za *P. aeruginosu* i enterokoke nema normi za hranu pa se primjenjuju norme vode.

Zaprimljeni uzorci obrađuju se odmah, a ukoliko je uzorak zamrznut, ostavlja se u hladnjaku (4°C do 8°C) do odmrzavanja.

Aerobne mezofilne bakterije određuju se metodom HRN EN ISO 4833-1:2013, HRN RN ISO 4833-2:2013. Tehnika ulijevanja se izvodi tako da se 1 ml uzorka ili njegovog razrjeđenja prenese u Petrijevu zdjelicu, prelije sa 15 – 20 ml otopljenog i na 45°C temperiranog Tryptic glucose yeast agara, hranjivom podlogom s visokom razinom hranjivih tvari (kazein, kvašćev ekstrakt, glukoza i agar) koja se koristi za analizu vode, hrane, zraka, mlijeka i mliječnih proizvoda, a služi za uzgoj aerobnih i fakultativno anaerobnih heterotrofnih organizama. Petrijeva zdjelica se pažljivo homogenizira kružnim pokretima te je veoma bitno da je cijelo vrijeme na čvrstoj i ravnoj površini. Vrijeme koje protekne između prijenosa uzorka u Petrijevu zdjelicu i ulijevanja kvašćevog agara ne bi smjelo biti dulje od 15 minuta. Nakon hlađenja agara, Petrijeva zdjelica se preokrene i inkubira. Petrijeva ploča inkubira se na 30°C±1 kroz 72 h±3 h, nakon čega se broje porasle kolonije, a krajnji rezultat izražava kao CFU po ml. (Slika 8.)



Slika 8. Porast aerobnih mezofilnih bakterija na Tryptic glucose yeast agaru.

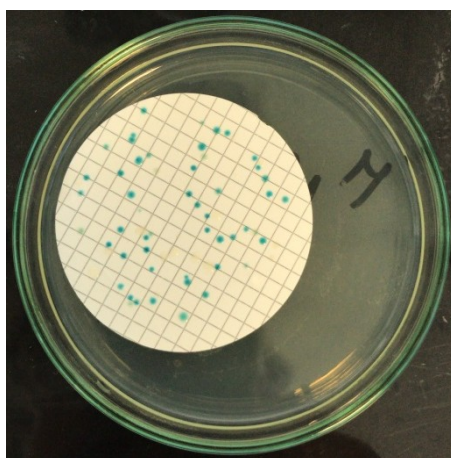
Ostali mikrobiološki parametri određuju se tehnikom membranske filtracije, koja je ujedno i kvalitativna i kvantitativna. Metoda membranske filtracije zasniva se na filtraciji poznatog volumena vode Sartorius uređajem, prikazanim na slici 9., kroz sterilne membranske filtere čiji je promjer pora takav da osigurava zadržavanje svih bakterija na filteru (primjenjuju se filteri promjera pora 0,45 µm). Svi dijelovi sustava za filtraciju koji dolaze u kontakt s uzorkom moraju biti sterilni. Uzorak se dobro homogenizira i spali grlo boce. Filtrira se 100 ml uzorka (odnosno potrebni alikvot uzorka). O očekivanoj gustoći bakterija u uzorku ovisi volumen uzorka uzet za filtraciju. Preporučuje se da broj kolonija bude u rasponu 20 i 80. Nakon filtracije, filter se sterilnom pincetom prenosi na čvrstu hranjivu podlogu (strana filtera s iscrtanim poljima okrene se prema gore, jer iscrtana polja olakšavaju brojanje kolonija), na način da se izbjegne zadržavanje mjehurića zraka ispod filtera. Sastav hranjive podloge definiran je primijenjenom metodom. Tijekom inkubacije Petrijeve ploče se preokrenu naopako, zbog sprječavanja zagađenja podloge uslijed nastanka kondenzata. Ploče se inkubiraju određeno vrijeme na definiranoj temperaturi (uvjeti su definirani u metodi koja se primjenjuje). Nakon inkubacije broje se tipične kolonije izrasle na filteru, a dobiveni se broj izražava u određenom volumenu vode. Tipične kolonije raspoznaju se po boji i morfološkim osobinama (boja, oblik, veličina, rubovi kolonija). Po potrebi, provode se dodatni potvrdni biokemijski testovi, a rezultate se izračunava na slijedeći način:

$$\text{Broj kolonija u 100 ml} = \text{broj izbrojanih kolonija} / \text{ml filtriranog uzorka} \times 100.$$



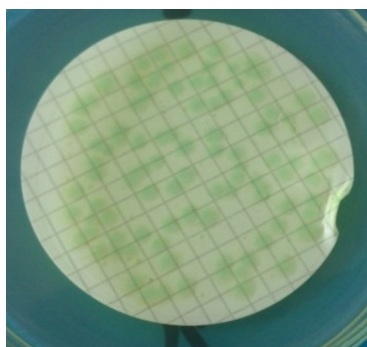
Slika 9. Sartorius uređaj za membransku filtraciju.

Escherichia coli određena je metodom HRN ISO 16649-2:2001, a provedena je na način da je uzorak inokuliran na selektivnu podlogu TBX i inkubiran pri $44^{\circ}\text{C} \pm 1$ na 18 do 24h. TBX agar je selektivna podloga za određivanje β -glukuronidaza pozitivne *E. coli* prisutne u hrani i hrani za životinje. Podloga sadrži žučne soli koje u potpunosti inhibiraju Gram pozitivne bakterije i X-GLUC za detekciju enzima β -glukuronidaze. Od svih enterobakterija, jedino *E. coli* i pojedini sojevi roda *Salmonella* i *Shigella* posjeduju navedeni enzim zbog čega na TBX agaru tvore plave kolonije (Slika 10.). Bakterije koje ne posjeduju navedeni enzim tvore bezbojne kolonije. Nakon inkubacije, ploče su ispitane na prisutnost tipičnih kolonija *Escherichia coli*, plave boje, te su porasle kolonije izbrojane.



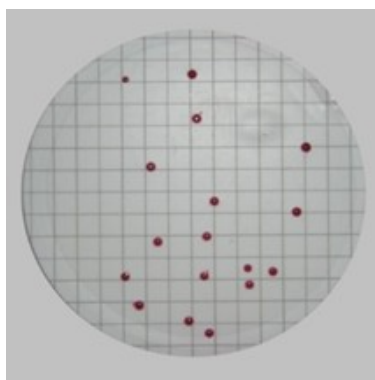
Slika 10. Porast kolonija bakterije *E. coli* na TBX agaru.

Za određivanje *Pseudomonas aeruginosa* primjenjivala se metoda HRN EN ISO 16266:2008. Nakon filtracije membranski filteri kultiviraju se na Pseudomonas Agar Base/CN-agar na $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ kroz (44 ± 4) h. Broje se karakteristične kolonije koje produciraju plavo/zelenu boju (piocijanin) kao dokaz *P. aeruginosa* (Slika 11.). Membranski filter je potrebno ispitati pod UV lampom pri čemu treba izbjegavati produženo izlaganje kolonija UV svjetlu (zbog štetnog djelovanja na bakterije). Sve suspektne ili najveći mogući broj suspektnih kolonija (koje fluoresciraju, a ne produciraju piocijanin i crvenkasto-smeđe kolonije) s CN-agara presađuju se na Nutrijent agar te inkubiraju tijekom (22 ± 2) h na $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$. Kolonije koje fluoresciraju, a ne produciraju piocijanin (nisu plave/zelene) broje se kao sumnjive na *P. aeruginosa* te identificiraju potvrdnim testom produkcije amonijaka upotrebom acetamid brotha. Porasle kolonije s Nutrijent agara se presađuju u epruvete s acetamid brothom te inkubiraju na $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ kroz (22 ± 2) h. Dodaju se 1-2 kapi Nesslerovog reagensa te se prati pojava amonijaka u epruvetama (žuta do ciglasto-crvena boja), što je potvrda prisustva *P. aeruginosa*. Crvenkasto-smeđe kolonije koje ne fluoresciraju broje se kao sumnjive na *P. aeruginosa*. Njihov identitet potvrđuje se slijedećim testovima: oksidaza testom, produkcijom amonijaka upotrebom acetamid brotha i pojavom fluorescencije na King's B mediju.



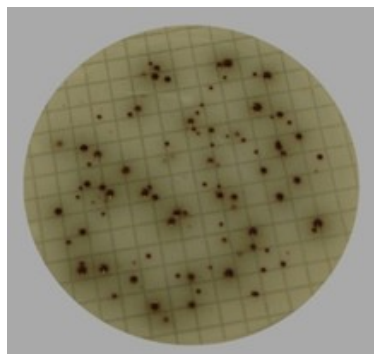
Slika 11. Kolonije bakterije *Pseudomonas aeruginosa* na CN agaru.

Crijevni enterokoki ispitani su metodom HRN EN ISO 7899-2:2000 kojom se detektiraju slijedeće vrste roda *Enterococcus*: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* i *E. hirae*. Membranski filter se prenese na Slanetz i Bartley medij. Medij sadrži natrij azid (NaN_3) koji inhibira rast Gram negativnih bakterija i indikator 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid (TTC otopina), koji crijevni enterokoki reduciraju u crveni formazan. Inkubacija se vrši na $36\pm 2^\circ\text{C}$ tijekom 44 ± 4 h. Tipične kolonije su uzdignute, crvene, smeđe ili ljubičaste boje u centru kolonija ili oko njih, kako je vidljivo na slici 12.



Slika 12. Kolonije crijevnih enterokoka na Slanetz i Bartley mediju.

Ukoliko tipične kolonije porastu, provodi se dokazni test. Filter se prenese na Žučni-eskulin-azid agar (engl. Bile Aesculin Agar) koji se inkubira 2 sata na 44°C . Crijevni enterokoki hidroliziraju eskulin do krajnjeg produkta 6,7-dihidroksikumarina koji s Fe^{3+} daje tamno do crno obojenu tvar koja difundira u medij te stvara crni halo. (Slika 13.)



Slika 13. Pozitivni potvrdni test crijevnih enterokoka na Žučnom-eskulin-azid agaru.

Sulfitreducirajuće klostridije dokazuju se metodom HRN ISO 15213:2004, filtracijom 50 ml uzorka, prenošenjem filtera u bočicu od 100 ml i dodavanjem 50 ml otopljenog Iron sulfite agara, ohlađenog na 44°C do 47°C. Vrijeme proteklo između prijena filtera i rastopljenog medija u bočicu ne smije biti duže od 15 min, a kada agar očvrstne, dolijeva se još 2 – 3 ml agara. Uzorak se inkubira pri 37±1°C tijekom 24 h – 48 h te se nakon inkubacije broje porasle kolonije koje su crne boje s mogućnošću formiranja crne zone, kako je prikazano na slici 14. Broje se kolonije u epruvetama u kojima je poraslo manje od 150 tipičnih i manje od 300 ukupnih kolonija, a krajnji rezultat se očitava kao broj CFU u 50 ml. Odabire se pet tipičnih kolonija i provode se potvrdni testovi. Respiratorni test se provodi prijenosom odabrane kolonije na krvni agar i inkubacijom u aerobnim uvjetima pri 37°C kroz 24 sata. Ukoliko su bakterije anaerobne, porast ne bi trebao biti vidljiv. Drugi potvrdni test je spore formirajući test koji uključuje mikroskopiranje kolonija kako bi se provjerilo formiranje spora.

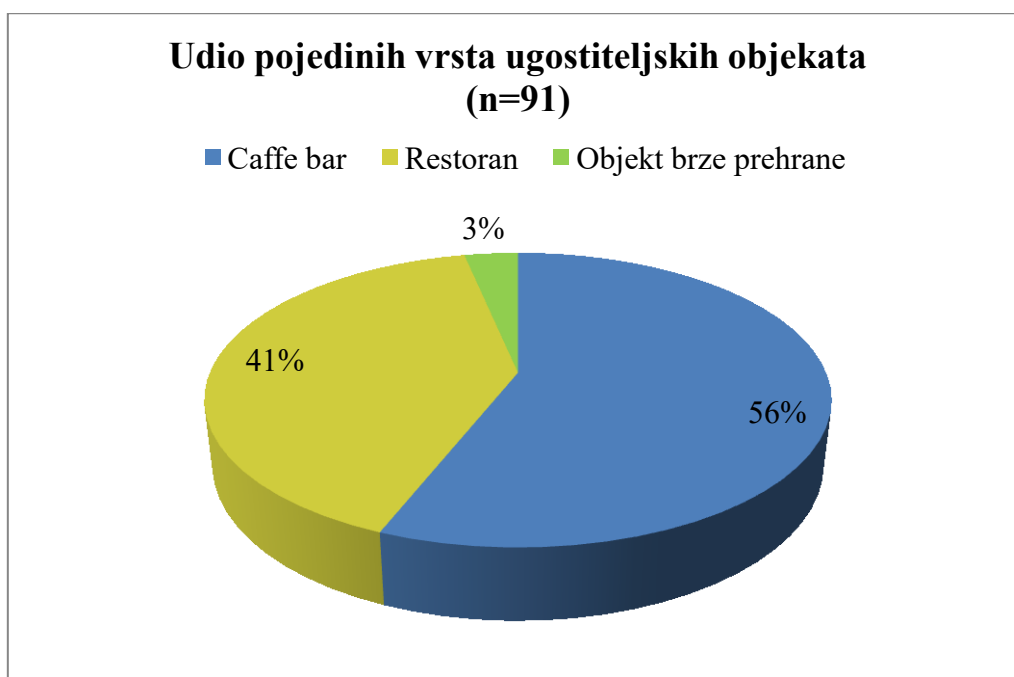


Slika 14. Porast kolonija bakterije *C. perfringens* u Iron sulfite agaru.

4. REZULTATI

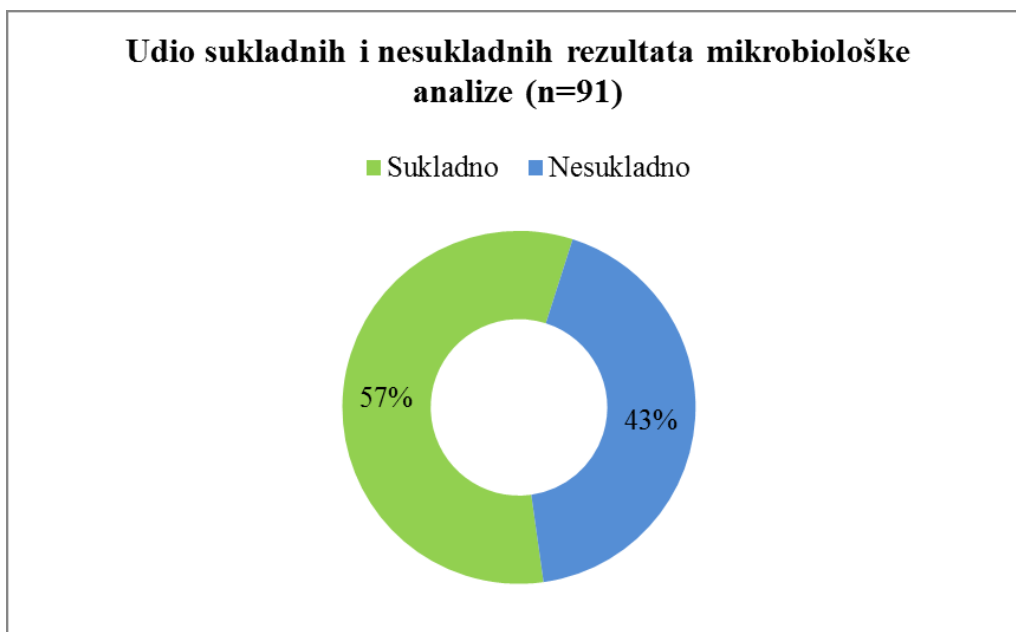
Tijekom proljetnih i ljetnih mjeseci 2018. godine, na području Primorsko – goranske županije provedeno je uzorkovanje leda u sklopu monitoringa ugostiteljskih objekata. Provedbom istraživanja uzorkovan je 91 uzorak leda u 91 ugostiteljskom objektu koji su pritom i anketirani.

Od ukupno 91 objekta u kojima je provedeno uzorkovanje, 51 objekt je registriran kao caffe bar, 37 kao restoran i 3 su registrirana kao objekti brze prehrane. Kako je prikazano na slici 15., caffe barovi čine 56%, restorani 41%, a objekti brze prehrane 3% od ukupnog broja posjećenih ugostiteljskih objekata.



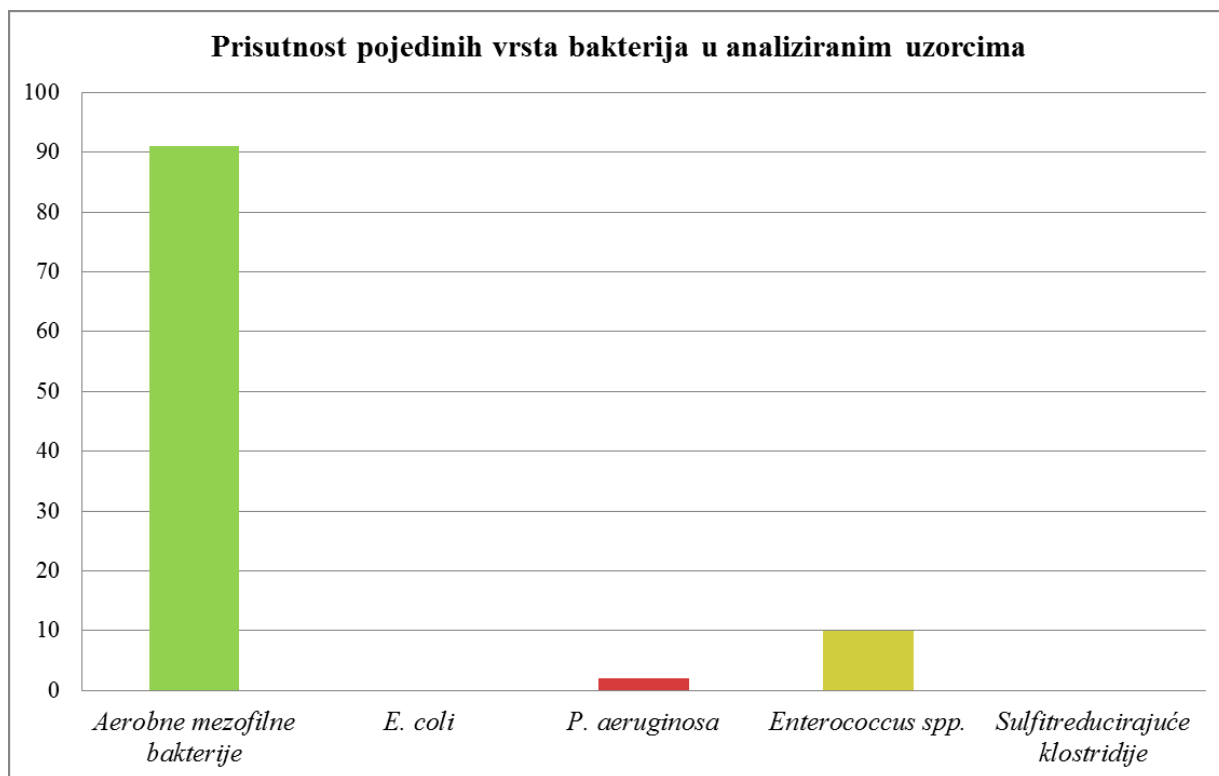
Slika 15. Grafički prikaz udjela pojedinih vrsta ugostiteljskih objekata u provedenom istraživanju.

Mikrobiološkom analizom 91 uzorka leda, čak 43% uzoraka, odnosno njih 39, pokazalo se nesukladnim preporučenim parametrima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu iz 2011. godine. (Slika 16.)



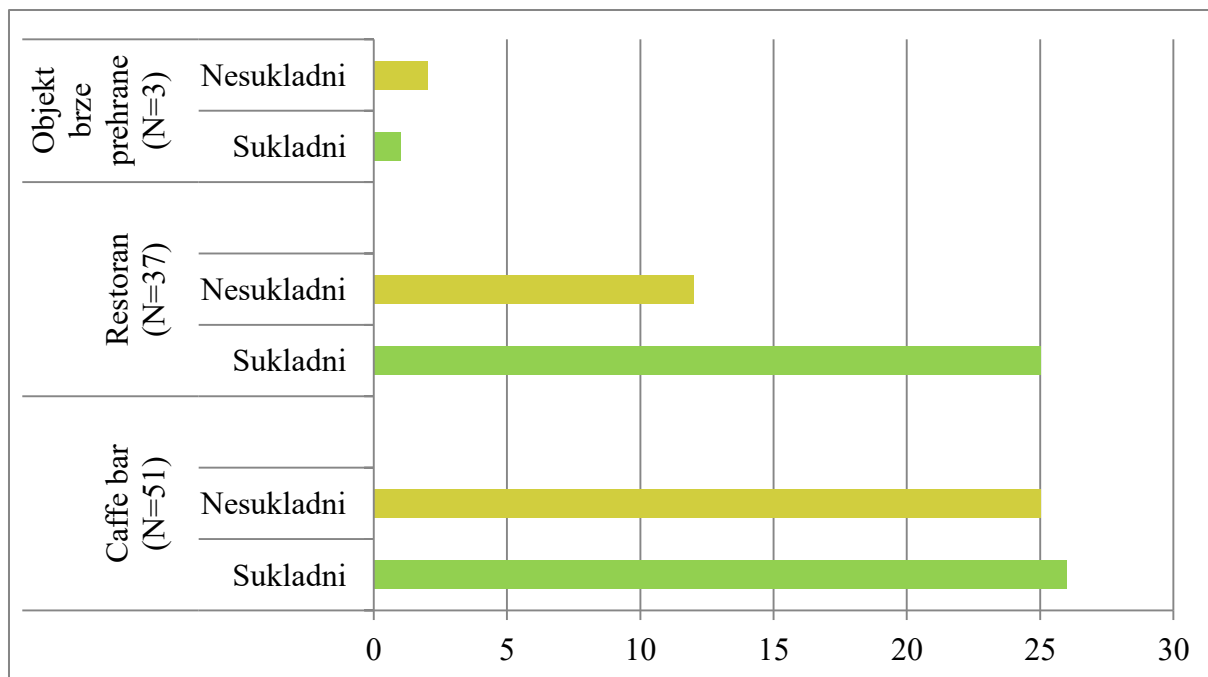
Slika 16. Grafički prikaz udjela sukladnih i nesukladnih rezultata mikrobiološke analize.

Od toga su u 91 uzorku dokazane aerobne mezofilne bakterije, u njih 8 bakterije *Enterococcus spp.*, a u samo jednom uzorku *Pseudomonas aeruginosa*. U nijednom uzorku leda nisu dokazane *E. coli* i sulfitreducirajuće klostridije. (Slika 17.)



Slika 17. Grafički prikaz uzoraka u kojima su pronađene pojedine vrste bakterija.

Na slici 18. prikazana je brojnost sukladnosti, tj. nesukladnosti uzoraka leda parametrima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu ovisno o kategoriji objekta u kojemu je led uzorkovan. Tako je 26 uzoraka, odnosno 51% njih uzetih iz caffè barova sukladno parametrima, a njih 25 ili 49% nesukladno. Od uzoraka leda korištenih u restoranima, 25 se pokazalo sukladnima, dok je preostalih 12 nesukladno. U objektima brze prehrane uzorkovana su tri uzorka, od čega su po mikrobiološkoj analizi 2 nesukladna, a 1 sukladan.



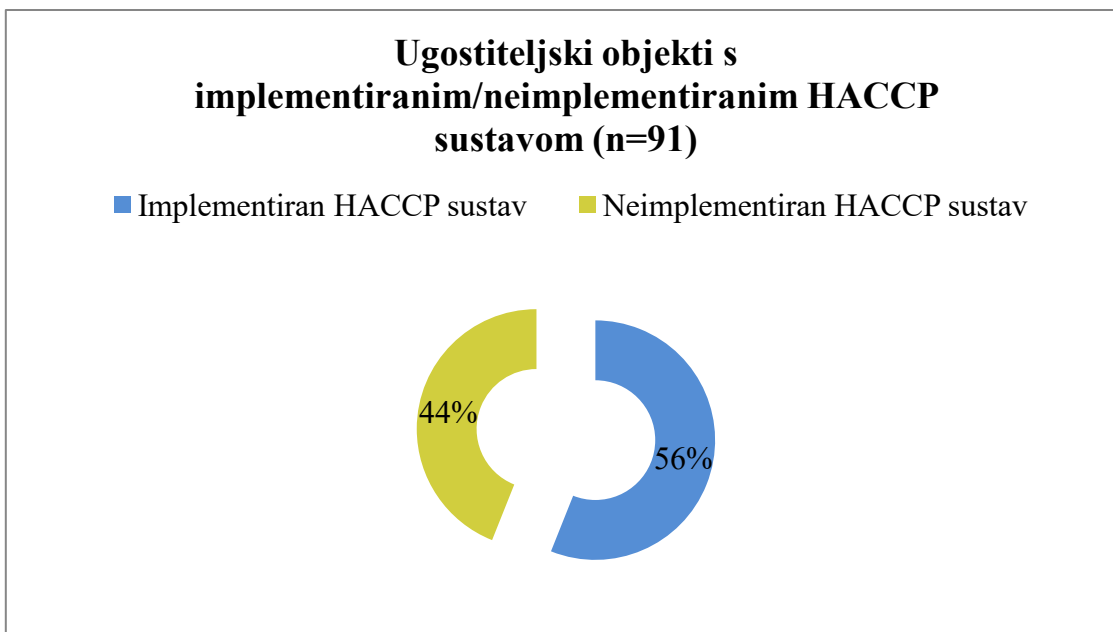
Slika 18. Grafički prikaz sukladnosti uzoraka leda parametrima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu ovisno o vrsti objekta u kojem je led uzorkovan.

Neovisno o vrsti kojoj objekt pripada, u svim uzorcima su dokazane aerobne mezofilne bakterije, dok u nijednom nisu dokazane *E. coli* i sulfitreducirajuće klostridije.

U sedam uzoraka uzorkovanih u caffe barovima, u dva uzorka uzorkovana u restoranu i u jednom uzorkovanom u objektu brze prehrane su dokazane bakterije *Enterococcus spp.*

U dva uzorka uzorkovana u restoranima dokazan je *Pseudomonas aeruginosa*.

Od 91 uzorka leda, njih 51 je pripremljeno u ugostiteljskom objektu koji ima implementiran HACCP sustav, a 40 u objektu u kojem on nije implementiran. Tako je na slici 19. vidljivo da samo 56% od ispitanih ugostiteljskih objekata ima implementiran HACCP sustav, dok preostalih 44% nema.



Slika 19. Grafički prikaz udjela ugostiteljskih objekata ovisno o implementiranosti HACCP sustava.

U anketi je također ispitano koji je izvor vode koja je korištena za pripremu leda, na koji način je led pripremljen i na koji je način skladišten. Svi ugostiteljski objekti, točnije njih 91, koriste vodovodnu vodu za pripremu leda te ledomat i spremnik za led za njegovu proizvodnju i skladištenje.

S obzirom na brojna variranja u rezultatima mjerenja, uzeta je srednja vrijednost izmjerena u ledomatima u °C u vrijednosti od -3,23°C. Taj podatak zajedno s rezultatima ankete kazuje da u većini ugostiteljskih objekata nije pronađena tekuća faza u spremnicima ledomata.

5. RASPRAVA

U sklopu provođenja monitoringa ugostiteljskih objekata u proljetnim i ljetnim mjesecima 2018. godine, uzorkovan je 91 uzorak leda u 91 ugostiteljskom objektu na području Primorsko – goranske županije, kako bi se mikrobiološkom analizom utvrdila njihova sukladnost preporučenim parametrima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu iz 2011. godine. Osim uzorkovanja leda, provedeno je i anketiranje putem upitnika koji je sadržavao pitanja o vrsti objekta i vode korištene za pripremu leda, načinu pripreme i skladištenja leda, prisutnosti tekuće faze u spremniku i temperaturi ledomata te implementaciji HACCP sustava u objektu, a sve kako bi se dobio detaljniji uvid u potencijalne rizike kontaminacije leda korištenog za rashlađivanje pića i hrane.

Primorsko – goranska županija, naročito njena obala i otoci, popularno su turističko odredište, a zbog umjerene i tople klime predstavljaju određeni rizik od pojave bolesti uzrokovanih konzumacijom leda, zbog čega je potreba za ovakvom vrstom istraživanja iznimna, što pokazuje i njihovo provođenje diljem Europe, SAD-a i Kanade.

Uzorkovanje leda kao dio ovog istraživanja je provedeno u 51 caffe baru, u 37 restorana i u 3 objekta brze prehrane, a čak se 39 rezultata mikrobiološke analize pokazalo nesukladnima, što može izazvati određenu zabrinutost stručnjaka, s obzirom da konzumacija takvog leda nerijetko izaziva epidemije probavnih bolesti. U svim su uzorcima dokazane aerobne mezofilne bakterije što je vjerojatno posljedica njihove brojnosti i sveprisutnosti u vodi, zraku i ljudskom organizmu. Iako su u istraživanjima provedenim u Ujedinjenom Kraljevstvu 2007. i u Grčkoj 2011. godine dokazane kolonije bakterije *E. coli*, primarnog indikatora fekalnog zagađenja ili loše higijenske prakse, i to u 2%, odnosno 15% uzoraka [20, 21], u ovom istraživanju *E. coli* nije dokazana niti u jednom uzorku. Nije dokazana ni prisutnost sulfitreducirajućih klostridija, dok je također u istraživanju provedenom u Grčkoj

dokazana u 35% uzoraka [20]. Zabrinjavajući su i rezultati vezani za nalaz bakterija roda *Enterococcus* jer su dokazane u čak 11% uzoraka, dok su, na primjer, u istraživanju provedenom u Ujedinjenom kraljevstvu dokazane u 4,5% uzoraka [21]. Većina uzoraka s pozitivnim nalazom bakterija navedenog roda, točnije njih 7 od 10, uzorkovana je u caffè barovima, što također može upućivati na lošiju higijensku praksu osoblja te vrste objekta nego što je to u, na primjer, restoranima. Na to upućuje i podatak da je oko 14% uzoraka uzorkovanih u caffè barovima imalo pozitivni nalaz bakterija *Enterococcus spp.*, dok je za restorane ta vrijednost oko 5%.

Slično istraživanje provedeno je i na području Osječko – baranjske županije 2012. godine gdje su rezultati analize pokazali da je više od polovice uzoraka, točnije njih 15 od 28, bilo nesukladno preporučenim vrijednostima parametara Vodiča [13].

Osim bakterija, u ledu mogu biti prisutni i virusi, što potvrđuje pojava epidemije gastroenteritisa uzrokovanog konzumacijom leda u kojem je bio prisutan Norovirus na području regije Apulija u Italiji i na Tajvanu [18, 19]. Potencijalni rizik kod konzumacije mogu predstavljati i gljive prisutne u ledu, jer iako njihova ingestija nije rizični faktor kod infekcija uzrokovanih plijesnima i kvascima, one sudjeluju u stvaranju biofilma koji omogućava mikrobiološkim zajednicama lakše preživljavanje nepovoljnih uvjeta i otpornost na čišćenje [15].

Primarna kontaminacija leda podrazumijeva onečišćenje leda izvorom vode potrebnim za njegovo pripravljanje, a kako svi ispitani ugostiteljski objekti za te potrebe koriste vodu iz lokalnih vodovoda, zbog njene redovite analize sukladno nalogu Pravilnika o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnosti javne vodoopskrbe, mogućnost primarne kontaminacije može se s gotovo stopostotnom sigurnošću isključiti.

Dakle, problem velikog broja nesukladnih rezultata vjerojatno je posljedica sekundarne kontaminacije, odnosno nehigijenskog rukovanja ili skladištenja leda te neredovitog i neadekvatnog čišćenja i održavanja ledomata. Upravo iz tog razloga, potrebno je u daljnjim istraživanjima kao dio upitnika navesti i pitanja o higijenskim navikama djelatnika tijekom rukovanja ledom, higijenskom stanju pribora za uzimanje leda te o redovitosti čišćenja i održavanja ledomata. Potrebno je u budućnosti i dodatno ispitati povezanost temperature ledomata, tj. njegova spremnika za led, prisutnosti tekuće faze u njemu te sukladnosti, odnosno nesukladnosti rezultata analize s preporučenim parametrima Vodiča, jer iako je s obzirom na srednju izmjerenu vrijednost temperature od $-3,23^{\circ}\text{C}$ tekuća faza bila rijetko prisutna, dobiveni rezultati nisu dostatni za sigurnu potvrdu nepovezanosti navedenih parametara.

Najviše nesukladnih uzoraka dobiveno je iz caffè barova, što je slučaj i u nekim inozemno provedenim istraživanjima [23]. Mogući razlog tome je neobavezna implementacija HACCP sustava u caffè barovima zbog manjeg rizika od kontaminacije određenih namirnica. Naime, u provedenom istraživanju čak 44% objekata nema implementiran HACCP sustav, koji s dobrom proizvođačkom i higijenskom praksom znatno povećava sigurnost i kvalitetu pića i hrane konzumirane od strane potrošača te time smanjuje mogućnost ugrožavanja javnog zdravlja. Upravo iz tog razloga, HACCP sustav bi trebao biti implementiran u svim objektima te osim kontrole štetnika, čišćenja, održavanja i dezinfekcije radnih ploha i skladišta, trebao bi sadržavati i plan za redovito i dostatno čišćenje te održavanje ledomata i njegovih odvoda.

Nažalost, zbog nepostojanja zakonske regulative te zbog različitih parametara i metoda analize, gotovo je nemoguće valjano usporediti rezultate ranije spomenutih istraživanja. Uvođenje takve zakonske regulative, uvelike bi olakšalo samo uzorkovanje leda te pripremu metoda za njegovu analizu, ali i daljnje planiranje javnozdravstvenih akcija. U tome veliku ulogu imaju stručnjaci sanitarne struke koji svojim znanjem mogu pridonijeti

kreiranju zasad neprisutnih propisa i provođenju istih, s ciljem poboljšanja mikrobiološke kvalitete leda ugostiteljskih objekata u budućnosti i smanjenju pojave bolesti izazvanih konzumacijom leda nedovoljne kvalitete.

6. ZAKLJUČCI

Provedbom uzorkovanja i mikrobiološke analize uzoraka leda tijekom proljetnih i ljetnih mjeseci 2018. godine na području Primorsko – goranske županije, dobiveni su rezultati iz kojih proizlaze sljedeći zaključci:

1. Od ukupno 91 uzorka leda uzorkovanog iz 91 ugostiteljskog objekta na području Primorsko – goranske županije, njih 52 pokazalo se sukladnima, a čak 39 nesukladnima vrijednostima predloženih parametara Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu iz 2011. godine.
2. Mikrobiološkom analizom dokazane su aerobne mezofilne bakterije u svim uzorcima, u njih 10 *Enterococcus spp.*, a u 2 *Pseudomonas aeruginosa*, dok *E. coli* i sulfitreducirajuće klostridije nisu pronađene niti u jednom uzorku.
3. Ispunjavanjem upitnika dobiven je uvid u postotak implementiranosti HACCP sustava u ugostiteljskim objektima te njegovu potencijalnu povezanost s mikrobiološkom kvalitetom leda korištenog za pripremu i rashlađivanje pića i hrane, no za sigurno potvrđivanje povezanosti ta dva parametra potrebno je provoditi daljnja istraživanja.
4. Prikupljanje ovakvih podataka daje mogućnost kvalitetnijeg uvida u potencijalne rizike kontaminacije leda, od same proizvodnje do njegova posluživanja krajnjem potrošaču.
5. Pretpostavlja se da će provedba sličnih istraživanja u budućnosti potaknuti stvaranje nacionalne ili europske zakonske regulative koja bi uvelike stručnjacima olakšala provedbu uzorkovanja i analize uzoraka leda ugostiteljskih objekata te naposljetku i smanjila rizik od pojave bolesti uzrokovanih konzumacijom leda nedostatne kvalitete.

7. LITERATURA

1. Encyclopaedia Britannica (URL: <https://www.britannica.com/science/water>), pristupljeno lipanj 2019.
2. USGS (URL: https://www.usgs.gov/special-topic/water-science-school/science/how-much-water-there-earth?qt-science_center_objects=0#qt-science_center_objects), pristupljeno srpanj 2019.
3. PubChem (URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Water>), pristupljeno lipanj 2019.
4. Hrvatska enciklopedija (URL: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=65109>), pristupljeno lipanj 2019.
5. URL: <https://alevelbiology.co.uk/notes/water-structure-properties/>, pristupljeno srpanj 2019.
6. URL: <https://www.quora.com/What-is-the-number-of-hydrogen-bonds-in-two-water-molecules>, pristupljeno srpanj 2019.
7. URL: https://www.wikiwand.com/en/Self-ionization_of_water, pristupljeno srpanj 2019.
8. Zakon o vodi za ljudsku potrošnju (NN 56/13, 64/15, 104/17, 115/18) (URL: <https://www.zakon.hr/z/584/Zakon-o-vodi-za-ljudsku-potro%C5%A1nju>), pristupljeno lipanj 2019.
9. Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko – goranske županije (URL: <http://www.zzjzpgz.hr/vode/obvezni-parametri.pdf>), pristupljeno srpanj 2019.
10. Encyclopaedia Britannica (URL: <https://www.britannica.com/science/ice>), pristupljeno lipanj 2019.
11. URL: <https://www.ifm.liu.se/compchem/research/hbonds/>, pristupljeno srpanj 2019.

12. Lumen (URL: <https://courses.lumenlearning.com/cheminter/chapter/the-structure-of-ice/>), pristupljeno srpanj 2019.
13. Valek M., Benkotic S., Sikora M., Valek Lendic K., Kralj E., Santo V., (2012) Mikrobiološka kakvoća kocki leda za pripremu hladnih napitaka u ugostiteljskim objektima Osječko-baranjske županije – pilot ispitivanje. XVI znanstveno - stručni skup „Voda i javna vodoopskrba“, zbornik radova, Trogir 2012. 165 – 170
14. Awuor L., Thompson S., Thompson B., Liberda E. N., Meldrum R., (2016) Microbiological quality and handling practices of ice served in selected downtown Toronto food premises. (URL: <https://pubs.ciphi.ca/doi/full/10.5864/d2016-017>), pristupljeno srpanj 2019.
15. Francesca N., Gaglio R., Stucchi C., De Martino S., Moschetti G., Settanni L, (2018) Yeasts and moulds contaminants of food ice cubes and their survival in different drinks. *Journal of Applied Microbiology*, 2018; Vol. 124, Issue 1:188-196
16. Murashita S., Kawamura S., Koseki S., (2017) Inactivation of Nonpathogenic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in Ice Using a UVC Light-Emitting Diode. *Journal of Food Protection* 80(7): 1198-1203, 2017
17. Hampikyan H., Bingol E. B., Cetin O. and Colak H. (2017) Microbiological quality of ice and ice machines used in food establishments. (URL: <https://iwaponline.com/jwh/article/15/3/410/28453/Microbiological-quality-of-ice-and-ice-machines>), pristupljeno srpanj 2019.
18. Cheng HY., Hung MN., Chen WC., Lo YC., Su YS., Wei HY., Chen MY., Tuan YC., Lin HC., Lin HY., Liu TY., Wang YY., Wu FT. (2017) Ice-associated norovirus outbreak predominantly caused by GII.17 in Taiwan, 2015. (URL:

- https://www.researchgate.net/publication/320912698_Ice-associated_norovirus_outbreak_predominantly_caused_by_GII17_in_Taiwan_2015), pristupljeno srpanj 2019.
19. Rizzo C., Di Bartolo I., Santantonio M., Coscia M. F., Monno R., De Vito D., Ruggeri F. M., Rizzo G. (2007) Epidemiological and virological investigation of a Norovirus outbreak in a resort in Puglia, Italy. (URL: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-7-135>), pristupljeno lipanj 2019.
 20. Gerokomou V., Voidarou C., Vatopoulos A., Velonakis E., Rozos G., Alexopoulos A., Plessas S., Stavropoulou E., E.Bezirtzoglou E., Demertzis P. G., Akrida-Demertzia K. (2011) Physical, chemical and microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Greece and its public health implications. *Anaerobe* 17(6):351-353, 2011
 21. Food Safety, Authority of Ireland, Final Report of 1st National Microbiological Survey 2007, Microbiological Quality of Ice for Cooling Drinks (URL: [https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Monitoring_and_Enforcement/Monitoring/Surveillance/ice_cooling_drinks\(1\).pdf](https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Monitoring_and_Enforcement/Monitoring/Surveillance/ice_cooling_drinks(1).pdf)), pristupljeno lipanj 2019.
 22. Lee KH., Ab Samad L.S., Lwin P.M., Riedel S.F., Magin A., Bashir M., Vaishampayan P.A., Lin WJ. (2017) On the Rocks: Microbiological Quality and Microbial Diversity of Packaged Ice in Southern California. *Journal of Food Protection* 80(6):1041-1049, 2017
 23. Gaglio R., Francesca N., Di Gerlando R., Mahony J., De Martino S., Stucchi C., Moschetti G., Settanni L. (2017) Enteric bacteria of food ice and their survival in alcoholic beverages and soft drinks. *Food Microbiology* 67:17-22, 2017

24. Republika Hrvatska, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011) Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 3. izmijenjeno izdanje
25. Šprem A. (2014) Ispitivanje mikrobiološke čistoće dijelova ambalaže nekih konzumnih pića, diplomski rad (URL: <https://repozitorij.ptfos.hr/islandora/object/ptfos%3A121>), pristupljeno lipanj 2019.
26. Kalenić S. i suradnici (2013) Medicinska mikrobiologija. Medicinska naklada, Zagreb. ISBN: 978-953-176-637-1; 140-143; 185-190; 215-220; 253-261
27. Šantić M., Gobin I., Ožanić M., Marečić V. (2014) Mikrobiologija hrane i vode za studente preddiplomskog studija sanitarnog inženjerstva. Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju, Rijeka. ISBN: 978-953-7957-13-1
28. URL: <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli/>, pristupljeno srpanj 2019.
29. URL: http://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/244910.pdf, pristupljeno srpanj 2019.
30. URL: <https://sciencebeta.com/chitosan-fights-food-poisoning/>, pristupljeno srpanj 2019.

ŽIVOTOPIS

Moje ime je Belma Hajdarević, rođena sam 22.01.1996. godine u Rijeci. Živim u Rijeci, na adresi Šetalište 13. divizije 30, 51000 Rijeka. Od 2002. do 2010. godine, pohađala sam Osnovnu školu Kostrena. Po završetku osnovnoškolskog obrazovanja, upisujem Prvu sušačku hrvatsku gimnaziju u Rijeci, jezični smjer, koju pohađam do 2014. godine. Nakon položene državne mature, 2014. godine upisujem Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci, gdje 2017. nastavljam obrazovanje na Diplomskom studiju sanitarnog inženjerstva, čija sam studentica i danas.

PRILOG I (ANKETNI UPITNIK)

 <p>NASTAVNI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO PRIMORSKO-GORANSKE ŽUPANIJE</p>	<h3>ZAPISNIK O UZORKOVANJU LEDA</h3>	Oznaka dokumenta: Izdanje: 3 Strana/stranica: 39/
--	--	---

Lokacija uzorkovanja:

Datum uzorkovanja:

1. Objekt ima implementiran HACCP sustav: DA NE

2. Vrsta objekta: caffè bar

 restoran

3. Vrsta vode : vodovodna voda

 voda iz lokalnog vodovoda

 bunarska voda

4. Način pripreme leda: iz ledomata

 iz ledenice

5. Način skladištenja leda: u spremniku za led

 kalup ledenice

6. Prisutnost tekuće faze u spremniku za led: DA NE

7. Temperatura u ledenici: _____ °C

Uzorkovao: