

OKTÓBER 2006


Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins
SKÝRSLA 24-06


Iðntæknistofnun
ITI 0612/EUT08
8HK3481

VIÐLOÐUN ÖRVERA VIÐ

YFIRBORÐ Í VATNI

- VARMAFRÆÐILEG NÁLGUN -

Guðmundur Gunnarsson, Iðntæknistofnun
Birna Guðbjörnsdóttir, Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins



Ágrip

Í matvælaíðnaði geta verið kjöraðstæður fyrir myndun örveruþekju á rökum yfirborðum, en hún getur myndast mjög hratt þar sem vökvi og næring er til staðar. Myndun örveruþekju er háð mörgum þáttum, svo sem yfirborðeiginleikum bakteríanna og yfirborðsins sem bakteríurnar setjast á. Hér skiptir yfirborðspenna yfirborðs og baktería miklu máli. Þekkt er að örveruþekja myndast frekar á vatnsfælum rökum yfirborðum, en vatnssæknum rökum yfirborðum. Hér er lýst tilraunum til þess að mæla yfirborðspennu *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes* en þessar bakteríur eru algengar í fiskiðnaði hér á landi. Bakteríuræktir voru síðar þannig að það fékkst síukaka sem hægt var að nota til mælinga. Snertihorn mismunandi vökva var síðan mælt við síukökur þessar, og út frá niðurstöðum þessar snertihornsmælinga var hægt að reikna út yfirborðspennu bakteríanna. Í ljós kom að stofn sá af *Pseudomonas putida* sem hér var athugaður var vatnsfælinn, en að *Listeria*-stofninn var vatnsækinn. Með aðferðum varmafræðinnar var síðan hægt að reikna breytingu í frjálstri orku við viðloðun bakteríanna við pólýetýlen, ryðfrítt stál og tannglerung. Þessar niðurstöður sýndu að *Pseudomonas putida* hafði tilhneigingu til að setjast á þessi yfirborð og þá sérstaklega vatnsfælið yfirborð eins og á pólýetýlen. *Listeria* hefur aftur á móti minni tilhneigingu til að setjast á yfirborð. Niðurstöðurnar staðfesta að í matvælaíðnaði eigi frekar að nota efni sem gefa vatnsækin yfirborð en efni sem gefa vatnsfælin yfirborð.

Efnisyfirlit

1	Inngangur	1
2	Yfirborðspenna og viðloðun örvera	2
2.1	Viðloðun og yfirborðspenna.....	2
2.2	Yfirborðspenna vökva	3
2.3	Yfirborðspenna fastra efna	3
2.4	Yfirborðspenna örvera.....	4
2.5	Viðloðun örvera við yfirborð i vatni	5
2.6	Viðloðun próteina við yfirborð	6
3	Mælingar á snertihorni síukaka af bakteríum við nokkra vökva.....	8
3.1	Bakteríustofnar	8
3.2	Síukökur af bakteríum	8
3.3	Mælingar á snertihorni	8
4	Niðurstöður og umræður	13
5	Heimildir	15

1 Inngangur

Í matvælaíðnaði geta verið kjöraðstæður fyrir myndun biofilmu, eða það sem við köllum örveruþekju, á rökum yfirborðum. Örveruþekja getur myndast mjög hratt í umhverfi þar sem vökvi streymir um og næring er til staðar og eru dæmi um að hún hafi náð að stífla pípulagnir. Aðsog baktería á yfirborð er m.a háð hleðslu baktería, “Van der Waals” kröftum og rafkröftum. Vatnsfælnar bakteríur eru taldar festast betur en vatnssæknar bakteríur því þær leita í vatnsfælnar aðstæður sem þær finna næst yfirborðinu, en mörg algeng yfirborðsefni í matvælaíðnaði eru frekar vatnsfælin eins og t.d. ýmis plastefni. Ef þetta aðsog varir nógu lengi breytast efna- og eðlisfræðilegir eiginleikar þessa lífræna lags þannig að festing bakteríanna verður óafturkræf. Mjög erfitt er að losna við örveruþekju ef hún nær þessu stigi. Flestar bakteríur geta myndað örveruþekju ef aðstæður eru hagstæðar þó svo að sumar bakteríur hafi meiri hæfileika til þess en aðrar. Algengustu hóparnir teljast til bakteríu-ættkvíslanna *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Listeria* og *Staphylococcus* (Wirtanen o.fl. 2000). Örveruþekja getur aukið hættuna á matarsjúkdómum þar sem sjúkdómsvaldandi bakteríur geta annað hvort varist inni í henni eða jafnvel myndað hana sjálfar. Það á t.d. við um bakteríuna *Listeria monocytogenes* (Flint; Brooks, og Bremer 1997). *Listeria* er baktería sem einangrast oft úr matvælavinnslum og má e.t.v. rekja það til þess hversu auðveldlega hún nær að festa sig í/á tæki sem erfitt er að þrifa. *L. monocytogenes* getur festst á ryðfrítt stál, gúmmí og ýmis plastefni sem notuð eru í tæki í matvælavinnslu og getur það skýrt s.k. húsflóru sem er yfirleitt mismunandi á milli vinnsla (Mafu o.fl. 990), (Hood og Zottola 1997, Norwood og Gilmour 1999, Sigrún Guðmundsdóttir 2000, Lunden o.fl. 2000, Sinde og Carballo 2000, Beresford; Andrew, og Shama 2001, Kusumaningrum o.fl. 2003). Rannsóknir hafa sýnt að *L. monocytogenes* festist best við ryðfrítt stál þegar umhverfishiti er 18-21°C og umhverfissýrustig er pH 7-8 (Herald og Zottola 1988), en sýnt hefur verið fram á að hún getur einnig fest sig við ryðfrítt stál við mjög lágt hitastig eða 4°C en þessi baktería er kuldapólin og vex við kældar aðstæður (Norwood og Gilmour 2001). Rannsóknir hafa sýnt fram á að hátt hlutfall Gram-neikvæðra baktería sem einangrast úr fiskvinnsluumhverfi í samanburði við Gram-jákvæðar bakteríur (Bagge-Ravn o.fl. 2003, Birna Guðbjörnsdóttir og Hjörleifur Einarsson 1998). Af Gram neikvæðum bakteríum sem einangrast hafa úr vinnsluumhverfi eru *Pseudomonas* tegundir mjög algengar og bendir það til þess að þær eigi auðvelt með að festa sig við ýmis konar yfirborðsefni. Af þeim stofnum sem einangrast hafa úr fiskvinnsluumhverfi og úr afurðum eru *P. putida* og *P. fluorescens* mjög algengar tegundir. Þær eru taldar til mikilvægra skemmdarvalda í ferskum og kældum fiski (Gram og Huss 1996).

Þessi skýrsla lýsir tilraunum til þess að mæla yfirborðspennu *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes*, í þeirri von að niðurstöðurnar geti skýrt hvers vegna þessar bakteríur eru svo algengar í matvælaíðnaði.

Í kafla 2 er fjallað um yfirborðspennu samkvæmt kenningum van Oss (van Oss 1994) og um viðloðun milli mismunandi efna, t.d. um viðloðun örvera við yfirborð í vatni. Þar er m.a. lýst hvernig nota má þessa kenningu til að fá mat á vatnsfælni (hydrophobicity) og/eða vatnssækni (hydrophilicity) örvera. Einnig er fjallað um hvaða áhrif prótein geta haft á viðloðun örvera við yfirborð. Í kafla 3 er síðan lýst mælingum á snertihorni mismunandi vökva (vatns, etýlen glýkóls og díjóðmetan) við síukökur af *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes*. Þessar snertihornsmælingar eru síðan notaðar í kafla 4 til að reikna út þætti yfirborðspennunnar fyrir bakteríurnar. Þar er einnig reiknuð út breyting í frjálsri orku þegar bakteríurnar loða við mismunandi yfirborð, og eru niðurstöðurnar bornar saman við fyrri niðurstöður um viðloðun þessara baktería við mismunandi yfirborð.

2 Yfirborðspenna og viðloðun örvera

2.1 Viðloðun og yfirborðspenna

Fyrsta skrefið í myndun biofilmu er þegar örverur í vatnslausn (planktonic) setjast á yfirborð (eða komast í snertingu við yfirborðið). Örverur sem setjast á yfirborð geta aftur farið út í lausnina og má því segja að þessi fyrsta festing sé afturkræf (reversible). Þessari fyrstu festingu má lýsa með aðferðum varmafræðinnar, en breytingu í frjálsri orku, $\Delta G_{\text{viðl}}$, (free energy) við viðloðun örvera má lýsa með eftirfarandi jöfnu:

$$\Delta G_{\text{viðl}} = \Delta G_{132} = \gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23} \quad (1)$$

Hér er γ_{12} yfirborðsspenna (eða yfirborðsorka) milli yfirborðs (1) og örveru (2), γ_{13} yfirborðsspenna milli yfirborðs (1) og vökva (3) og γ_{23} yfirborðsspenna milli örvera (2) og vökva (3).

Ef $\Delta G_{\text{viðl}} > 0$ er viðloðun óhagstæð.

Hér verður stuðst við kenningu van Oss (van Oss 1994) um að yfirborðsspennu fyrir efni gagnvart lofti megi almennt skrifa á eftirfarandi hátt:

$$\gamma_i = \gamma_i^{\text{LW}} + \gamma_i^{\text{AB}} \quad (2)$$

Samkvæmt þessari kenningu er yfirborðsspenna summa “dispersive” hluta (γ_i^{LW}) og “pólar” hluta (γ_i^{AB}). Pólar hlutann má síðan skrifa sem

$$\gamma_i^{\text{AB}} = 2(\gamma_i^+ \gamma_i^-)^{1/2} \quad (3)$$

þar sem γ_i^+ er “electron accepting parameter” en γ_i^- “electron donating parameter”. Segja má að þessir tveir parametrar lýsa Lewis sýru og basaeiginleikum yfirborðsins.

Samkvæmt kenningum van Oss er þá hægt að skrifa yfirborðsspennu (γ_{ij}) milli tveggja efna, i og j, á eftirfarandi hátt.

$$\gamma_{ij} = [(\gamma_i^{\text{LW}})^{1/2} - (\gamma_j^{\text{LW}})^{1/2}]^2 + 2[(\gamma_i^+)^{1/2} - (\gamma_j^+)^{1/2}] [(\gamma_i^-)^{1/2} - (\gamma_j^-)^{1/2}] \quad (4)$$

Þessi jafna segir því að yfirborðsspenna milli tveggja efna sé eingöngu fall af yfirborðsspennu milli efnanna og lofts.

2.2 Yfirborðspenna vökva

Yfirborðspennu vökva og lofts má mæla og eru nokkur gildi sýnd í töflu 1.

Tafla 1 Yfirborðspenna (γ) nokkurra vökva, og skipting hennar í “dispersive” (γ^{LW}) og pólar (γ^{AB}) hluta við 20°C. Einnig eru sýnd gildi á γ^+ og γ^- (van Oss 1994).

Vökvi	γ (mJ/m ²)	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Vatn	72,8	21,8	51	25,5	25,5
Etýlene glýkól	48	29	19	1,92	47,0
Glyceról	64	34	30	3,92	57,4
Formamíð	58	39	19	2,28	39,6
Dijóðómetan	50,8	50,8	0	0	0
Dekan	23,83	23,83	0	0	0

Skipting yfirborðspennunnar í pólar og “dispersive” hluta er einnig sýnd, en van Oss gerir ráð fyrir að fyrir vatn sé $\gamma^+ = \gamma^- = 25,5$ mJ/m² við 20 °C. Gildi á γ^+ og γ^- fyrir hina vökvana eru reiknuð út frá því.

Hér er vert að benda á að γ^- fyrir pólar vökvana er mikið stærra en γ^+ . Þetta má skýra með “electron donating” eiginleikum súrefnis, en það er í öllum þessum vökvum.

2.3 Yfirborðspenna fastra efna

Ekki er hægt að mæla beint yfirborðspennu fastra efna, en hægt er að nota mælingar á snertihorni vökva (θ) við yfirborð til þess að reikna úr yfirborðsspennu fasta efnisins, en eftirfarandi samband gildir milli snertihorns (θ), yfirborðspennu vökva (γ_3), yfirborðspennu fasta efnisins (γ_1) og yfirborðspennu milli yfirborðs og vökva (γ_{13})

$$\gamma_{13} = \gamma_1 - \gamma_3 \cos\theta \quad (5)$$

Með því nota jöfnur (4), (3) og (2) í (5) fæst síðan eftirfarandi:

$$(1 + \cos\theta)\gamma_3/2 = (\gamma_1^{LW} \gamma_3^{LW})^{1/2} + (\gamma_1^+ \gamma_3^-)^{1/2} + (\gamma_1^- \gamma_3^+)^{1/2} \quad (6)$$

Ef gert er ráð fyrir að yfirborðspenna fyrir vökvann sé þekkt (t.d. úr töflu 1), og snertihornið mælt, eru 3 óþekktar stærðir í ofnagreindri jöfnu, γ_1^{LW} , γ_1^+ og γ_1^- . Með því að mæla snertihorn fyrir 3 mismunandi vökva á yfirborði má því reikna út γ_1^{LW} , γ_1^+ og γ_1^- fyrir yfirborðið og síðan heildar yfirborðspennu yfirborðsins samkvæmt jöfnum (2) og (3).

Dæmi um niðurstöður slíkra mælinga eru í töflu 2.

Tafla 2 Þættir yfirborðspennunnar fyrir nokkur mismunandi yfirborð (Clint og Wicks 2001). Einnig er sýnd breyting í frjálstri orku þegar efni sömu tegundar snertast í vatni þannig að enginn skilflötur verði eftir (ΔG_{131}).

Efni	γ (mJ/m ²)	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	ΔG_{131} (mJ/m ²)
Pólýstýren	43,7	43,7	0	0	7,4	-54,6
Acetal	44,2	44,2	0	0	5,5	-62,5
Sulfónerað pólýstýren	60,1	42	18,1	2	41	13,1
Pólýetýlen – LD	31	30,7	0,3	0,01	2,3	-71,5
Gler	64,4	42,3	22,1	2,9	42	12,4
Ryðfrítt stál	45,9	40,5	5,4	0,2	36	11,7
Nylon 6,6	42,8	38,6	4,2	0,39	11,3	-34,6
PMMA	44,6	41,2	3,4	0,38	7,5	-47,1
PVC	43,7	43	0,7	0,04	3,5	-68,8
Tannnglerungur	41,5	39,7	1,8	0,016	52	37,2

Samkvæmt töflu 2 eru γ^- oftast mikið stærra en γ^+ , sem skýra má með tilvist súrefnis í efninu eða á yfirborði þess. Ef ekkert súrefni er í efninu, eins og í polýetýlen, er γ^- tiltölulega lágt.

Gildi í töflu 4 má nota til að reikna út breytingu í frírri orku þegar efni sömu tegundar nái að snertast í vatni þannig að enginn skilflötur verði milli þeirra (sem er auðvitað tilbúið dæmi en en gildir ef efnið er vökvi). Breytingin í frírri orku við þetta er

$$\Delta G_{131} = -2\gamma_{13} \quad (7)$$

Hér má setja inn γ_{13} samkvæmt jöfnu 5 (hér vísar 1 til fasta efnisins en 3 til vatnsins) og þá fæst

$$\Delta G_{131} = -2[(\gamma_1^{LW})^{1/2} - (\gamma_3^{LW})^{1/2}]^2 - 4[(\gamma_1^+)^{1/2} - (\gamma_3^+)^{1/2}][(\gamma_1^-)^{1/2} - (\gamma_3^-)^{1/2}] \quad (8)$$

Ef $\Delta G_{131} < 0$ hafa sýni úr efni, t.d. lítil korn, tilhneigingu til að dragast hvert að annarri í vatni og má því segja að slíkt efni sé vatnsfælið, en ef $\Delta G_{131} > 0$ vilja kornin frekar vera aðskilin í lausn og má þá segja að það sé vatnssækið. Því má segja að ΔG_{131} sé mælikvarði á vatnsfælni og vatnssækni efna. Dæmi um niðurstöður slíkra útreikninga er sýndar í síðasta dálki í töflu 3.

Samkvæmt þessum mælikvarða eru polyetýlen og PVC vatnsfælnustu efnin í töflu 2, en tannnglerungur vatnssæknasta efnið. Ryðfrítt stál er á þessum mælikvarða vatnssækið en ekki þó sérlega.

2.4 Yfirborðspenna örvera

Örverur, eins og bakteríur eru það smáar (1 μm) að ekki er hægt að mæla snertihorn vökva við þær. Í staðinn hefur verið farin sú leið að sía írulausn (suspension) af bakteríum gegnum t.d. 0,45 μm filter (t.d. úr cellulósa tríacetat) (Sharma og Rao 2002, Busscher o.fl. 1984). Magn baktería sem er síað þarf helst að vera það mikið að það nái að myndast síukaka þar sem fjöldi örvera er a.m.k. $10^8/\text{mm}^2$. Þessi síukaka er síðan þurrkuð í 30 – 60 mínútur þannig að allt “frítt” vatn gufi upp, en einungis “bundið” vatn verði eftir (Sharma og Rao 2002). Þannig fæst

slétt síukaka sem hægt er að nota til mælinga á snertihorni við mismunandi vökva. Mikilvægt er að síukaka sé hæfilega þykk þannig að filterinn nái ekki að hafa áhrif á snertihornið.

Út frá mælingum á snertihorni mismunandi vökva má síðan reikna mismunandi þætti yfirborðspennunnar, og heildar yfirborðsspennuna. Dæmi um niðurstöður slíkra mælingar er sýnt í töflu 3.

Tafla 3 Þættir yfirborðspennunnar fyrir nokkrar bakteríur (van der Mei). Einnig er sýnd breyting í frjálstri orku þegar bakteríur snertast í vatni (ΔG_{232}) (van der Mei; Bos, og Busscher 1998).

Örvera	γ (mJ/m ²)	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	ΔG_{232} (mJ/m ²)
<i>A. calceoaceticus</i> RAG-1	36,9	36,8	0,0	0,0	41,4	24,1
<i>A. calceoaceticus</i> MR-481	51,3	36,2	15,1	1,3	44,1	21,2
<i>A. actinomycetemcomitans</i> HG1099	35,1	33,5	1,6	3,2	0,2	-62,5
<i>S. marcescens</i> RZ30	53,7	10,5	43,2	10,0	46,7	9,4
<i>S. marcescens</i> RZ38	38,8	12,2	26,6	5,0	35,3	7,3
<i>S. epidermis</i> NCTC 100892	60,3	26,0	34,3	6,0	49,0	19,9
<i>S. cricetus</i> H56	35,0	35,0	0,0	0,0	66,9	60,1
<i>S. mitis</i> BA	45,2	35,8	9,4	5,8	3,8	-36,2
<i>S. sanguis</i> CR311VAR3	43,0	31,7	11,3	0,6	55,6	39,5

Eins og í töflum 1 og 2 er γ^- oftast hærra en γ^+ . Vert er að benda á að töluverður munur getur verið á einstökum þáttum yfirborðspennunnar milli mismunandi stofna sömu baktería.

Gildi í töflu 3 má nota til að reikna út breytingu í frjálstri orku þegar tvær örverur snertast en samkvæmt varmafræðinni er breytingin í frjálstri orku þegar tvær bakteríur (2) snertast í vatni (3) gefin af jöfnu (7) og (8) (hér vísar 2 til bakteríanna en 3 til vatnsins).

Ef $\Delta G_{232} < 0$ hafa bakteríur tilhneigingu til að dragast hver að annarri í vatni og má því segja að þær séu vatnsfælnar, en ef $\Delta G_{232} > 0$ vilja bakteríurnar frekar vera aðskildar í lausn og má þá segja að þær séu vatnssæknar. Því má segja að ΔG_{232} sé mælikvarði á vatnsfælni örvera. Dæmi um niðurstöður slíkra útreikninga er sýndar í síðasta dálki í töflu 3. Flestar örverur sem þar eru sýndar eru vatnssæknar, en einungis tvær vatnsfælnar.

2.5 Viðloðun örvera við yfirborð í vatni

Til þess að reikna út viðloðun örvera við yfirborð í vatni má nú nota jöfnur (1) og (4). Þá fæst að fría orkan við viðloðun örvera við yfirborð í vatni er gefin af (hér vísar 1 til yfirborðsins, 2 til örveranna en 3 til vatnsins)

$$\Delta G_{132} = -2[(\gamma_3^{LW})^{1/2} - (\gamma_1^{LW})^{1/2}] [(\gamma_3^{LW})^{1/2} - (\gamma_2^{LW})^{1/2}] - 2(\gamma_1^+ \gamma_2^-)^{1/2} - 2(\gamma_1^- \gamma_2^+)^{1/2} - 2(\gamma_3^+)^{1/2} [(\gamma_1^-)^{1/2} + (\gamma_2^-)^{1/2} - (\gamma_3^-)^{1/2}] - 2(\gamma_3^-)^{1/2} [(\gamma_1^+)^{1/2} + (\gamma_2^+)^{1/2} - (\gamma_3^+)^{1/2}] \quad (9)$$

Tölur út töflum 1,2 og 3 má nú nota til að reikna út viðloðun baktería við yfirborð. Hér eru valin til útreikninga polyetýlen-LD (vatnsfælið yfirborð), tannglerungur (vatnssækið yfirborð) og ryðfrítt stál (nokkuð vatnssækið yfirborð), sjá töflu 4. Til útreikninga er valin vatnsfælin baktería (*A. actinomycetemcomitans* HG1099=AA), vatnssækin baktería (*S. sobrinus* HG970 = SS) og baktería sem er eilítið vatnssækin (*S. marcescens* RZ38 = SM), sjá töflu 4.

Niðurstöður útreikninga á ΔG_{132} , breyting í frírri orku við viðloðun örvera, má sjá í töflu 4,

Tafla 4 Breyting í frjálrsri orku við viðloðun örvera við ýmis yfirborð, ΔG_{132} . Einnig er sýnd breyting í frjálrsri orku þegar bakteríur snertast í vatni, ΔG_{232} (úr töflu 3) og breyting í frjálrsri orku þegar efni sömu tegundar snertast í vatni þannig að enginn skilflötur verði eftir, ΔG_{131} (úr töflu 2).

Örvera	ΔG_{232} (mJ/m ²) fyrir örverur	Fast efni	ΔG_{131} (mJ/m ²) fyrir fasta efnið	ΔG_{132} (mJ/m ²)
<i>A. actinomycescomitans</i> HG1099	-63	Pólýetýlen – LD	-71	-71
<i>S. marcescens</i> RZ38	7	Pólýetýlen – LD	-71	-9
<i>S. sobrinus</i> HG970	62	Pólýetýlen – LD	-71	-5
<i>A. actinomycescomitans</i> HG1099	-63	Ryðfrítt stál	12	-40
<i>S. marcescens</i> RZ38	7	Ryðfrítt stál	12	18
<i>S. sobrinus</i> HG970	62	Ryðfrítt stál	12	35
<i>A. actinomycescomitans</i> HG1099	-63	Tannglungur	37	-35
<i>S. marcescens</i> RZ38	7	Tannglungur	37	25
<i>S. sobrinus</i> HG970	62	Tannglungur	37	50

Eftirfarandi niðurstöður má draga af niðurstöðum útreikninga á ΔG_{132} , sjá töflu 4.

- Allar bakteríur hafa tilhneigingu til að loða við vatnsfælin yfirborð eins og pólýetýlen
- Viðloðun örvera er minni við vatnsfælin yfirborð en vatnsfælin.
- Jafnvel mjög vatnsækna örverur geta haf smá tilhneigingu til að loða við vatnsfælin yfirborð eins og pólýetýlen.
- Þeim mun vatnsfælnari sem örverur eru þeim mun betur loða þær við yfirborð.

2.6 Viðloðun próteina við yfirborð

Ofangreindar aðferðir hafa jafnvel verið notaðar við að reikna út breytingu í frjálrsri orku, ΔG_{132} , við viðloðun BSA (bovine serum albumin) við mismunandi yfirborð en þættir yfirborðsspennunnar fyrir BSA hafa verið reiknaðir út frá snertihornsmælingum á plastefnum sem hafa verið húðuð með BSA (Clint og Wicks 2001). Fengust eftirfarandi gildi á þáttum yfirborðsspennunnar fyrir BSA; $\gamma^{LW} = 39,5$, $\gamma^+ = 3,7$, $\gamma^- = 3,0$ mJ/m². Þessi gildi má nota til að reikna út viðloðun BSA við mismunandi yfirborð, sjá töflu 5.

Tafla 5 Breyting í frjálrsri orku, ΔG_{132} , við viðloðun BSA við nokkur efni

Efni	ΔG_{132} (mJ/m ²)
Pólýetýlen – LD	-58
Ryðfrítt stál	-30
Tannglungur	-24

Samkvæmt niðurstöðum í töflum 5 hefur BSA tilhneigingu til að mynda prótein húð á flestum efnum, bæði vatnsfælnum og vatnsæknum. Hugsanlega virka uppleyst prótein í matvælaíðnaði á svipaðan hátt og BSA, þ.e.a.s. þau hafi tilhneigingu til að mynda prótein húð, sem síðan getur auðveldað viðloðun örvera.

Ofangreind gildi á þáttum yfirborðsspennunnar fyrir BSA má einnig nota til að reikna út breytingu í frjálrsri orku, ΔG_{132} , við viðloðun baktería við efni með BSA húð, t.d. BSA húðað plast eða stál, Sjá töflu 6.

Tafla 6 Breyting í frjálstri orku, ΔG_{132} við viðloðun baktería við BSA húðað efni

Baktería	ΔG_{132} (mJ/m ²)
<i>A. actinomycetemcomitans</i> HG1099	-54
<i>S. marcescens</i> RZ38	-9
<i>S. sobrinus</i> HG970	-17

Samkvæmt niðurstöðum í töflu 6 og töflu 4 getur BSA húð minnkað nokkuð viðloðun vatnsfælinna baktería (*A. actinomycetemcomitans* HG1099), en aukið viðloðun vatnssækinna baktería (*S. sobrinus* HG970).

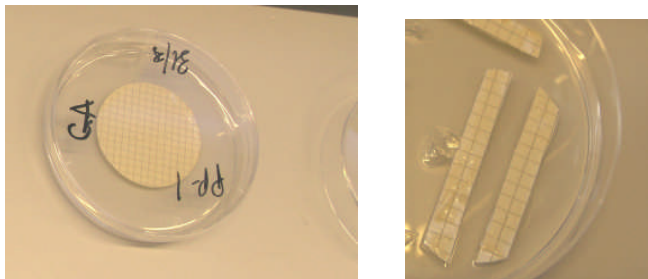
3 Mælingar á snertihorni síukaka af bakteríum við nokkra vökva

3.1 Bakteríustofnar

Bakteríurnar *L. monocytogenes* (H-99-2-2) og *Pseudomonas putida* (H-03-302-14) voru undirbúnar fyrir athugun á viðloðun þeirra við yfirborð í vatni. Stofnar eru geymdir í frysti við -70°C í næringarseyði (Nutrient Broth eða Tryptic Soy Broth frá Difco) með 20% glycerol í cryogenic glösum. Fyrir notkun eru þeir ræktaðir upp í almennu næringaræti og umsáð 3 sinnum til að fá hressan stofn til að vinna með. Stofnum af ræktunarskálum var sáð í TSB/Yeast Extract seyði og þeir látnir vaxa í einn sólarhring við stofuhita. Fjöldi bakteríanna var þá á bilinu $1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^9$ cfu/ml. Af sólarhringsgamalli rækt var 1 ml dreift á 6 petirskálar með TSA-YE (Tryptic Soy Agar með Yeast Extracti frá Difco). Skálarnar voru svo ræktaðar í 48 klst við 22°C (*P. putida*) eða 35°C (*L. monocytogenes*). Eftir ræktun voru 2 ml af buffer sett á skál og rækt sköfuð af með glerstaf og sett í tilraunaglas, endurtekið 2svar sinnum. Rækt af tveimur skálum (6 ml) var blandað saman í eitt tilraunaglas þannig að eitt glas innihélt 12 ml af þéttri rækt. Rækt af öllum skálum gaf því 36 ml af þéttri rækt sem var síðan notuð til að mynda síukökur af bakteríum.

3.2 Síukökur af bakteríum

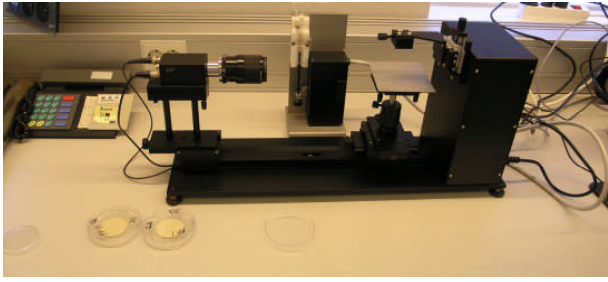
Bakteríuræktinni var skipt niður í 6 (6 ml) skilvinduglös og sýnin skilin við 7000g í 10 mínútur í Biofuge stratos skilvindu. Botnfallið var síðan þvegið með Butterfileds buffer og var skiljunin og þvotturinn endurtekið þrisvar sinnum. Í lokin eru til 36 ml af þéttri rækt. Rækt úr tveimur glösum er sameinuð og 12 ml síaðir í gegnum $0,45\mu\text{m}$ cellulose triacetate filter þannig að það fékkst síukaka af bakteríum þar sem þéttni baktería er um $10^8/\text{mm}^2$. Filterinn er síðan settur GA agarskál (1% (wt/vol) agar með 10% (vol/vol) glycerol) og geymdur í 1 klst, sjá mynd 1. Það var gert til að koma jafnvægi á rakainnihald síukökunnar á filternum. Filter með síuköku er síðan klipptur í ca. 1 cm breiða búta, sjá mynd 1, og settur á sýnadisk (-haldara) með tvöföldu límbandi og látið þorna í 30 mín fyrir mælingu.



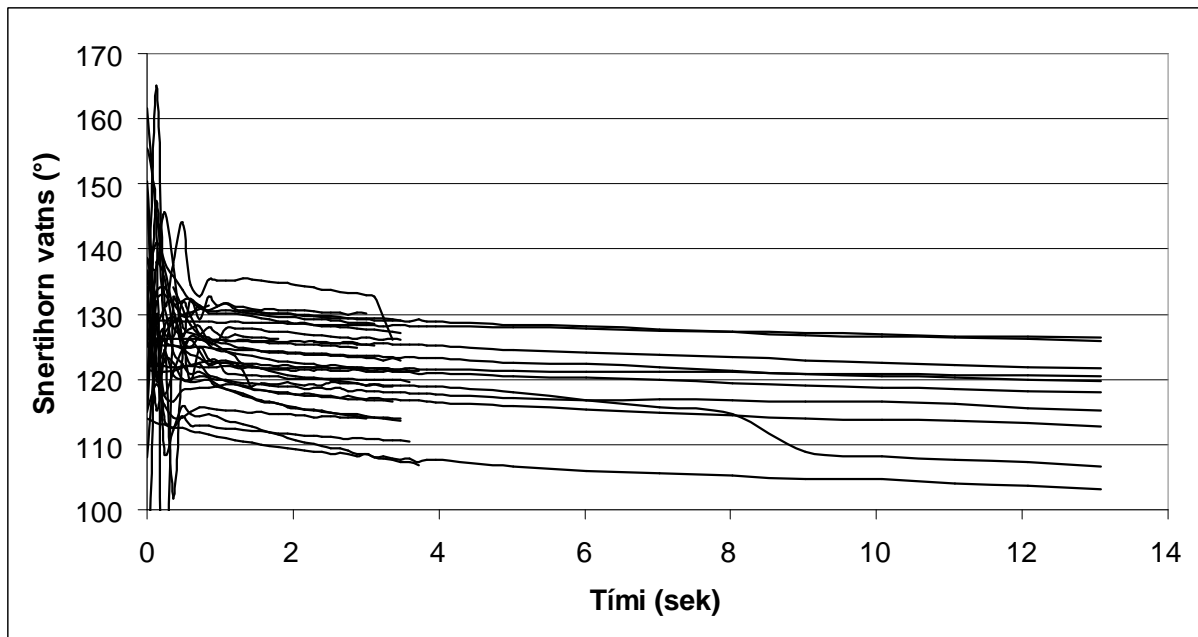
Mynd 1 Filter af með síuköku af *Pseudomonas putida* í agar skál og niðurskorinn filter með bakteríum.

3.3 Mælingar á snertihorni

Við mælingar á snertihorni var notaður snertihornsmælir CAM 200 frá KSV Instruments sjá mynd 2. Við mælingar á snertihorni á síukökum af bakteríum er dropi látin setjast á sýnið. Þegar dropinn sest fer í gang myndataka af dropanum á yfirborðinu. eru teknar myndir á 120 ms fresti fyrstu 3 - 4 sekúndurnar og stundum eru teknar myndir eftir það á sekúndu fresti í 9 sekúndur. Hugbúnaður sem fylgir tækinu er síðan notaður til að reikna út snertihorn dropanna við yfirborðið. Niðurstöður frá mælingum á snertihorni vatns við síukökur af *Pseudomonas putida* eru sýndar á mynd 3.



Mynd 3 CAM 200 snertihornsmælir frá KSV Instruments. Einnig er sýnt hvernig tækinu var komið fyrir í kassa til að draga úr truflunum frá utanaðkomandi ljósi.



Mynd 2 Niðurstöður mælinga á snertihorni vatns við síukökur af *Pseudomonas putida*.

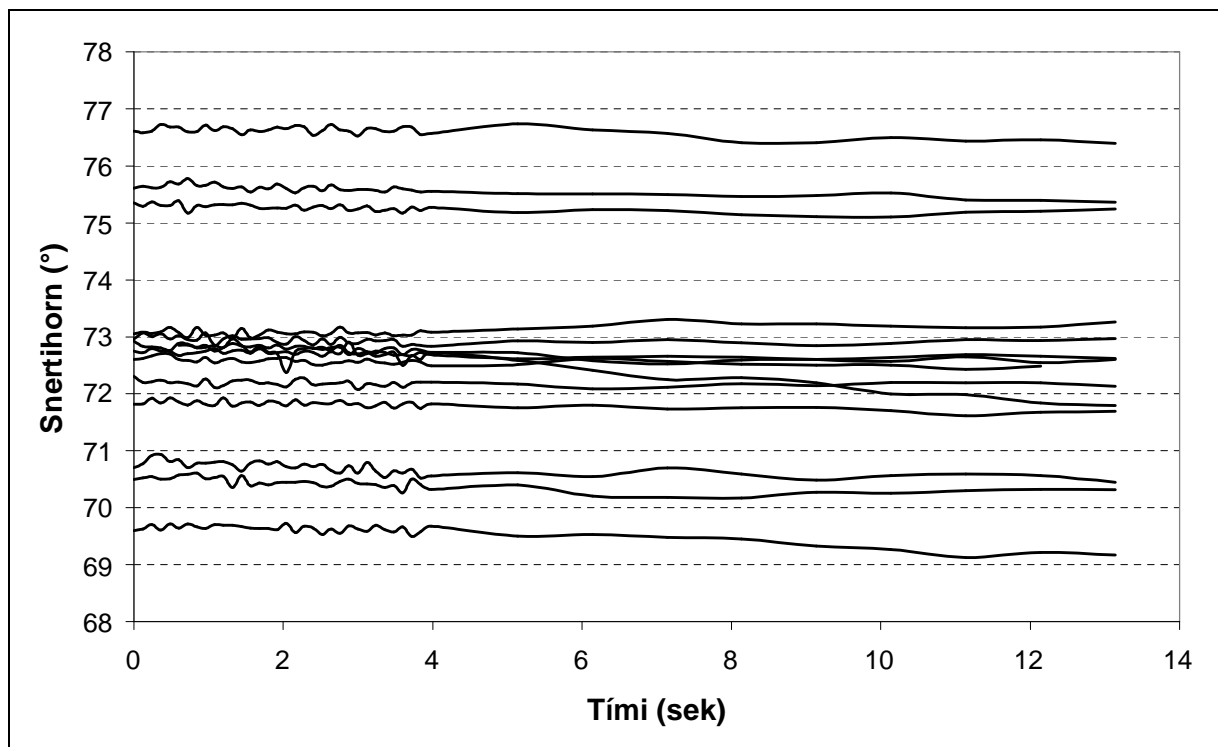
Ef að síukökurnar eru hæfar til snertihornsmælinga þarf helst að vera smá tími þar sem snertihorn sem fall af tíma er nokkurn vegin stöðugt og hefur það gildi verið tekið sem snertihornið (Sharma og Rao 2002). Þetta ástand getur varað frá 0,5 upp í 3-4 sekúndur efir að dropi var settur á sýnið, en fyrstu sekúndubrotin getur snertihornið verið mjög óstöðugt, eins og fram kemur á mynd 2. Eins og sést á mynd 2 næst í fæstum tilfellum stöðugt ástand 0,5 – 1 sekúndum eftir að dropi er settur á sýnið. Hér er því tekið mið af aðferð Busscher o.fl. (Busscher o.fl. 1984) en þar er miðað við að extrapólera gildi á snertihorni línulega í tíma = 0 sek frá tímabili þar sem snertihorn sem falla af tíma er tiltölulega línulegt, t.d. á tímabilinu 1 sek til 3 – 4 sek. Meðaltal og staðalfrávik snertihorns eru sýnd í töflu 7.

Snertihorn ethylene glýkol og djóðmetan við síukökur af *Pseudomonas putida* var einnig mælt, sjá niðurstöður í myndum 3 og 4. Í öllum tilfellum gáfu mælingar með ethylene glýkol og djóðmetan stöðugri niðurstöður en mælingar með vatni. Niðurstöður útreikninga á snertihorni eru sýndar í töflu 7.

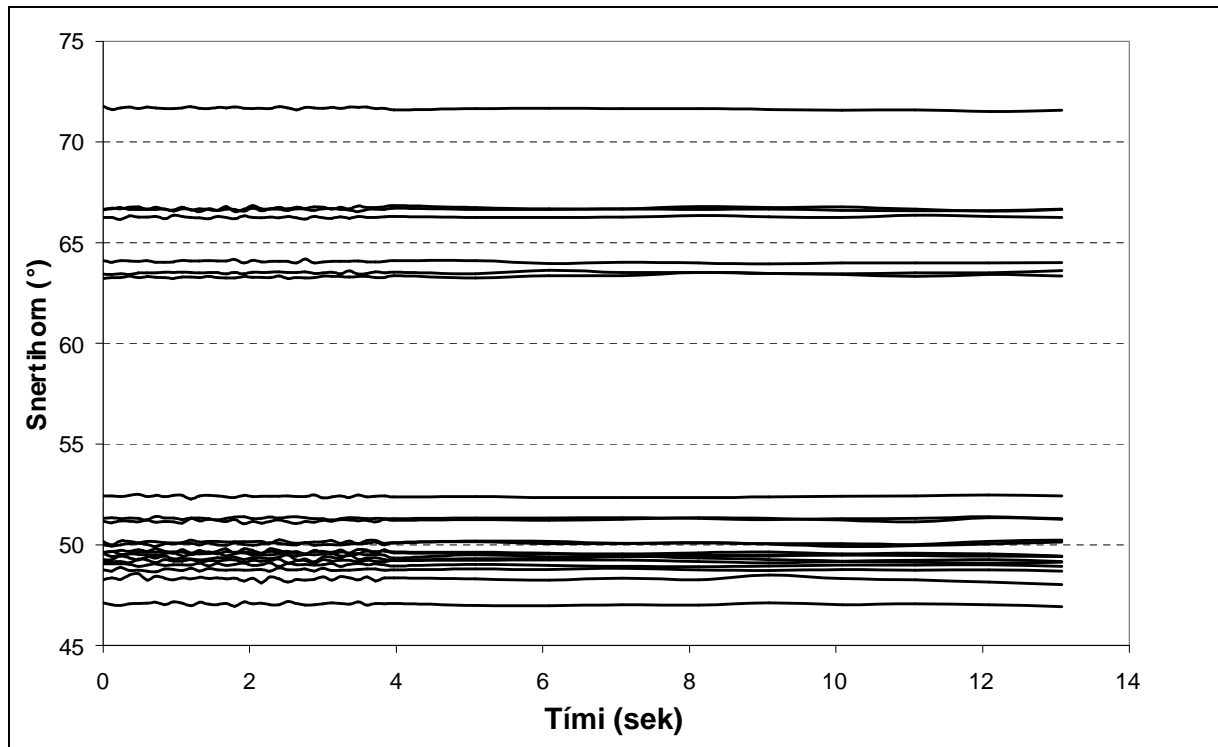
Tafla 7 Snertihorn mismunandi vökva við súkökur af *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes*.

Baktería	Vatn		Etýlene glýcól		Díjoðmetan	
	Snertihorn	Staðalfrávik	Snertihorn	Staðalfrávik	Snertihorn	Staðalfrávik
<i>Pseudomonas putida</i> ^a	124,5	6,2	72,7	2,1	54,8	8,2
<i>Listeria monocytogenes</i>	55,9 ^b	1,9	69,7 ^b	3,4	54,0 ^c	1,4

^a Meðaltal og staðalfrávik 14 – 27 mælinga
^b Meðaltal og staðalfrávik 6 mælinga
^b Meðaltal tveggja mælinga



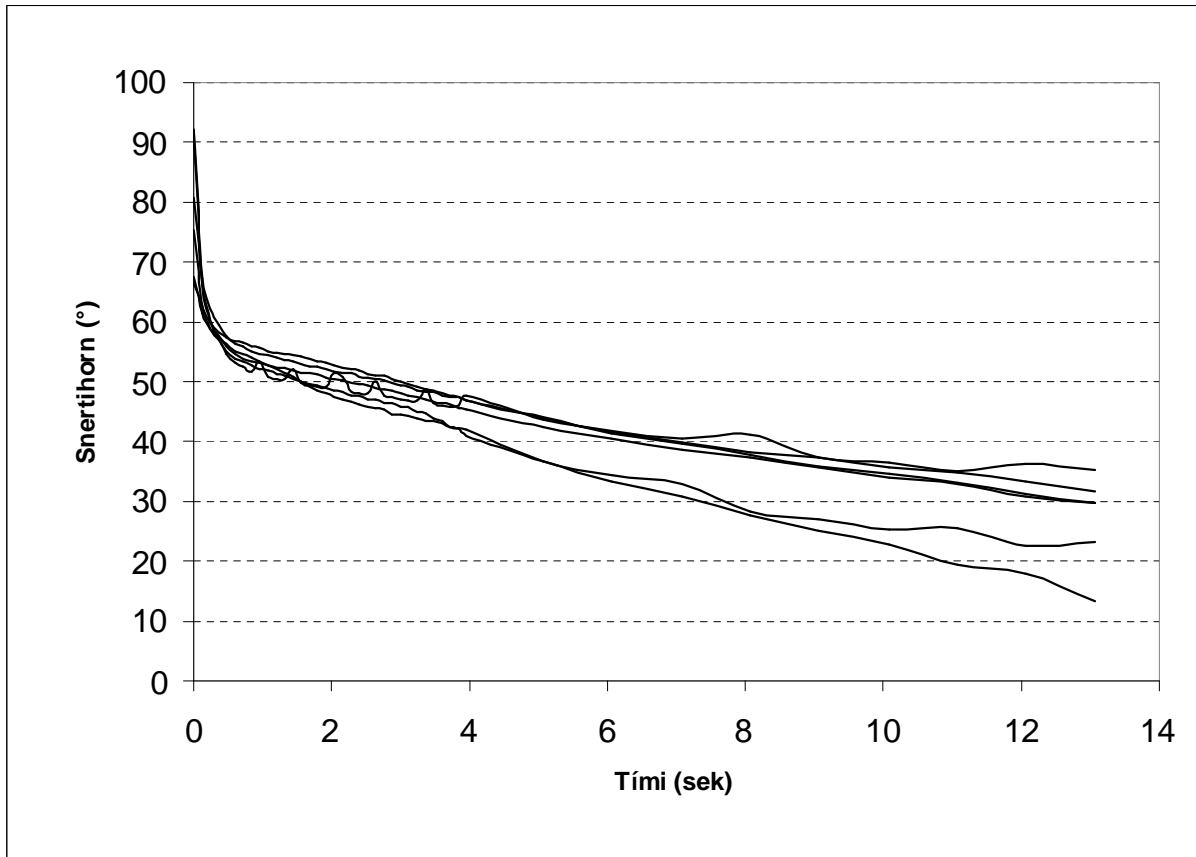
Mynd 3 Niðurstöður mælinga á snertihorni etýlen glýkól við súkökur af *Pseudomonas putida*.



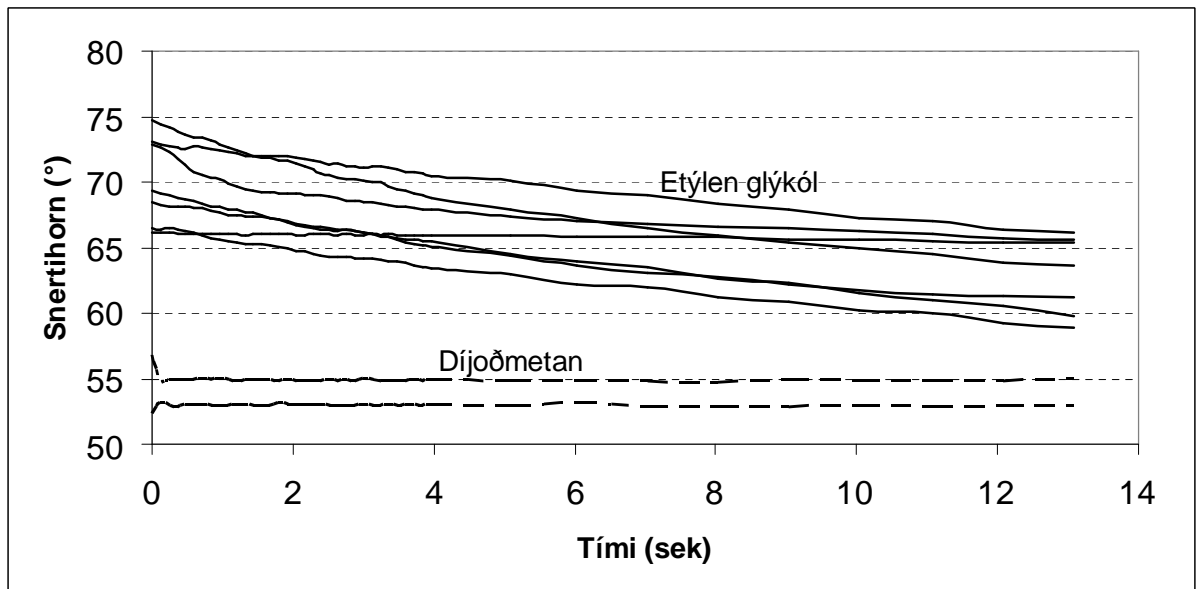
Mynd 4 Niðurstöður mælinga á snertihorni díjoðmetan við súkökur af *Pseudomonas putida*.

Ekki tókst að ná eins mörgum snertihorns mælingum fyrir *Listeria monocytogenes* og fyrir *Pseudomonas putida*, sjá myndir 5 og 6, þrátt fyrir að þéttni bakteríuræktar væri svipuð (sjá kafla 3.1.). Snertihorn vatns við flatir af *Listeria monocytogenes* breyttist mikið sem fall af tíma, en extrapólering í tími = 0 sek gaf gildi á snertihorni sem gott samræmi var í (staðalfrávik 2°), sjá töflu 7. Einungis tókst að ná tveimur mælingum af snertihorni díjoðmetan við flatir af *Listeria monocytogenes*, en þessum tveimur mælingum bar mjög vel sama, sjá mynd 6.

Þrátt fyrir þessa annmarka á mælingum snertihorns vökva við *Listeria monocytogenes* verður notast við þau gildi sem fengust með því að extrapólera í tími = 0 sek, sjá niðurstöður í töflu 7.



Mynd 5 Niðurstöður mælinga á snertihorni vatns við súkökur af *Listeria monocytogenes*.



Mynd 6 Niðurstöður mælinga á snertihorni etýlen glýkól og díjoðmetan við súkökur af *Listeria monocytogenes*.

4 Niðurstöður og umræður

Snertihorn mismunandi vökva við flatir af *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes*, sjá töflu 7 og þætti yfirborðspennu viðkomandi vökva skv. töflu 1 má nota til að reikna út þætti yfirborðspennu fyrir viðkomandi síkökur. Er þar notast við jöfnu 6, sjá niðurstöður í töflu 8.

Þætti yfirborðspennunnar fyrir bakteríurnar má síðan nota til að reikna út breytingu í frjálsri orku þegar bakteríurnar snertast í vatni, ΔG_{131} . Niðurstöður þessara útreikninga eru sýndar í töflu 8.

Tafla 8 Þættir yfirborðspennunnar fyrir *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes*. Einnig er sýnd breyting í frjálsri orku þegar bakteríur snertast í vatni (ΔG_{131})

	γ (mJ/m ²)	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	ΔG_{131} (mJ/m ²)
<i>Pseudomonas putida</i>	35,3	31,6	3,8	0,47	7,6	-41,9
<i>Listeria monocytogenes</i>	49,1	32,0	17,1	1,4	51,9	31,3

Samkvæmt niðurstöðum í töflu 8 er *Pseudomonas putida* vatnsfælin baktería og ætti því að festast vel við vatnsfælin yfirborð í vatni. Reyndar sýna niðurstöður útreikninga á frjálsri orku við viðloðun *Pseudomonas putida* við ýmis yfirborð að *Pseudomonas putida* hefur einnig tilhneigingu til að loða við mjög vatnssækin yfirborð eins og tannglerung, sjá töflu 9. *Listeria monocytogenes* er aftur á móti vatnssækin baktería og hefur því minni tilhneigingu en *Pseudomonas putida* að loða við ýmis yfirborð, sjá töflu 9.

Tafla 9 Breyting í frjálsri orku, ΔG_{132} við viðloðun *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes* við nokkur efni.

Efni	ΔG_{132} (mJ/m ²)	
	<i>Pseudomonas putida</i> við yfirborð	<i>Listeria monocytogenes</i> við yfirborð
Pólýetýlen – LD	-55	-8
Ryðfrítt stál	-16	24
Tannglerungur	-7	35

Þessar niðurstöður skýra að einhverju leiti hvers vegna *Pseudomonas putida* er svo algeng í fiskvinnslu sem raun ber vitni en þessi tegund er ein af þeim Gram neikvæðum bakteríum sem algengt er einangra úr fiskvinnsluumhverfi. Eftir þrif hafa þessar bakteríur einangrast af yfirborði á ýmis konar vinnslubúnaði (Birna Guðbjörnsdóttir og Hjörleifur Einarsson 1998). Benda má að ýmsar rannsóknir hafa sýnt fram á að *Pseudomonas* tegundir þar á meðal *P. putida* virðast hafa mjög hagstæð áhrif á festingu *Listeria* við yfirborð (Bourion og Cerf 1996, Hassan; Birt, og Frank 2004, Birna Guðbjörnsdóttir 2004). Báðar þessar tegundir eru mjög algengar í fiskvinnsluumhverfi. En eins og fram kemur hér að framan þá er stofninn af *Listeria monocytogenes* sem var prófaður hér vatnssækin og festist því ekki eins vel við ýmis

yfirborð í samanburði við *P. putida* en í sambylí t.d. í fiskvinnsluumhverfi gætu þær haft hagstæð áhrif á festingu hjá hvor annarri. Hér var því reiknað út frá niðurstöðum í töflu 8 hver breyting væri í frjálstri orku samkvæmt jöfnu 9 þegar *Listeria monocytogenes* sest á yfirborð þakið *Pseudomonas putida*. Niðurstaðan var að $\Delta G_{132} = -1 \text{ kJ/m}^2$, sem sýnir að *Pseudomonas putida* á ryðfríu stáli getur auðveldar viðloðun *Listeria monocytogenes*, samborið við hreint stályfirborð, sjá töflu 9. *Pseudomonas putida* á pólýetýlen getur aftur á móti dregið úr viðloðun *Listeria monocytogenes* samanborið við hreint pólýetýlen, sjá töflu 9.

Óhreinindi í matvælavinnslu eru af ýmsum toga og við fiskvinnslu eru prótein ein erfiðustu óhreinindir sem eru til staðar og mynda þau einskonar filmu yfir vinnslubúnaðinn ef hann er ekki þrífinn reglulega eftir ákveðnum aðferðum. Þessi óhreinindi geta bæði verið sýnileg og ósýnileg. Þessi óhreinindi geta haft áhrif á festingu örvera við yfirborð og myndunar á örveruþekju eins og dæmið um bovine serum albumin (BSA) sýndi hér að framan. Tilraunir með BSA, hafa sýnt fram á að þau hafi tilhneigingu til að mynda prótein húð (hugsanlega virka uppleyst prótein í matvælaiðnaði á svipaðan hátt), sem síðan getur auðveldað viðloðun örvera. Þessi áhrif geta þó verið mismikil eftir því hvort um er að ræða vatnssækna bakteríu eða vatnsfælna en útreikningar sýna að BSA húð getur minnkað nokkuð viðloðun vatnsfælinna baktería (*A. actinomycetemcomitans* HG1099), en aukið viðloðun vatnssækinna baktería (*S. sobrinus* HG970).

Yfirborðspenna, og þættir yfirborðspennu fastra efna, hefur áhrif á hversu auðvelt er að þrífa yfirborð með hreinsiefnum. Sýnt hefur verið að það er auðveldara að þrífa sólblómaolíu af yfirborðum sem hafa háan pólár hluta yfirborðsspennurnar en af yfirborðum með lágan pólár hluta yfirborðsspennurnar (Boulangé-Petermann o.fl. 2003, Boulangé-Petermann o.fl. 2004),. Þetta er vegna þess að vatn og yfirborðsvirk efni eiga auðveldar að komast milli olíu of vatnssækis yfirborðs en olíu og vatnsfælinis yfirborðs (Boulangé-Petermann; Gabet, og Baroux 2006). Svipað gildir líklega um önnur óhreinindi.

Yfirborðspenna efna sem notuð eru í tæki og á gólf og vegg í matvælaiðnaði skiptir því bæði máli fyrir myndun örveruþekju og hversu auðvelt er að þrífa yfirborð.

5 Heimildir

- Bagge-Ravn, D.; Ng, Y.; Hjelm, M.; Christiansen, J. N.; Johansen, C., og Gram, L. The Microbial Ecology of Processing Equipment in Different Fish Industries - Analysis of the Microflora During Processing and Following Cleaning and Disinfection. *International Journal of Food Microbiology*. 2003 Nov 1; 87(3):239-250.
- Beresford, M. R.; Andrew, P. W., og Shama, G. *Listeria Monocytogenes* Adheres to Many Materials Found in Food-Processing Environments. *Journal of Applied Microbiology*. 2001 Jun; 90(6):1000-1005.
- Birna Guðbjörnsdóttir. Áhrif hönnunar á festingu og dreifingu örvera með sérstakri áherslu á *Listeria monocytogenes*. Reykjavík: Meistararitgerð í matvælafræði við Raunvísindadeild Háskóla Íslands; 2004.
- Birna Guðbjörnsdóttir og Hjörleifur Einarsson. Úttekt á hreinlæti í íslesnkum fikiðnaði. 1998; Rf-skýrsla 10-98. 24 s.
- Boulangé-Petermann, L.; Debaq, C.; Poiret, P., og Cromieres, B. Effect of physical chemistry of polymeric coating surfaces on fouling and cleanability with particular reference to the food industry. Mittal, K. L., Ritstj. Contact angle wettability and adhesion. Utrecht, The Netherlands: VSP;2003, pp. 501-519.
- Boulangé-Petermann, L.; Gabet, C., og Baroux, B. On the Respective Effect of the Surface Energy and Micro-Geometry in the Cleaning Ability of Bare and Coated Steels. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006 Jan 5; 272(1-2):56-62.
- Boulangé-Petermann, L.; Robine, E.; Ritoux, S., og Cromieres, B. Hygienic Assessment of Polymeric Coatings by Physico-Chemical and Microbiological Approaches. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2004; 18(2):213-225.
- Bourion, F. og Cerf, O. Disinfection Efficacy Against Pure-Culture and Mixed-Population Biofilms of *Listeria Innocua* and *Pseudomonas Aeruginosa* on Stainless Steel, Teflon(R) and Rubber. *Sciences Des Aliments*. 1996; 16(2):151-166.
- Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H.; Vandermei, H. C.; Vanpelt, A. W. J.; Dejong, H. P., og Arends, J. Measurement of the Surface Free-Energy of Bacterial-Cell Surfaces and Its Relevance for Adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984; 48(5):980-983.
- Clint, J. H. og Wicks, A. C. Adhesion Under Water: Surface Energy Considerations. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2001 Aug; 21(4):267-273.
- Flint, S. H.; Brooks, J. D., og Bremer, P. J. The Influence of Cell Surface Properties of Thermophilic Streptococci on Attachment to Stainless Steel. *Journal of Applied Microbiology*. 1997 Oct; 83(4):508-517.
- Gram, L. og Huss, H. H. Microbiological Spoilage of Fish and Fish Products. *International Journal of Food Microbiology*. 1996 Nov; 33(1):121-137.
- Hassan, A. N.; Birt, D. M., og Frank, J. F. Behavior of *Listeria Monocytogenes* in a *Pseudomonas Putida* Biofilm on a Condensate-Forming Surface. *Journal of Food Protection*. 2004 Feb; 67(2):322-327.
- Herald, P. J. og Zottola, E. A. Attachment of *Listeria-Monocytogenes* to Stainless-Steel Surfaces at Various Temperatures and Ph Values. *Journal of Food Science*. 1988 Sep-1988 Oct 31; 53(5):1549-&.
- Hood, S. K. og Zottola, E. A. Adherence to Stainless Steel by Foodborne Microorganisms During Growth in Model Food Systems. *International Journal of Food Microbiology*. 1997 Jul 22; 37(2-3):145-153.
- Kusumaningrum, H. D.; Riboldi, G.; Hazeleger, W. C., og Beumer, R. R. Survival of Foodborne Pathogens on Stainless Steel Surfaces and Cross-Contamination to Foods. *International Journal of Food*

- Microbiology. 2003 Aug 25; 85(3):227-236.
- Lunden, J. M.; Miettinen, M. K.; Autio, T. J., og Korkeala, H. J. Persistent *Listeria Monocytogenes* Strains Show Enhanced Adherence to Food Contact Surface After Short Contact Times. *Journal of Food Protection*. 2000 Sep; 63(9):1204-1207.
- Mafu, A. A.; Roy, D.; Goulet, J., og Magny, P. Attachment of *Listeria-Monocytogenes* to Stainless-Steel, Glass, Polypropylene, and Rubber Surfaces After Short Contact Times. *Journal of Food Protection*. 1990 Sep; 53(9):742-746.
- Norwood, D. E. og Gilmour, A. Adherence of *Listeria Monocytogenes* Strains to Stainless Steel Coupons. *Journal of Applied Microbiology*. 1999 Apr; 86(4):576-582.
- Norwood, D. E. og Gilmour, A. The Differential Adherence Capabilities of Two *Listeria Monocytogenes* Strains in Monoculture and Multispecies Biofilms as a Function of Temperature. *Letters in Applied Microbiology*. 2001 Oct; 33(4):320-324.
- Sharma, P. K. og Rao, K. H. Analysis of Different Approaches for Evaluation of Surface Energy of Microbial Cells by Contact Angle Goniometry. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2002 Aug 5; 98(3):341-463.
- Sigrún Guðmundsdóttir. *Listeria* gagnagrunnur. 2000; Rf-skýrsla 10-00.
- Sinde, E. og Carballo, J. Attachment of *Salmonella* Spp. And *Listeria Monocytogenes* to Stainless Steel, Rubber and Polytetrafluorethylene: the Influence of Free Energy and the Effect of Commercial Sanitizers. *Food Microbiology*. 2000 Aug; 17(4):439-447.
- Van Der Mei, H. C.; Bos, R., og Busscher, H. J. A Reference Guide to Microbial Cell Surface Hydrophobicity Based on Contact Angles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 1998 Jul 15; 11(4):213-221.
- van Oss, Carel J. *Interfacial forces in aqueous media*. CRC; 1994. 440 p .
- Wirtanen, G.; Saarela, M., og Mattila-Sandholm, T. Biofilms - Impact on hygiene in food industries. Í: J.D.Bryers , Ritstj. Biofilms II: Process Analysis and Applications. Wiley-Liss, Inc; 2000; pp. 327-372.