

Verkefnaskýrsla Rf

09 - 04



Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins

Nóvember 2004

Örverur og viðloðun þeirra við
vinnsluumhverfi sjávarafurða

Birna Guðbjörnsdóttir
Hélène L. Lauzon
Sigrún Guðmundsdóttir
Guðjón Þorkelsson

Örverur og viðloðun þeirra við yfirborð í vinnsluumhverfi sjávarafurða

Birna Guðbjörnsdóttir (birna@rf.is)
Hélène L. Lauzon (helene@rf.is)
Sigrún Guðmundsdóttir (sigrun@rf.is)
Guðjón Þorkelsson (gudjont@rf.is)

Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

Reykjavík 2004

Titill / Title	Örverur og viðloðun þeirra við yfirborð í vinnsluumhverfi sjávarafurða/ <i>Microbial attachment to processinglines for seafood</i>		
Höfundar / Authors	Birna Guðbjörnsdóttir, Sigrún Guðmundsdóttir, Hélène L. Lauzon og Guðjón Þorkelsson		
Skýrsla Rf / IFL report	09-04	Útgáfudagur / Date:	2004
Verknr. / project no.	1550		
Styrktaraðilar / funding:	Rannís		
Ágrip á íslensku:	<p>Markmið verkefnisins var að auka heilnæmi og öryggi sjávarafurða við framleiðslu þeirra með markvissu vali á efnum sem notuð eru í vinnslubúnað og efnum ætluðum til þvotta og sótthreinsunar. Verkefnið byggðist á úttektum á hönnun í iðnaðinum og rannsóknum á viðloðun baktería í vinnsluumhverfi og á rannsóknastofu. Markmiðum var náð með því að þróa og prófa aðferðir við rannsóknir á viðloðun <i>Listeria monocytogenes</i> við algeng yfirborð vinnslubúnaðar í rækju- og fiskvinnslu í samspili við aðrar bakteríur. Einnig voru áhrif nokkurra hreinsiefna á vöxt baktería metin, bæði í lausn og þegar frumur voru fastar við yfirborð. Í þessu verkefni hefur örverufræðileg þekking og færni við að rannsaka festingu örvera á yfirborð vinnslubúnaðar og til að meta áhrif hreinsiefna á hana verið byggð upp. Helstu niðurstöður voru að algengar bakteríur í sjávarafurðum geta hæglega fest við öll þau efni sem voru prófuð en þau voru ryðfrítt stál (glerblásið og slípað), polyethylene (PE) polyvinyl chloride (PVC), polyurethane (PU) og voltareimar. Yfirborðsmeðferð á ryðfríu stáli hafði ekki afgerandi áhrif á viðloðun baktería og því er val á sléttara yfirborði engin trygging fyrir því að auðveldara sé að þrifa það eða að halda því hreinu. Öll hreinsiefni sem voru prófuð virkuðu vel á <i>Listeria monocytogenes</i>. Ein tegund iðrabaktería <i>Serratia liquefaciens</i> var með mesta þolið gagnvart hreinsiefnunum. Hreinsiefni virka ekki eins vel á bakteríur sem eru fastar við yfirborð eins og þær sem eru í lausn.</p>		
Lykilorð á íslensku:	Örverur, yfirborðsefni, sjávarafurðir, vinnsla, <i>Listeria monocytogenes</i> , sótthreinsiefni		
Summary in English:	<p>The aim of the project was to improve microbial safety of seafood during processing with appropriate choice of specific surface materials used in processing equipment and of chemicals used for cleaning and disinfecting. The project was divided into three parts, evaluation of hygienic design of food processing equipment, studies on microbial attachment on different surfaces and on the efficiency of disinfectants on selected bacteria. During this project knowledge on how to study microbial attachment and how to evaluate efficiency of disinfectant has been established. The main results are that common fish bacteria can attach to all tested surfaces (glass beaded stainless steel, poly ethylene (PE), polyvinyl chloride (PVC), polyurethane (PU) and Voltabelts. Surface topography on stainless steel did not affect the microbial attachment so smooth surfaces do not always improve hygiene benefits over rougher surfaces. All disinfectants tested inhibited the growth of <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Serratia liquefaciens</i>. Disinfectants do not affect bacteria attached to surface as well as bacteria in solution.</p>		
English keywords:			

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	7
1.1 Áhrif hönnunar vinnslubúnaðar á öryggi matvæla	7
1.2 Hreinlætiskröfur varðandi búnað fyrir matvælavinnslu	10
1.3 Örveruþekja (biofilma)	11
1.4 Aðferðafræði við rannsóknir á örveruþekju	11
1.4.1. Ræktun á agarskálum	12
1.4.2 ATP-ljósmæling	12
1.4.3 Direct Epifluorescent Filter Technique - DEFT	12
1.4.4 Malthus - leiðnimæling	12
1.4.5 Rafeindasmásjá (SEM)	12
1.4.6 Sameindarfræðilegar aðferðir	12
1.5 Þvottur og sótthreinsun á vinnslubúnaði	13
1.6 Markmið	15
2. FRAMKVÆMD	15
2.1 Úttekt á hönnun (hygienic design) fiskvinnslubúnaðar	15
2.2 Rannsóknir á örveruþekju	15
2.2.1 Myndun örveruþekju í náttúrulegu umhverfi í fiskvinnslu og rækjuvinnslu	15
2.2.1.1 Örverumælingar og örverugreiningar	16
2.2.1.2 Sameindafræðilegar aðferðir	17
2.2.2 Vaxtartilraunir í rækjuseyði	17
2.2.3 Tilraunir með viðloðun örvera á yfirborð	18
2.2.3.1 Undirbúningur yfirborðssýna	18
2.2.3.2 Hryfismælingar á stáli	18
2.2.3.2.1 Hryfismælir - stylus	18
2.2.3.2.2 Rafeindasmásjá	19
2.2.3.3 Viðloðun baktería á yfirborði. Fyrri tilraun	19
2.2.3.3.1 Aðferðir við mat á festingu örvera við yfirborði	19
2.2.3.3.2 Viðloðun baktería við yfirborð. Seinni tilraun	20
2.2.3.3.3 Tölfræðileg úrvinnsla á tilraunum með viðloðun baktería á yfirborð	20
2.3 Áhrif hreinsiefna á vöxt baktería	21
2.3.1 Bakteríur	21
2.3.2 Þvotta- og sótthreinsiefni	21
2.3.3 Mat á áhrifum hreinsiefna á bakteríur í lausn	21
2.3.3.1 Framkvæmd	21
2.3.3.2 Túlkun niðurstaðna	22
2.3.4 Aðferðir til að meta áhrif hreinsiefna á bakteríur fastar við yfirborð	22
2.3.4.1 Hefðbundin penslun með bómullarpinna	22
2.3.4.2 Malthus leiðnimælingar - aðferðafræði	22
2.3.4.2.1 Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á fjölda <i>Listeria</i> við 25°C ræktun og gerð staðalkúrfu	22
2.3.4.2.2 Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á fjölda <i>Pseudomonas</i> tegundar við 25°C ræktun og gerð staðalkúrfu	23
2.3.4.2.3 Mat á fjölda <i>Pseudomonas putida</i> og <i>Listeria monocytogenes</i> eftir sótthreinsun	23
3. NIÐURSTÖÐUR	24
3.1 Úttekt á hönnun á fiskvinnslubúnaði	24
3.2 Rannsóknir á örveruþekju (biofilmu)	25
3.2.1 Örverusamsetning á stálsýnum	25
3.2.1.1 Fiskvinnsla	25
3.2.1.2 Rækjuvinnsla	25
3.2.1.3 Örverusamsetning	26
3.2.1.4 Sameindafræðilegar aðferðir	28

3.2.2 Vaxtartilraunir í rækjuseyði: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas I/II</i> , <i>Pseudomonas III/IV</i> , <i>Aeromonas</i> og <i>Serratia liquifaciens</i>	29
3.3 Tilraunir á viðloðun baktería við yfirborð	29
3.3.1 Hryfismælingar	29
3.3.2 Áhrif yfirborðsefna á viðloðun örvera. Fyrri tilraun	31
3.3.2.1 Niðurstöður hefðbundinna örverumælinga og ATP mælinga	31
3.3.2.2 Niðurstöður smásjárskoðunar eftir litun með AO	33
3.3.2.3 Niðurstöður eftir skoðun með rafeindasmásjá	33
3.3.3 Áhrif yfirborðsefna á viðloðun örvera – seinni tilraun	34
3.4 Áhrif sóttþreinsiefna á bakteríur	39
3.4.1 Bakteríur í lausn	39
3.4.2 Bakteríur fastar við yfirborð	40
3.4.2.1 Virkni hreinsiefna metin með hefðbundinni penslun	40
3.4.2.2 Malthus aðferð	41
3.4.2.2.1 Sérhæfni og staðalkúrfa fyrir Malthus aðferðirnar:	41
3.4.2.2.2 Virkni hreinsiefna metin með Malthus tækni	42
4. UMRÆÐUR	42
4.1 Úttekt á hönnun á vinnslubúnað	43
4.2 Rannsóknir á örveruþekju	43
4.2.1 Myndun örveruþekju í rækju- og fiskvinnslu	43
4.2.2 Tilraunir með viðloðun örvera á yfirborð	44
4.2.2.1 Aðferðir	44
4.2.2.2 Viðloðun baktería á mismunandi yfirborð	44
4.3 Áhrif hreinsiefna á bakteríur	45
5. LOKAORÐ	46
6. ÞAKKARORÐ	46
7. HEIMILDIR	46
VIÐAUKI 1: ALGENGUSTU YFIRBORÐSEFNI SEM NOTUÐ ERU VIÐ BYGGINGU Á VINNSLUBÚNAÐI OG ALGENGUSTU ÞVOTTA- OG SÓTTÞREINSIEFNI NOTUÐ VIÐ ÞRIF Í MATVÆALVINNSLUM	51

1. INNGANGUR

1.1 Áhrif hönnunar vinnslubúnaðar á öryggi matvæla

Matvælaöryggi hefur mikið verið í umræðunni um allan heim og fengið aukna athygli. Það er ekki síst vegna þess að tíðni fæðuborinna sjúkdóma hefur verið að aukast á heimsvísu (Snowdon o.fl., 2002). Öryggi matvæla er sameiginlegt verkefni matvælaframleiðenda, stjórnvalda og neytenda og kröfur um öryggi og heilnæmi matvæla hafa stöðugt verið að aukast og eiga eftir að aukast enn frekar í framtíðinni.

Mengun af völdum örvera er líklega einn mikilvægasti þátturinn þegar horft er á áhrif meðhöndlunar í gegnum vinnsluferilinn frá hafi til maga á öryggi sjávarafurða. Örverumengun í sjávarafurðum er háð ýmsum þáttum eins og uppruna hráefnis, meðhöndlun hráefnisins, framleiðsluháttum, þökkunaraðferðum, flutningi og geymslu svo fátt eitt sé nefnt. Vinnsluumhverfið sjálf þ.e. húsnæði og búnaður hefur einnig mikil áhrif. Þegar matvæli fara í gegnum vinnslulínu þá skilja þau eftir sig leifar eða óhreinindi og tekur upp örverur sem leynast á snertiflötum. Ef ekkert er að gert fjölga örverurnar sér í óhreinindunum það mikið að þær fara að hafa áhrif á gæði og öryggi matvælna sem fara í gegnum vinnslulínuna. Einnig geta matvælin mengast af völdum efna sérstaklega ef skolun eftir þrif og sótthreinsun er ábótavant. Smurefni frá ýmsum vinnslubúnaði eins og t.d. færíböndum geta einnig borist í matvælin (Steenard o.fl., 2002). Svæði sem eru ekki í beinni snertingu við matvælin eins og gólf, veggir og loft skipta líka máli. Þau þurfa að vera hönnuð þannig að hægt sé að þrifa þau vel og að þau endist vel. Þrifavæn hönnun (hygienic design) á húsnæði og vinnslubúnaði er því mjög mikilvæg í baráttunni við framleiðslu á öruggum og heilnæmum matvælum. Markmiðið með þrifavænni hönnun er að framleiða búnað fyrir matvælavinnslu sem auðvelt er að skoða, taka í sundur og þrifa. Allir sem koma að framleiðslu matvæla bera sameiginlega ábyrgð á því að matvælin séu öruggt til neyslu. Þar eru framleiðendur vinnslubúnaðar ekki undanskildir og eru jafnábyrgir þeim sem stýra matvælaframleiðslunni sjálfri. Þegar hefja á framleiðslu á matvælum þarf að hafa hönnun á húsnæði og vinnslubúnaði í huga frá upphafi. Fyrst þarf að athuga staðsetningu og umgjörð á húsnæði fyrir mat-

vælaframleiðslu. Því næst að huga að aðskilnaði á hráefni og unninni vöru og að athuga flæði vörunnar í gegnum vinnsluferilinn. Einnig er mjög mikilvægt að stjórna umferð starfsfólks á milli vinnslusvæða til að koma í veg fyrir að óæskilegar örverur berist á milli svæða.

Þrifavæn hönnun hefur a.m.k fimm mikilvæga kosti fyrir matvælaframleiðendur:

- *Öryggi matvæla* - kemur í veg fyrir mengun af liffrænum, efna- eða eðlisfræðilegum toga t.d. af völdum sjúkdómsvaldandi örvera, smurefna, hreinsiefna eða aðskotahluta eins og málma og glers.
- *Gæði afurða* - kemur í veg fyrir að hráefni safnist saman á ákveðnum stöðum í vinnsluferlinu og að örverurnar nái að fjölga sér þar og hafi þannig áhrif á geymsluþol afurðanna.
- *Árangursríkari þrif* - þrif verða auðveldari/einfaldari þannig að þrifatími styttest og minni líkur eru á að afurðir mengist af völdum illa þrifins vinnslubúnaðar.
- *Minni þrifakostnaður* - þar sem þrifatími styttest og notkun hreinsiefna verður minni, launakostnaður og efnakostnaður lækkar.
- *Minni unhverfismengun* - minni notkun hreinsiefna við þrif þýðir minna magn þeirra í frárennsli vinnslustöðva.

1.2 Hreinlætiskröfur varðandi búnað fyrir matvælavinnslu

Almennt er talið að mengun matvæla af völdum örvera eigi sér ferns konar meginupptök: frá hráefni, vinnsluumhverfi, frá mönnum og dýrum og með lofti. Auk hráefnis er vinnsluumhverfið líklega mikilvægasta mengunarleiðin, bæði beint frá snertiflötum og óbeint t.d. frá niðurföllum, gólfi eða hlutum vinnslubúnaðar sem ekki eru í beinni snertingu við matvælin. Hönnun á tækjabúnaði og þar með árangur þrifa getur haft mikil áhrif á afkomu matvælaframleiðenda. Ef tæki er illa hannað getur tekið mjög langan tíma að þrifa það að notkun lokinni. Þannig getur reynst nauðsynlegt að stöðva vinnslu með reglulegu millibili til að þrifa tækið sem hefur bein áhrif á framleiðni og afkomu fyrirtækisins. Síðustu ár hefur vélvæðing í vinnsluferlum aukist og starfsmönnum fækkað án þess að framleiðsla skerðist. Flóknar tækjasamstæður sem hafa leyst fólk af hólmi eru oft illþrifanlegar nema með mikilli fyrirhöfn sem þá hefur kallað á meiri mannskap og aukinn

launakostnað. Hönnun á búnaði til matvæla-
vinnslu er frábrugðin hönnun á búnaði til annars
iðnaðar. Taka þarf jafnt tillit til hreinlætis og
hráefnisstreymis, varmaflutnings, véltækni, raf-
tækni og vinnuöryggis til að niðurstaðan verði
góð og lausnin heilsteypt.

Oft rekast úrlausnir þessara þátta á og verður
þá að finna málamiðlun sem beinist að því að
 tryggja sem best heilnæmi og öryggi matvæla.
Ef fylgt er eftir vinnu evrópsku tækninefndar-
innar CEN/TC 153 þá er hægt að lýsa mikilvæg-
ustu hönnunarforsendunum í eftirfarandi ellefu
liðum:

- efnisval,
- yfirborðsáferð,
- samskeyti og aðrar festingar,
- afrennsli,
- vinkla og horn að innanverðu,
- óvirk rými,
- mælitæki,
- legur og öxulop,
- klæðningar,
- hlífar og hurðir
- stýrisbúnaður.

Leiðbeiningar fyrir hönnun á opnum kerfum
hafa verið gefnar út af EHEDG Doc 13 (Curiel,
o.fl., 1996). Talið er að koma megi í veg fyrir
festingu örvera í/á tækjum ef kröfur um hrein-
læti séu hafðar með í forsendum hönnunar
(Holah & Timberley, 1999a; Wirtanen o.fl.,
2000). Ef þrif eru ekki árangursrík þá leiðir það
til þess að leifar af afurðum sitja eftir á tækjum
og örverur geta fest sig víða í vinnsluferlinu og
myndað s.k. örveruþekju eða biofilmu. Örveru-
þekju er lýst nánar seinna í þessari skýrslu..

Gerð og meðhöndlun yfirborðsefna hefur
áhrif á það hvort örverur ná að festa sig og
setjist að í vinnsluumhverfinu. Algengasta yfir-
borðsefnið í vinnslubúnaði er ryðfrítt stál, ýmis
konar plastefni og gúmmí. Ryðfrítt stál er mjög
mikið notað sem efni í búnað ætlaðan fyrir mat-
vælavinnslu. Tæringarþol þess er oftast nægilegt
og slitstyrkur góður. Í sumum tilfellum kunna
plastefni að vera heppilegur kostur þar sem þau
þola oft á tíðum ýmis efnasambönd sem notuð
eru til þrifa betur en ryðfrítt stál auk þess að
vera ódýrara og léttara. Amerískir eða þýskir
staðlar eru notaðir fyrir stál, AISI (American
Iron and Steel Institute, www.steel.org) og DIN
(Deutsches Institut für Normung, [www2.din.de/
index.php?lang=en](http://www2.din.de/index.php?lang=en)). Algengustu stálgerðirnar
eru AISI-304 og AISI-316. Stáltegundin AISI-

304 (DIN 1.4301) þolir ekki uppleyst salt eins
og í sjó eða pækli. Salt í vökva sem kemst í
snertingu við stálið orsakar svokallaða pyttatær-
ingu. Hún lýsir sér í því að í yfirborð stálsins
myndast smáir pyttir sem stækka mjög fljótt við
háan saltstyrk og geta myndað göt í mjög
þunnar plötur á nokkrum mánuðum. AISI-316
(DIN 1.4401) eða AISI-316L (DIN 1.4404) þola
betur salt. Þessar blöndur halda tæringarþoli
sínu gagnvart salti við lægri hitastig (<60°C)
(Birgir Guðlaugsson & Birna Guðbjörnsdóttir,
1997, Lelieveld o.fl., 2003, Hauser o.fl., 2004).
Rannsóknur á AISI-316 og AISI-304 með tilliti
til festingar baktería ber ekki alltaf saman og
hefur Percival (1999) sýnt fram á að fleiri
frumur festist á 304 en á 316 á meðan Flint o.fl.
(2000) sýna fram á það gagnstæða. Flint vill
meina að grófleiki yfirborðs skipti meira máli
og að líklegra sé að bakteríur festi sig við
yfirborð með Ra gildi um 0,9µm sem er næstum
jafnstórt og stærð bakteríufruma sem er um það
bil 1µm. Ra er mælikvarði fyrir grófleika
yfirborðs sem skilgreindur er í ISO staðli 4287,
1998 (Geometrical Product Specifications
(GPS) – Surfacetexture: Profile method -
Terms, definitions and surface texture paramet-
ers) og stendur fyrir meðalgrófleika á mældu
yfirborði. Ra er notað sem viðmið í kröfum um
þrífavæna hönnun. Það hefur aðeins verið deilt
um það hvort Ra sé nógu gott viðmið þar sem
það mælir aðeins ákveðna lengd sýnis og tekur
ekki tillit til hæstu toppa eða lægstu dala eins og
t.d. Rz gildið gerir. Rz gildið er einnig skilgreint
í ISO staðli 4287, 1998 og eru skilgreiningar á
Ra og Rz sýndar í ramma 1.

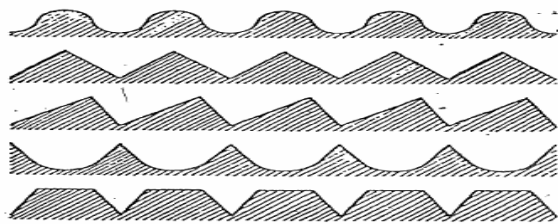
Yfirborð með sama Ra gildi getur verið mjög
mismunandi en það á svo sem einnig við um
önnur gildi sem koma til greina eins og sést á
mynd 1.

Skilgreiningar á Ra og Rz gildum eru eftirfarandi skv. ISO-4287, 1998

Ra: Ákveðin lengd sýnis mæld á grófleika korti. Þá er
meðallína tekin í X-átt og mögnun í Y-átt og er
niðurstaða gefin í µm þegar $y=f(x)$. Ekki er tekið tillit til
hæstu toppa eða lægstu dala.

Rz: Gert á sama hátt og Ra nema að nú eru mældir 5
hæstu topparnir (Y_p) og 5 (Y_v) lægstu dalirnir og
fjarlægðin á milli mæld í Y-átt. Síðan fengið meðaltal
af hæstu toppum og lægstu dölum. Summan af
þessu meðaltali er gefin upp í µm.

Ramma 1. Skilgreiningar á Ra og Rz gildum eru
eftirfarandi skv. ISO-4287, 1998



Mynd 1. Mismunandi yfirborð með sama Ra og Rz gildi (Frá Centre for Geometrical Metrology, Department of Manufacturing Engineering and Management, Technical University of Denmark.)

Almenna reglan er sú að stórir yfirborðsfletir stáls og fletir sem eru í beinni snertingu við hráefnið skuli ekki hafa hærra Ra gildi en $0,8 \mu\text{m}$ (Hauser o.fl., 2004). Samkvæmt Flint (2000) þá er hærra gildi ásættanlegt ef það er ekki nálægt stærð bakteríufurma ($1 \mu\text{m}$). Kaldvalsáðar ryðfriar stálplötur hafa yfirleitt Ra gildi $0,2\text{--}0,5 \mu\text{m}$ og þurfa því ekki sérstaka slípun nema hugsanlega við suður og beygjur. Yfirleitt er markmiðið með sérstakri meðhöndlun á stáli að fá fallgebra útlit á búnaðinn. Mjög algengt er að nota glerblásið stál í vinnslubúnað en þá er glersalla með örsmáum glerkúlum blásið um búnaðinn. Þá er hægt að blása suðusamskeyti líka og falla þau þá betur inn í heildina. Þessi áferð telst varla nógu góð með tilliti til hreinlætis miðað við Ra gildi sem er yfirleitt $1\text{--}1,2 \mu\text{m}$ (Lelieveld o.fl. 2003). Plastefni hafa yfirleitt mjög gott tæringarþol og þola vel flest efni sem notuð eru til þrifa í matvælaíðnaði. Við val á plastefnum þarf að athuga að efnið sé leyft og er hægt að skoða upplýsingar um efni sem heimil eru í EC-tilskipun 2002/72/EC eða hjá FDA (21CFR). Plastefni eru mjög mikið notuð þar sem ekki er óskað málm-í-málm snertingar, í færribönd, sem hlífar og lok, í slöngur o.fl. (Hauser o.fl., 2004). Málm-í-málm samsetningar eru ekki öruggar með tilliti til hreinlætis. Slík samskeyti eru ekki bakteríuheld og ættu því aðeins að nota þar sem ekki þarf að fullnægja þeim skilyrðum. Eftirtalin plastefni eru mikið notuð í búnað í matvælaíðnaði og eru talin auðveld í þrífum: Polypropylen (PP), Polyvinyl klóríð (PVC), Acetal copolymer (POM), Polykarbónat (PC), Polyethylene (HDPE). Önnur plastefni sem einnig eru algeng eru Fluoropolymers (t.d. PFA, PTFE), Polyetheretherketone (PEEK), Polyether Sulfone (PeSU), Polyphenylene Sulfone (PPSU) og Polysulfone (PSU). Hafa skal í huga að PTFE getur verið hrjúft og erfitt að þrifa en PFA hefur aftur móti staðist hreinlætiskröfur EHEDG

(Hauser o.fl., 2004). Tafla 1 sýnir nokkra polymera sem eru viðurkenndir.

Tafla 1. Viðurkennd plastefni – polymerar (Alan Friis, 2002)

Efni	FDA	BGA	EU
PA 66 SA	✓	✓	✓
PA 6 XAU	✓	✓	✓
PC	✓	✓	✓
PE HD	✓	✓	✓
PP	✓	✓	
PTFE	✓		✓

FDA: Matvælastofnun Bandaríkjanna

BGA: Matvælastofnun Þýskalands

EU: EU tilskipun 90/128 og 92/39

Gúmmí er mest notað til alls kyns þéttinga og í færribönd. Það eru til margar mismunandi gerðir gúmmíefna sem hægt er að mæla með í matvælavinnslulínur. Til að tryggja sem besta endingu þarf að vanda valið og kanna eiginleika efnanna með tilliti til þeirra áhrifa sem umhverfið kann að hafa á þau. Algengustu gúmmítegundir sem notaðar eru í matvælaíðnaði eru: *Hydrogenated Nitrile Butyl Rubber (HNBR)*, *Nítril (NBR, nitrile butyl rubber)*, *EPDM (ethylene propylene diene monomer)*, *Sílikon (VmQ)*, *Vítón (FPM)*, *Fluoroelastomer (FKM)* og *natural rubber (NR)*. Umhverfishitastig hefur mikil áhrif á endingu gúmmís þar sem lágt hitastig þýðir yfirleitt lengri endingartíma. Hafa skal í huga að EPDM sem er mjög hitaþolið er ekki hægt að nota í fituríku umhverfi (Hauser o.fl., 2004).

Almennt gildir um efni sem komast í snertingu við matvæli að þau þurfa að vera slétt og að þola þvotta- og sótthreinsiefnin, vera tæringarþolin og mega ekki smita eiturefnum. Framleiðendur búnaðar verða því að athuga gaumgæfilega að þau efni sem þeir velja fullnægi þessum kröfum. Fara verður að lögum í þessum efnum og er tekið á þessu í evrópsku tilskipuninni 89/109/EEC „on the approximation of the laws of the Member States relating to materials and articles in-tended to come into contact with foodstuffs“ (Hauser o.fl., 2004). Ekki eru gerðar sérstakar kröfur til flata sem ekki eru í snertingu við hráefnið aðrar en almennar kröfur um að auðvelt sé að þrifa þá. Hægt er að koma í veg fyrir mörg vandamál svo sem uppsöfnun óhreininda í kverkum og dauðum endum, ófullnægjandi afrennsli, lélegar suður, samsetningar með boltum og skrúfum sem hafa áhrif á viðloðun baktería ef farið er eftir grunnkröfum um hönnun og efnisval

(Birgir Guðlaugsson & Birna Guðbjörns-dóttir, 1997). Það getur verið mjög kostnaðarsamt að uppfylla kröfur um hreinlæti eftir á.

1.3 Örveruþekja (biofilma)

Örverur geta fest sig á nánast allt yfirborð og myndað svokallaða örveruþekju (biofilmu) svo framarlega að yfirborðið sé rakt. Örveruþekja samanstendur af bakteríum sem festast við yfirborð og við hverja aðra og eru þær venjulega umluktar millifrumumassa sem myndar eins konar net og inni í því eru göng og tómarými. Bakteríur sem eru fastar við yfirborð eru um margt öðruvísi en lausar frumur og þær þola einnig mun betur örverudrepanni efni. 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 pípu-lagnir. Hún hefur einnig valdið miklum vandamálum í varmaskiptum og kælibúnaði (Kumar & Anand, 1998). Hún er einnig mjög algeng á tönnum og þá þekkt undir nafninu tannskýla (Wood o.fl. 2000).

Ferlið byrjar á því að það myndast þunnt lífrænt lag (monolayer) á einhvers konar yfirborð. Þetta lag er úr fjölsykrum og sykurprótín-um og auðveldar það stökum frumum að festast við yfirborðið. 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. Ef þetta aðsog varir nógu lengi breytast efna- og eðlisfræðilegir eiginleikar þessa lífræna lags þannig að festing bakteríanna verður óafturkræf. Lokaskrefið er myndun á neti með göngum í utanfrumumassa úr fjölsykrum og sykurpróteinum (exopolysaccharide).

Það er þetta net sem ver bakteríufrumurnar gegn utanaðkomandi áhrifum (Allison, 1998). Um göngin í netinu flyst síðan næring og súrefni til bakteríufrumanna (mynd 2).

Nánasta vinnsluumhverfi matvæla, þar með eru talin vélar, tæki og færribönd, þarf að hreinsa reglulega til að hindra að bakteríur nái að festa sig í umhverfinu og myndi örveruþekju. Mjög erfitt er að losna við hana ef hún nær að myndast. 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 bakteríuættkvíslanna *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Listeria* og *Staphylococcus* (Wirtanen o.fl., 2000). Bakteríur sem eru í örveruþekju geta m.a. hraðað tæringu á ryðfríu stáli (Carpentier & Cerf, 1993, Raaska & Carpén, 1999, Geiser, M. o.fl., 2002) og niðurbroti á ýmsum efnum t.d. á polyurethane (Howard, 2002). En ryðfrítt stál og polyurethane eru algeng yfirborðsefni í ýmsum tækjum og færriböndum við vinnslu sjávarafurða.

Örveruþekja getur aukið hættuna á matar-sjúkdómum þar sem sjúkdómsvaldandi bakteríur geta annað hvort varist inni í henni eða jafnvel myndað hana sjálfar. Það á t.d. við um suma stofna af *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* og *Yersinia enterocolitica* (Flint o.fl., 1997a). Fyrir matvælaíðnaðinn er það mjög alvarlegt vandamál að þessar sjúkdómsvaldandi bakteríur geti fest sig við yfirborð og varist ýmsum bakteríudrepanni efnum þar á meðal algengum sótt-hreinsiefnum.

Listeria er baktería sem einangrast oft úr matvælavinnslu og má e.t.v. rekja það til þess hversu auðveldlega hún nær að festa sig í/á tæki

Mynd 2. Myndun örveruþekju (<http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/primer.html>)

1. Auðlosanlegar bakteríur (sek) – afturkræf festing
2. Bakteríur farnar að festa sig (sek-min) – óafturkræf festing
3. Vöxtur og fjölgun (klst-dagar)
4. Net úr fjölsykrum og sykurprótínunum með göngum í utanfrumumassa. (klst-dagar)
5. Aðrar bakteríur setjast að.



sem erfitt er að þrifa. *L. monocytogenes* getur fest sig við 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., 1990, Blackman & Frank, 1996, Hood & Zottola, 1997, Norwood & Gilmour, 1999, Sigrún Guðmundsdóttir, 2000, Lundén o.fl., 2000, Sinde & Carballo, 2000, Beresford o.fl., 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 & Zottola, 1988). Þetta er athyglisvert ef litið er til þess að *Listeria* er hreyfanleg þegar hún er látin vaxa við 22°C en ekki þegar hún vex við kjörhitastig sem eru 35-37°C en talið er að svipur hafi mikilvægu hlutverki að gegna við festingu örvera við yfirborð (Geesey, 2001). Rannsókn þeirra Norwood & Gilmour (2001) sýndi fram á að *L. monocytogenes* festist best við 18°C en gat þó fest sig við ryðfrítt stál við mjög lágt hitastig eða 4°C en þessi baktería er kuldaþolin og vex við kældar aðstæður. Víða er hægt að finna svæði í fiskvinnslu sem nær 18-21°C umhverfishita eins og t.d. við snyrtílinur og í kringum mótora og skapast þar því góð skilyrði til myndunar á örveruþekju. Rannsóknir Herald and Zottola (1988) leiddu einnig í ljós að Gram-neikvæðar bakteríur festust yfirleitt betur við hærri pH (5,5-7,5) samanborið við Gram-jákvæðar sem festast best við pH 4,5-5,5. Þetta er mjög athyglisvert ef litið er á hversu hátt hlutfall Gram-neikvæðra baktería einangrast úr fiskvinnsluumhverfi í samanburði við Gram-jákvæðar bakteríur (Bagge-Ravn o.fl. 2003, Birna Guðbjörnsdóttir & Hjörleifur Einarsson, 1998b). *Pseudomonas* tegundir eru Gram-neikvæðar bakteríur og eru þekktar fyrir að setjast að í vinnsluumhverfi matvæla sem bendir til þess að þær eigi auðvelt með að festa sig við ýmis konar yfirborðsefni og að þær þoli sótthreinsiefni sem verið er að nota (Hood og Zottola, 1997, Elvers et. al, 1999, Wirtanen o.fl. 2000, Arnold & Silvers, 2000, Bagge-Ravn o.fl. 2003, Hassan o.fl., 2004). *Pseudomonas* tegundir teljast til skemmdarbaktería og virðast berast inn í vinnsluna með hráefninu. Eftir þríf hafa þær aðallega einangrast úr sýnum teknum af flóknum vélasamstæðum, eins og t.d. úr flökunarvélum og hausurum (Birna Guðbjörnsdóttir & Hjörleifur Einarsson, 1998b).

Val á yfirborðsefnum er mjög mikilvægt og getur haft áhrif á hvernig til tekst með þriffin og

þá um leið hvernig tekst að koma í veg fyrir myndun á örveruþekju og mengun matvæla. Yfirborðsflatir sem eru í beinni snertingu við matvæli er yfirleitt hægt að þrifa ef markvisst er gengið til verks. Hér er átt við opin kerfi eins og í fiskvinnslu. Aftur á móti eru flatir sem ekki eru í beinni snertingu við matvælin oft meira vandamál því oft er illmögulegt að komast að þeim til að þvo og sótthreinsa. Örverurnar finna þar skjól til að fjölga sér og dreifa sér síðan í vinnsluferlið og menga afurðirnar (Zottola & Sasahara, 1994, Wirtanen et al., 2000).

1.4 Aðferðafræði við rannsóknir á örveruþekju

Rannsóknir á örveruþekju beinast m.a. að því að kanna festingu, vöxt á föstu yfirborði, losun (þvott) og dauða. Við rannsóknir á festingu eru ýmsar aðferðir notaðar og er yfirleitt byrjað á að hreinsa og meðhöndla sýnaplöturnar með ýmsum efnum, en stundum er byrjað á því að æta aðeins yfirborðið til að líkja eftir áhrifum úti í iðnaðinum og eru þá sýnin látin liggja í 1N NaOH í ákveðinn tíma. Einnig þarf að losa alla fitu burt og til þess er jafnan notað etanol eða aseton (Hood & Zottola, 1997; Norwood & Gilmour, 1999; Lundén o.fl., 2000; Joseph & Otta, 2001; Wirtanen o.fl., 2001). Við rannsóknir á örveruþekju er einnig mikilvægt að hafa frumurnar í vaxtarfasa (log-fasa) því þá gengur þeim best að festa sig við yfirborð (Hood & Zottola, 1997; Robinson & Ocio, 1998). Til að losa eða skafa bakteríufrumur af yfirborði er algengt að nota bómullarpensil en þá verður að gera ráð fyrir að heimturnar séu aðeins 20-30% af frumunum. Einnig er hægt að nota hljóðbylgjur við losun örvera af yfirborði og þykir það áhrifarík leið, t.d. þegar verið er að meta áhrif sótthreinsiefna (Bourion & Cerf, 1996; Norwood & Gilmour, 1999).

Ýmsar aðferðir eru síðan notaðar við mælingar á örverum og örveruþekju má þar helst nefna örverutalningar á skálum, ATP-ljósmælingu, smásjárskoðun með flúrljómun og skoðun í rafeindasmásjá (Wirtanen o.fl., 2001).

Margar rannsóknir hafa sýnt fram á að mismunandi yfirborð og meðhöndlun á því hafi áhrif á festinguna en þó er erfitt að bera saman niðurstöður þar sem mismunandi aðferðum er beitt (Blackman & Frank, 1996; Percival, 1999; Arnold & Bailey, 2000; Arnold & Silver, 2000, Flint, 2000).

1.4.1 Ræktun á agarskálum:

Mikilvægt er að gera sér grein fyrir að talningar á agarskálum gefur okkur ekki nákvæmar upplýsingar þar sem við fáum aðeins upplýsingar um bakteríur sem eru ræktanlegar og geta vaxið á viðkomandi æti. Einnig er hægt að nota agarskálur sem eru lagðar á yfirborðið sem á að rannsaka, s.k. snertiskálur (stimplun).

1.4.2 ATP-ljósmeiðing

Ljósmeiðingin byggist á að mæla ATP sem er orkuefni lifandi fruma. Niðurstöður sem gefnar eru upp í ljóseiningum eru í beinu hlutfalli við fjölda lifandi fruma í biofilmunni. Þannig mælast öll lífræn óhreinindi hvort sem það eru bakteríur eða t.d. fiskleifar (Birna Guðbjörnsdóttir og Hjörleifur Einarsson, 1998a).

Hún er þó ekki mjög næm við mat á lágum örverufjölda og þarf fjöldinn að vera um 1000 cfu/ml til að greinast (Stanley o.fl. 1989).

1.4.3 Direct Epifluorescent Filter Technique - DEFT

Þessi aðferð byggist á því að skoða sýni í venjulegri ljósmásjá eftir litun t.d. með acridine orange (AO). AO binst öllu lífrænu efni og er því góður kostur þegar skoða á biofilmu. Hægt er því að áætla það svæði sem biofilman þekur á viðkomandi sýni. Við smásjárskoðun með flúrljómun þarf að hafa í huga að við litun með acridine orange sem algengt er að nota er oft erfitt að greina mun á dauðum og lifandi frumum. Þessi aðferð getur þó gefið mjög góðar upplýsingar um byggingu örveruþekju, um fjölsykruhjúpinn og staðsetningu fruma (Wirtanen o.fl. 2000).

1.4.4 Malthus - leiðnimæling

Hefðbundnar aðferðir til örverumælinga og örverugreininga eru yfirleitt frekar tímafrekar. Þetta hefur leitt til þróunar á hraðvirkari aðferðum, þ.e.a.s. aðferðum sem eru einfaldar í framkvæmd, fljótvirkar, næmar og nákvæmar. Á áttunda áratugnum sýndu rannsóknir Richards o.fl. (1978) að leiðnibreytingar sem áttu sér stað í æti við ræktun örvera voru í samræmi við vöxt þeirra. Einnig kom í ljós að mælanlegur tími á meðan leiðnibreytingar áttu sér stað voru í öfugu hlutfalli við log fjölda örvera. Eftir þessar uppgötvanir hafa fleiri rannsóknir verið gerðar, ýmis tæki og æti þróuð til að meta heildarörverufjölda eða fjölda ákveðinna örverutegunda, svo sem *E. coli*, Enterobacteriaceae,

Vibrio, *Enterococcus*, *Pseudomonas* og histamín-myndandi örverur, en einnig til að finna *Salmonella* og *Listeria* tegundir (Banks o.fl., 1989; Petitt, 1989; Dupont o.fl., 1994; Pless o.fl., 1994; Capell o.fl., 1995). Ein slík aðferð er Malthus aðferð og hefur hún verið borin saman við smásjárskoðun og hefðbundna penslun við mat á bakteríufrumum föstum við yfirborð eða það sem kallað er örveruþekja og virtist Malthus aðferð vera næmari en hún greindi fleiri fastar frumur (Flint o.fl. 1997b). Holah o.fl. (1990) hafa einnig bent á ágæti þessarar aðferðar við mat á örveruþekju þar sem þessi tækni nær að mæla þær frumur sem nást ekki af yfirborðinu.

1.4.5 Rafeindasmásjá (SEM)

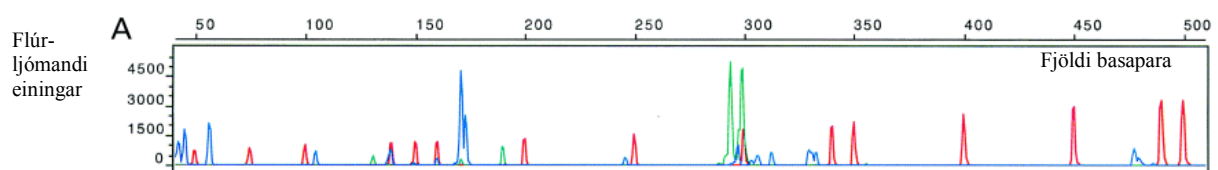
Skoðun á örveruþekju í rafeindasmásjá er mjög áhugaverð en þá er hægt að skoða þrívíddarbyggingu hennar og hægt að fá upplýsingar um byggingu biofilmunnar, um fjölsykruhjúpinn og staðsetningu fruma. Þessi aðferð gefur hins vegar ekki þannig niðurstöður að hægt sé að skoða þær tölfræðilega. Það þarf að undirbúa sýnin vel til að vernda frumurnar í sem líkustu formi og þær voru þegar þær festust. (Herald & Zottola, 1988, Gilmour o.fl. 1993). Efnameðhöndlun á sýnum fyrir skoðun í rafeindasmásjá er algeng en þá fer sýnið í gegnum margskonar efnameðferð og þurrkun sem kallast „critical point drying“. Þá er sýni sem hefur verið þurrkað með etanóli/acetóni flutt í „the critical point drying-tæki“ og CO₂ gas undir þrýstingi látið flæða inn í klefann og yfir sýnið, síðan farið fram hjá „critical point“ í fasalínuritinu þannig að sýnið fer beint úr vökva yfir í lofttegund. Þannig er hægt að varðveita frumurnar eins og þær eru. En það er einnig hægt að frysta sýnið með fljótandi köfnunarefni (cryo-SEM). Herald og Zottola (1988) benda á að betra sé að nota cryo-SEM í staðinn fyrir efnameðhöndlunina því það fari betur með sýnin.

1.4.6 Sameindarfræðilegar aðferðir

Þróun á aðferðum til þess að greina örveruflóru með sameindafræðilegum aðferðum hefur aukist mjög á undanföllum árum. Ein ástæða þess er að hluta flórunnar er ekki hægt að rækta með hefðbundnum ræktunaraðferðum.

Hægt er að beita sameindafræðilegum aðferðum til að kanna tegundasamsetningu í umhverfissýnum t.d. í örveruþekju sem myndast í vinnsluumhverfi. Þessar aðferðir byggjast á því að eingra DNA úr örveruþekjunni beint.

Magna síðan 16S rRNA upp með PCR-tækni og bera saman á þrjá vegu; a) bera saman rafdráttareiginleika mismunandi 16S rRNA með rafdrætti í „urea gradient“ gelum, b) nota skerðibútamunstur þeirra með mismunandi skerðiensímum og c) með rafgreiningu. Not fyrir þess konar greiningu er mikil í líftækniöðnaðinum m.a til að meta fjölbreytileika í mismunandi vistkerfum, kanna landfræðilega dreifingu tegunda, velja stofnasöfn til að hnitmiða skimanir fyrir verðmætum lífefnum, velja úr hópa baktería sem eru líklegri en aðrir til að hafa eftirsótt efni eða ensím, öðlast vitneskju um erfðafræðilegan skyldleika mikilvægra tegunda (Stencel, 2000, Staney, 1999; Massol-Deya o.fl, 1995). Ein aðferð til að skoða fjölbreytileika örveruflórunnar í örveruþekju er Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP). T-RFLP aðferðin byggir á því að magna um 16S rRNA hluta DNAsins með Polymerase Chain Reaction (PCR) aðferðinni, magnaða afurðin er síðan klippt niður með skerðiensímum og búturnir sem fást eru raðgreindir. Notaðir eru prímerar sem eru flúrmerktir þannig að einungis kemur fram einn bútur fyrir hverja bakteríu sem er í sýninu. Þetta gefur góða aðgreiningu á blöndu af bakteríum og samsetningu (prófil) örveruflórunnar, þar sem aðeins eitt band kemur fram fyrir hverja tegund. Þessi aðferð hefur mikla aðgreiningarhæfni og þar sem innri staðall er settur í hvert sýni þá er auðvelt að endurtaka hana (Marsh, 1999). Niðurstöðurnar eru settar fram í mynd sem sýnir toppa, fjöldi þeirra sýnir hversu margar tegundir eru til staðar í sýninu og hæð þeirra hversu mikið er af hverri tegund. Staðsetning toppanna segir svo til um stærð DNA bútanna í basapörum. Mynd 1 sýnir dæmi um hvernig T-RFLP prófilar líta út (Osborne o. fl., 2000) en þar sést greining á 16S rRNA PCR afurðum sem hafa verið skertar með *Hha*I skerðiensími. Stærð bútanna er merkt efst á myndinni, hæð toppanna er sýnd sem flúrljómandi einingar. Rauðu topparnir er innri staðall en 5' og 3' skerðibúturnir eru sýndir í bláum og grænum toppum (báðir prímerar eru flúrmerktir).



Mynd 3. Greining á 16S rRNA PCR afurðum sem hafa verið skertar með *Hha*I.

1.5 Þvottur og sótthreinsun á vinnslubúnaði

Þrif og sótthreinsun á vinnslubúnaði getur haft mikil áhrif á gæði og heilnæmi þeirra matvæla sem verið er að framleiða sérstaklega ef illa er að þeim staðið. Örverur sem sitja eftir á vinnslubúnaði berast auðveldlega í afurðirnar við vinnslu. Því er mikil-vægt að nota rétt þvotta- og sótthreinsiefni og standa rétt að þrifunum til þess að fjarlægja sem mest af óæski- legum örverum. Allt umhverfi við vinnslu sjávarafurða er mjög rakt þannig að sótthreinsun í lok þrifa er mjög mikilvægur þáttur þar sem rök yfirborð eru kjörin svæði fyrir örveruvöxt.

Markmiðið með sótthreinsun er að drepa allar örverur sem eftir sitja þegar búíð er að þvo og þar með koma í veg fyrir vöxt baktería þar til vinnsla hefst aftur. Ýmsir umhverfisþættir eins og t.d. mismunandi óhreinindi, sýrustig og hitastig geta haft áhrif á virkni sótthreinsiefna (Herald & Zottola, 1988). Áður en sótthreinsun hefst verður því að vera búíð að fjarlægja öll lífræn óhreinindi og þá örveruþekju sem getur verið að byrja að myndast.

Áhrif flestra örverudrepandi efna byggjast á að ráðast á virka frumu en ekki frumu bundna í örveruþekju og hafa rannsóknir staðfest það (Norwood & Gilmour, 2000; Stewart o.fl. 2001). Þegar örverur eru fastar við yfirborð og hafa myndað örveruþekju er frumustarfsemin í lágmarki og viðnám gegn hinum ýmsu efnum í hámarki. Flest sótthreinsiefni komast ekki í gegnum net fjölsykra og sykurprótína sem eru hluti af örveruþekju sem myndast þegar þrif eru ófullnægjandi. Viðnám baktería gegn sótthreinsiefnum getur verið háð því efni sem hún er föst á og hefur verið sýnt fram á að bakteríur fastar við polyester/polyurethane eru þólnari en bakteríur fastar við polyester/ryðfrítt stál og var erfiðast að þrifa það fyrrnefnda (Krysinski o.fl 1992). Þess vegna er erfitt að gefa út einhverja eina viðmiðun um styrk og tíma varðandi notkun á sótthreinsiefni. Einnig eru örverur misþólnar gagnvart þessum efnum þannig að nauðsynlegt er að þekkja örverusamsetninguna í hverri vinnslu. Best er að þvo og sótthreinsa í aðskildum þrepum og að skipuleggja þrifaferlið

mjög markvisst þar sem miðað er að því koma í veg fyrir að bakteríur nái að festa sig við yfirborð. Þvottaefnin þurfa að geta leyst upp fitu, prótein og steinefni. Þau þurfa að vera yfirborðsvirk svo þau nái að dreifast um hina ýmsu hluta búnaðarins og til að geta bundist fitunni. Yfirborðsvirk efni hafa annan endann vatnsfælinn og hinn vatnsækinn og vegna þessa eiginleika ná þau að binda fitu og vatnsfasa saman þannig að auðvelt er að skola óhreinindin burt með vatni. Þvottaefnin eru ýmist súr eða basísk en þau innihalda einnig tæringarhindra og mýkingarefni. Algengustu þvottaefnin sem notuð eru í fiskvinnslu eru sterk basísk svo þau geti unnið á erfiðum óhreinindum eins og próteini og fitu. Sum þvottaefni eru með málmbindi-efnum (chelators) sem eru mikilvæg við niðurbrot á biofilmum (Gibson o.fl. 1999; Tuompo o.fl., 1999). Þau bindast ýmsum málmjónum svo sem Mg^{2+} , Ca^{2+} og raska þar með jafnvægi ytri frumuhimnunnar.

Nokkrar rannsóknir hafa sýnt fram á að Gram-neikvæðar bakteríur t.d. *Pseudomonas fluorescens*, hafa þróað með sér þol gegn fjörgildum ammóníum-samböndum og „ampotheric“ efnum (Langsrud o.fl.2003b). Stærsti hluti örvera í nýveiddum fiski og í fiskvinnslu-umhverfi telst til Gram-neikvæðra baktería t.d. *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium* og *Cytophaga* (Hannes Magnusson & Emilía Martinsdóttir, 1995; Birna Guðbjörnsdóttir & Hjörleifur Einarsson, 1998b; Bagge-Ravn o.fl. 2003).

Ekki er mikið vitað um viðnám bakteríu-stofna sem valda matarsjúkdómum gegn ýmsum bakteríudrepani efnum en *Staphylococcus* teg. og *L. monocytogenes* hafa aðeins verið skoðaðar í þeim tilgangi. Viðnám gegn fjörgildum ammóníum-samböndum er þekkt meðal *Staphylococcus* sem hafa einangrast í matvælaíðnaði, þá sérstaklega gegn benzalkonium chloride (BC) (Sundheim o.fl. 1992). BC er mjög algengt fjörgilt ammóníumsamband sem notað er sem sótthreinsiefni í matvæla-íðnaði. Minnsti styrkur efnis sem hindrar vöxt baktería er kallaður MIC og fyrir BC var MIC minna en $2\mu\text{g/ml}$ fyrir viðkvæma *Staphylococcus* stofna og $4\text{--}11\mu\text{g/ml}$ fyrir þolna. Ráðlagður styrkur af fjörgildum ammóníumsamböndum skv. FDA (<http://seafood.ucdavis.edu/pubs/sanitize.htm>) er hins vegar 200 ppm ($200\mu\text{g/ml}$). Þolnu stofnarnir voru coagulase-neikvæðir og greindust sem *S.*

epidermidis og *S. sarphofyticus*. Þess ber að geta að þær *Staphylococcus* tegundir sem valda matarsýkingum eru allar coagulase-jákvæðar (Roberts, T.A. 1996).

MIC-aðferðin (the minimum inhibitory concentration) hefur mikið verið notuð til að ákvarða viðnám eða þol fyrir sýklalyfjum en einnig fyrir sótthreinsiefnum. Aðalkostur þessarar aðferðar er hversu auðveld hún er í framkvæmd og hægt er að prófa marga stofna eða mörg efni í sömu tilrauninni.

Lemaitre (1998) rannsakaði 132 stofna af *L. monocytogenes* sem voru einangraðir úr matvælaíðnaði (osti, mjólk, fiski), frá fólki og fuglum. Tólf þeirra voru með viðnám gegn BC, hexamidine diisethionate og ethidium bromide. Rannsókn Aase o.fl. (2000) sýndi fram á að um 10% af 200 *L. monocytogenes* stofnum voru með viðnám gegn BC. Einnig hafa greinst þolnir mjólkursýrugerlar en þeir eru venjulega ekki taldir sjúkdómsvaldar en geta valdið skemmdum á matvælum í lofttæmdum umbúðum. Fimm af átta stofnum sem fundust á einangruðum af vinnslubúnaði í kjúklinga-sláturhúsi eftir sótthreinsun með fjörgildum ammóníumsamböndum voru *Pseudomonas* tegundir og gátu þær vaxið í lausn með $200\mu\text{g/ml}$ BC en hinir voru *Enterobacteriaceae* en vöxtur þeirra var hindraður við $150\mu\text{g/ml}$ BC eða lægri styrk. Þetta er mjög athyglisvert því þarna er verið að tala um styrk sem er sá sami eða nálægt ráðlögðum styrk eins og áður sagði. Þol *Enterobacteriaceae* gegn sótthreinsiefnum er yfirleitt minna en hjá *Pseudomonas*. Rannsóknir hafa sýnt fram á að 1-3% af *Enterobacteriaceae* og kóligerlastofnum úr matvælavinnslu séu með ákveðið þol gegn BC (MIC $30\text{--}50\mu\text{g/ml}$). Viðkvæmir stofnar voru með MIC $<10\mu\text{g/ml}$ (Langsrud o. fl. 2003a).

Önnur sótthreinsiefni sem eru ekki yfirborðsvirk, eins og klór og peredíkssýra eru mikið notuð í matvælaíðnaði. Ef einhverjir stofnar lifa af eftir sótthreinsun með þessum efnum er það yfirleitt vegna þess að þeir hafa myndað örveruþekju (Holah o.fl., 1998; Langsrud o.fl. 2003a).

Það er vel þekkt að örveruþekja hefur áhrif á viðnám gegn sýklalyfjum, sótthreinsiefnum og öðrum örverudrepani efnum (Gilbert, 2000). Það er því mjög mikilvægt að skipta út sótthreinsiefnum í matvælavinnslu til að koma í veg fyrir að bakteríur þrói með sér þol gegn efnunum sem verið er að nota. Mikilvægt er að velja efnin sem notuð eru til skiptis þannig að

þau hafi ekki svokallaða „cross resistance“ virkni (Langsrud o.fl. 2003b).

1.6 Markmið

Markmið verkefnisins var að auka heilnæmi og öryggi matvæla við framleiðslu þeirra með markvissu vali á efnunum sem notuð eru í vinnslubúnað og efnunum ætluðum til þvotta og sótt-hreinsunar. Verkefnið byggðist á úttektum á hönnun í iðnaðinum og rannsóknum á viðloðun baktería í vinnsluumhverfi og á rannsóknastofu. Markmiðum var náð með því að þróa og prófa aðferðir við rannsóknir á viðloðun *Listeria monocytogenes* við algeng yfirborð vinnslubúnaðar í rækju- og fiskvinnslu í samspili við aðrar bakteríur. Einnig voru áhrif nokkurra hreinsiefna á vöxt þessara baktería metin.

2. FRAMKVÆMD

Þessi rannsókn var framkvæmd í þremur áföngum

1. Úttekt á þrífavænni hönnun (hygienic design) á vinnslubúnaði -
2. Rannsóknir á örveruþekju (biofilmu) -
 - Náttúruleg örveruþekja í fiskvinnslu og rækjuvinnslu
 - Viðloðun örvera á mismunandi yfirborð vinnslutækja
3. Áhrif hreinsiefna á bakteríur

2.1 Úttekt á hönnun (hygienic design) fiskvinnslubúnaðar

Hönnun á vinnslubúnaði frá tveimur framleiðendum var rannsökuð til að athuga hvort farið væri eftir hreinlætiskröfum og til að meta hvort búnaðurinn væri þrífavænn. Gerðar voru tvær ítarlegar úttektir á einni stórrri fiskvinnslu og einni stórrri rækjuvinnslu. Þar sem mörg tæki í bolfiskvinnslu eru samskonar og notuð eru í vinnslu á laxi var ákveðið að einbeita sér að þessum tveimur vinnslulínunum og gera þar mjög nákvæma skoðun. Starfsmenn tveggja tækjaframleiðenda sem áttu tæki í viðkomandi vinnslum voru fengnir til aðstoðar. Tilgangurinn með þessum verkhluta var einnig að ákveða sýnatökustaði fyrir stálsýnablötur sem voru notaðar við rannsóknir á örveruþekju í náttúrulegu umhverfi. Einnig voru niðurstöðurnar notaðar til að velja yfirborðsefni sem notuð voru við rannsóknir á örveruþekju. Þá voru fengnar upplýsingar um þvotta- og sótt-hreinsiefni sem verið er að nota. Sérstakur gátlisti (Birna Guðbjörns-

dóttir o.fl., 2003) var notaður til að skoða hönnun almennt á búnaði í rækju- og fiskvinnslu. Einnig var hönnun á skurðarvél sérstaklega skoðuð með kröfum um hreinlæti í huga. Þessi listi var í raun fyrsta prufuútgáfa af gátlista sem var í þróun hjá Marel hf og Rf og hefur síðan verið gefin út í formi leiðbeininga (Birna Guðbjörnsdóttir o.fl., 2003). Í þessum lista er tekið á helstu grunnkröfum varðandi hreinlæti og hönnun sem koma fram hjá evrópsku tækninefndinni CEN/TC 153 og koma fram í leiðbeiningum gefnum út af EHEDG. Á þessum kröfum er einnig tekið í íslenska staðlinum ÍST EN 1672:2:1997, ISO staðlinum 14159:2002 og greinum birtum í tímaritinu Trends in Food Science and Technology.

2.2 Rannsóknir á örveruþekju

2.2.1 Myndun örveruþekju í náttúrulegu umhverfi í fiskvinnslu og rækjuvinnslu

Stálsýnum var komið fyrir í rækjuvinnslu og fiskvinnslu. Sextán stálsýnum var komið fyrir á nokkrum stöðum í rækjuvinnslu (fjórar tegundir) og tuttugu stálsýnum í fiskvinnslu (2*1 tegund á hverjum stað). Örveruþekja var látin myndast á stálsýnum og örverusamsetning síðan greind og algengustu bakteríurnar notaðar við rannsóknir á örveruþekju í síðari hluta tilraunanna.

Einungis var komið fyrir stálsýnum því auðveldast var að hanna þau og koma þeim fyrir án þess að skapa óþægindi fyrir vinnsluna. Dæmi um staði þar sem stálsýnum var komið fyrir eru sýndar á 4. mynd. Í samráði við hönnuði og framleiðendur var ákveðið að láta sýnin vera í vinnslunni í 3-4 mánuði. Vinnsla var stöðvuð vegna sumarfría í allt að þrjár vikur á meðan tilraunin stóð yfir. Þetta þótti vænlegur tími til að árangur næðist og raunveruleg örveruþekja næði að myndast. Stálsýnin höfðu fengið mismunandi meðhöndlun. Öll sýnin voru af gerðinni AISI:304-2B sem er eitt algengasta stályfirborð sem finnst í vinnsluumhverfi sjávarafurða. Þau voru meðhöndluð á fjóra mismunandi vegu:

- a. ekkert meðhöndlað (þ.e. eins og tækjaframleiðendur fá það afhent frá birgjum)
- b. sett í sýrubað
- c. slípað
- d. sett í sýrubað og slípað.



Mynd 4. Dæmi um sýnatökustaði í fiskvinnslu og rækjuvinnslu

2.2.1.1 Örverumælingar og örverugreiningar

Í lok viðverutímans voru stálsýnin tekin niður og flutt á rannsóknastofu þar sem örverusýni voru tekin til mælinga. Sýni voru tekin með hefðbundinni penslun (Birna Guðbjörnsdóttir & Hjörleifur Einarsson, 1998b) af allri sýnaplötunni. Notuð var yfirborðssáning með járnagar (Gram o.fl. 1987) og skálarnar ræktaðar við 22°C í 5 daga og þá lesið af. Járnagar er sérhæft æti til að greina sérstakar skemmdarbakteríur og koma þær fram sem svartar kólóníur á ætinu. Aðrar örverur eru hvítar.

Þá voru hljóðbylgjur notaðar til að losa bakteríur af nokkrum stálsýnum úr fiskvinnslu. Það var gert til að bera saman heimtur og þær örverutegundir sem greinast. Þá voru sýnin sett í tilraunaglas með 20 ml af dauðhreinsuðu vatni ásamt 0.5% Tween 80 og sett í vatnsbað og hljóðbylgjur sendar á sýnið (Branson 3510E-DTH, 100W, 42 kHz. Branson Ultrasonics Co, Danbury) í eina mínútu. Sýni voru síðan tekin af vatnslausninni og pípettað í viðeigandi þynninum á skálar með járnagar til að ákvarða heildarfjölda baktería. Af hverjum sýnatökustað voru 25 kólóníur einangraðar með því að strika þeim út á næringaragar og þær greindar með hefðbundinni aðferð sem byggist á greiningarlyklum frá Shewan o.fl. (1960), Hannesi Magnússyni og Kristínu Traustadóttur (1980) og handbók Bergeys (Krieg og Holt, 1984). Prófin sem voru gerð eru sýnd í töflu 2.

Valdir stofnar sem greindust Gram-neikvæðir og oxidasa-neikvæðir (*Enterobacteriaceae*) eða oxidasa-jákvæðir (non-enteric bacteria) voru greindir nánar með lífefnaþrófum frá bioMérieux–France, API 20E og API 20NE. Allir einangraðir stofnar voru geymdir í frysti við -70°C í næringarseyði (Nutrient Broth (NB) eða Tryptic Soy Broth með Yeast Extract (TSB-YE) frá Difco) með 20% glycerol í cryogenic glösum.

Tilvist *Listeria* á öllum stálsýnunum var ákvörðuð en greining á henni var framkvæmd samkvæmt eftirfarandi lýsingu í aðferðabók örverustofu Rf á USDA aðferðinni (McClain & Lee, 1989). Þá var stálplatan sett í 225 ml af UVM modified enrichment broth (BBL). Ræktað var við 30°C í 24 klst, 0,1 ml af UVM var síðan sáð í 10 ml af Fraser broth (BBL) og ræktað við 35°C í 26 klst +/-2 klst. Lykkjufylli úr svörtu Fraser broth var strikað á eitt sérhæft æti, MOX (Difco) og ræktað við 35°C í allt að 48 klst. Staðfestingarpróf var gert á svörtum kólóníum sem ræktast á MOX. Eftirfarandi próf voru gerð: Gram-litun, katalasa próf (3% H₂O₂), kvikleikapróf („hanging drop“), greining á haemolysu á blóðagar (sjá uppskrift hér fyrir aftan) og prófun í API-*Listeria* (greiningarlykill fyrir *Listeria*, BioMérieux SA/France). Blóðagar var samsettur úr Lab-lemco Powder (10g), Bacto-peptone (10g), NaCl (5g), Agar (12g) og 1000 ml af afjönuðu vatni. Þessi blanda var síðan soðin þar til hún var uppleyst og sett í

Tafla 2. Greiningarpróf fyrir ákvörðun á tegundasamsetningu örveruþekju.

Próf	Lýsing (heimild)
Gram skoðun	Gram litun (Downes & Ito, 2001)
Stærð og lögun	1000 x stækkun í ljósmásjá
Catalasi 3% H ₂ O ₂	
Oxidasi Dry Slide (Difco)	
Hreyfanleiki	Hangandi dropi: næturgömul rækt í næringarseyði
Oxunar/gerjunarpróf	O/F æti (Hugh & Leifson, 1953)

þrýstisjóðara til dauðhreinsunar (121°C í 15 mín). Eftir dauðhreinsun var agarinn kældur niður í 45°C og þá var bætt í 50 ml/L af hestablóði sem var keypt frá Keldum.

2.2.1.2 Sameindafraeðilegar aðferðir

Aðferðin sem notuð var til DNA einangrunar byggist á Klór-phenól aðferð Fuhrmans o.fl (1988), aðferðin var aðlöguð af Martiny (munnlegar upplýsingar). Sýnin voru fyrst síuð í gegnum Durapore filter 0.22µm (Millipore), filterinn var síðan klipptur niður og skolaður í TEN buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA og 150 mM NaCl). Til að hreinsa DNAið var notað Nucleotide Removal Kit (Qiagen). Eftir að DNA var einangrað voru gerð nokkur PCR hvörf þar sem mismunandi styrkur hvarfefna var notaður, t.d. var prófaður mismunandi styrkur af primerum. Í hvarfið var notað 10 mM nucleotide mix (2.5 mM each), 50 mM MgCl₂, 20 mg/ml BSA, 20 µM each primer, 2 U/µl Taq Polymerase

Eftirfarandi PCR prógram var keyrt: Fyrst 95°C í 3 mín, síðan afmyndun við 94°C í 1 mín, álíming (annealing) við 55°C í 1 mín og lenging DNA við 72°C í 1 mín, keyrðir voru 30 hringir.

Eftir mögnun var afurðin keyrð á 0.7% agarose geli (I.D.NA® agarose, FMC BioProducts) við ca. 400V í 2-4 tíma þannig að afurðin fór hratt í gegnum gelið. Í ljós kom að böndin voru mjög dauf og það sem sást hafði smurst yfir rásirnar. Til að losna við smurninginn var prófað að breyta um styrk á MgCl₂, nukleótíðum og lengingartíminn í PCR hvarfinu var stytur um helming (72°C í 1 mín í stað 2 mín upphaflega). Smurningin hvarf við að stytta tímann.

Eftir mögnun var afurðin sett í 10U af HaeII (New England Biolabs) skerðiensím og keyrt á 1.4% agarose geli. Þetta er ekki hluti af aðferðinni en var framkvæmt til að sannreyna hvort að það kæmu fram mörg bönd.

Eftir mögnun á síðan að rafdraga sýnin í raðgreini sem nemur flúrmerkta endann. Þannig að fram koma einungis þeir DNA bútar sem eru flúrmerktir.

Í upphafi verkefnisins hafði verið ætlunin að nota aðra aðferð, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) sú aðferð reynist hins vegar ekki hentug til að greina örveruflóru, hentar fyrst og fremst við samanburð á einstökum tegundum (Martiny munnlegar upplýsingar)

2.2.2 Vaxartilraunir í rækjuseyði

Vaxartilraunir voru framkvæmdar til að vita hvað aðlögunarfasi bakteríustofna var langur þar sem mikilvægt er að bakteríurnar séu í vaxtarfasa þegar rannsaka á festingu þeirra við yfirborð. Vöxtur bakteríanna var skoðaður í rækjuseyði (uppskrift í ramma 2) til að líkja eftir óhreinindum í umhverfi rækjuvinnslu. Einnig voru áhrif nokkurrar örvera á vöxt *L. monocytogenes* skoðuð yfir vaxtartímann í rækjuseyðinu.

Tilraunaseyði

1 hlutur fiskur eða rækja / 2 hlutar eimað vatn

Soðið í 2 mín

Filterað með síu (10 og 60 mesh og þrefaldri grisju)

Filterað með tvöföldum kaffifilter

Dauðhreinsað í þrýstisjóðara (121°C í 15 mín).

pH og saltinnihald stillt þannig að það verði það sama og í forsoðinni rækju, reyktum laxi eða þorski

Salt var mælt í viðeigandi afurðum í upphafi og í seyði og saltinnihald lagað að saltinnihaldi afurðar fyrir dauðhreinsun (ath. miða við salt í vatnsfasa - VFS).

Rammi 2. Upskrift af seyði (Hélène L. Lauzon, 2002)

Notaðir voru stofnar sem einangruðust af stálsýnum sem komið var fyrir í einu fiskvinnsluhúsi og í einni rækjuvinnslu og *L. monocytogenes* (H-99-2-2), en það var stofn sem hafði einangrast úr rækjuvinnslu í öðru verkefni oftast en einu sinni og hefur verið stofnagreindur með PFGE og serotypu-greindur (1/2a) (Birna Guðbjörnsdóttir og Sigrún Guðmundsdóttir, 2001).

Stofnar einangraðir af stálsýnum voru eftirfarandi:

Pseudomonas putida (H-03-302-14)

Pseudomonas fluorescens (H-03-328-10)

Shewanella putrefaciens (H-03-302-12)

Serratia liquefaciens (H-03-308-10)

Aeromonas (H-03-333-18)

Stofnar voru geymdir í frysti við -70°C í næringarseyði (NB eða TSB-YE frá Difco) með 20% glycerol í cryogenic glösum. Fyrir notkun voru þeir ræktaðir upp í almennu næringaræti og umsáð þrisvar sinnum til að fá hressan stofn til að vinna með. Stofnum af ræktunarskálum var sáð í TSB-YE seyði og þeir látnir vaxa í einn sólarhring við stofuhita. Fjöldi bakteríanna var þá á bilinu 1*10⁸-1*10⁹ cfu/ml. Næturgaml-

ar ræktir voru þynntar í $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ cfu/ml og sáð (1 ml af hverri rækt) í tilraunaglös sem innihéldu 30 ml af viðeigandi seyði. Lokafjöldi baktería í tilraunaglösum var þá $1 \cdot 10^3$ - $1 \cdot 10^4$ cfu/ml af blandaðri rækt. Bakteríusýnin voru höfð á hristara (70 rpm) og ræktuð við 19-22°C og fjöldi baktería mældur með ákveðnu millibili og vaxtarkúrfa útbúin. Hitastig í vinnsluumhverfi er sums staðar 19-22°C og þar skapast góð skilyrði til örveruvaxtar og var því tilraunin framkvæmd við það hitastig. Vöxtur stofnanna var athugaður á tveimur mismunandi ætum til þess að geta gert grein fyrir vexti *L. monocytogenes* í návist annarra baktería. Ætin sem voru valin eru MOX sem er sérhæft æti fyrir *Listeria* tegundir og TSA-YE, sem er almennt næringaræti sem hentar fyrir vöxt þeirra baktería sem greina átti. Ætin voru útbúin skv. leiðbeiningum framleiðenda. Yeast Extract var bætt í TSA til að liðka fyrir vexti *Listeria*. Best hefði verið að nota einnig sérhæft æti fyrir *Pseudomonas* tegundir, t.d. CFC, en það var of kostnaðarsamt að nota alltaf öll ætin.

2.2.3 Tilraunir með viðloðun örvera á yfirborð.

Tilraunir með viðloðun örvera á yfirborð voru í beinu framhaldi af vaxtartilraununum. Í fyrri tilrauninni var rannsakaður hæfileiki *L. monocytogenes* til að festast við yfirborð í hreinrækt og þegar baktería var í sambýli með *Pseudomonas* I/II. Í seinni tilrauninni voru rannsökuð áhrif sex mismunandi baktería, sem einangraðar höfðu verið úr vinnsluumhverfi, á vöxt og festingu *L. monocytogenes* við mismunandi yfirborð.

2.2.3.1 Undirbúningur yfirborðssýna

Nýjar plötur úr ryðfríu stáli og plasti voru klipptar niður í 20x70x1,5mm og 10x10x1,5mm búta. Minni sýnin voru notuð við rannsóknir í



Mynd 5. Hrífismælir á Iðntæknistofnun Íslands

rafeindasmásjá (SEM). Fyrir valinu varð AISI-304-2B ryðfrítt stál (kaldvalsað, hitameðhöndlað, sýrað og léttvalsað frá framleiðenda) ómeðhöndlað, slípað og glerblásið og plastefni úr polyethylene (PE), polyvinylchloride (PVC), polyurethane (PU) og voltareimar. Þessi byggingarefni eru mjög algeng í tækjum sem ætluð eru til matvælavinnslu og því mikilvægt að skoða þau.

- Sýnin voru undirbúin á eftirfarandi hátt:
- Sýnið látið liggja í 1N NaOH í 24 klst.
- Skolað með eimuðu vatni.
- Látið liggja í acetoni í 1 klst (fitan hverfur).
- Skolað með eimuðu vatni.
- Þurrkað í lofti.
- Dauðhreinsað í þrýstisjóðara (121°C í 15 mín).

Plastsýnin voru hreinsuð eins nema að þau voru ekki látin liggja í acetone en í staðin voru þau látin liggja í ethanóli í 30 mín.

2.2.3.2 Hrífismælingar á stáli

Til að skoða grófleika yfirborðs voru notaðar tvær aðferðir:

- Hrífismæling með hrífismæli (stylus).
- Skoðun í rafeindasmásjá (SEM).

2.2.3.2.1 Hrífismælir - stylus

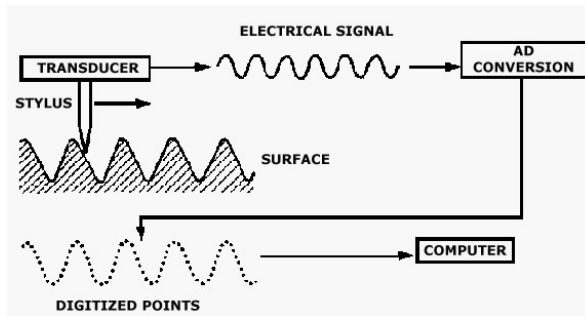
Áferð stálsýna og plastsýna var mæld með hrífismæli sem er með demantsnál með ákveðnum radius (μ). Nánari upplýsingar um mælinn eru í Ramma 3 og ljósmynd af mælinum er hér að aftan ásamt skýringarmynd. Mælirinn sem var notaður við þessa rannsókn var með

Surftest-201 Mitutoyo Japan
Mælir hrýfi skv. staðli DIN 4760 (5.90)
Tegund 178-121D

Detector No. 178-371
Stylus material: Diamond
stylus radius: 5 μ m

Ramma 3. Upplýsingar um hrífismæli á ITÍ





Mynd 6. Skýringarmynd af tölvutengdum hrýfismæli (<http://www.mel.nist.gov/div821/webdocs-13/surfcilib.htm>)

demantsnál með $5\mu\text{m}$ radius og er sýndur á mynd 5. Skýringarmynd er sýnd á mynd 6.

2.2.3.2.2 Rafeindasmásjá

Til að meta grófleika var yfirborðið einnig skoðað með rafeindasmásjá (mynd 7). Ef yfirborðssýnin eru hrein þarf aðeins að gullhúða þau fyrir skoðun. Sýnin voru gullhúðuð í 3 mín. Prófaðar voru nokkrar stækkanir frá 500x og upp í 5000x stækkun. Oftast var notuð 1000-1500x stækkun og þær myndir sem eru birtar hér eru í þeirri stækkun. Við mikla stækkun ($>1000x$) voru myndir óskýrar.



Mynd 7. Rafeindasmásjá (Scanning Electronic Microscopy) staðsett á Iðntæknistofnun Íslands

2.2.3.3 Viðlöðun baktería á yfirborði. Fyrri tilraun

Festing *L. monocytogenes* og *Pseudomonas* I/II var skoðuð á ryðfríu stáli (ómeðhöndluðu og glerblásnu) og polyethylene (tvenns konar grófleiki). Næturgömul rækt ($1 \cdot 10^{7-8}$ cfu/ml) var þynnt þar sem 1 ml af rækt var settur í 100 ml af rækjuseyði og 1 ml af þeirri þynningu settur í 30 ml af rækjuseyði þannig að lokalausn innihélt $1 \cdot 10^{4-5}$ cfu/ml. Sýnum var komið fyrir í



Mynd 8. Tilraunaglös með sýnum og bakteríum.

tilraunaglös sem innihéldu rækjuseyði ásamt bakteríum eins og sýnt er á mynd 8.

Örveruþekjan var látin myndast við hristing (u.þ.b. 70 rpm) við 20-22°C. Sýni voru tekin eftir 24, 48 og 96 klst en þá voru lausar bakteríur skolaðar af með því að setja sýnið í plastskál með dauðhreinsuðu vatni og skál hrist 15-20 sinnum. Skolunin var síðan endurtekin tvisvar sinnum. Eftir 48 klst. var rækjuseyði skipt út fyrir næringarseyði (TSB-YE) til að hressa upp á næringu fyrir bakteríur. Fimm aðferðir voru prófaðar til að meta festingu bakteríanna.

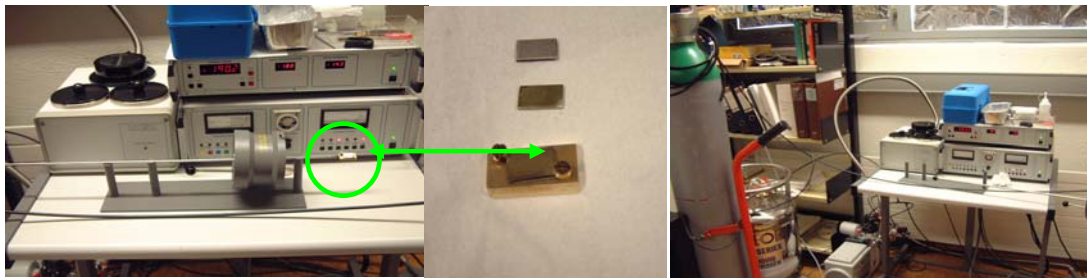
2.2.3.3.1 Aðferðir við mat á festingu örvera við yfirborði.

1. Hefðbundin penslun með bómullarpinna.

Bómullarpinna var rúllað jafnt og þétt yfir sýnaplötuna og pinninn síðan brotinn og settur í dauðhreinsað glas og 10 ml af phosphate Butterfield's buffer bætt við. Útbúnar voru viðeigandi þynningar á bilinu 0 og til 10^{-5} . Sýnum var sáð í petriskálar sem innihéldu viðeigandi næringaræti fyrir bakteríuna. Skálar voru ræktaðar við 22°C eða 35°C eftir því hvaða bakteríur var verið að rannsaka. *Listeria* og *Serratia* við 35°C en aðrar við 22°C

2. **Snertiskálar.** Sýni var lagt á storknað næringaræti sem var í petriskál og pressað létt á það áður en það er tekið til baka. Menguð hlið snýr að ætinu. Skálar settar í ræktun við viðeigandi hitastig.

3. **ATP-ljósmæling.** Sýni tekin með sérstökum ATP-pinna (Snapshot - SS1211- system-SURE) sem er rúllað yfir sýnið. Farið var eftir leiðbeiningum frá framleiðenda. Pensill er vættur í ensímlausn og lausnin sett í



Mynd 9. Sýnahaldari og sýni fyrir frystimeðferð og frystibúnaður fyrir fljótandi köfnunarefni

kúvettu sem sett er sérstakan ATP-ljósmaeli (Celsis-Lumac – SystemSURE). Mældar voru hlutfallslegar ljóseiningar (Relative light units (RLU)) sem samsvarar magni ATP í sýninu.

4. **Direct Epifluorescent Filter Technique.** Smásjárskoðun fór fram eftir litun með acridine orange (AO). Sýni lituð með 0,05% acridine orange í 2 mínútur hreinsuð með dauðhreinsuðu eimuðu vatni og þurrkuð í lofti (Lundén, 2000). Sýni skoðuð undir UV-ljósi og frumur taldar á mismunandi sjónsviðum. AO binst öllu lífrænu efni og er því talinn góður kostur þegar skoða á biofilmu .
5. **Rafeindasmásjá (SEM).** Fyrir skoðun í rafeindasmásjá er nauðsynlegt að meðhöndla sýnin þannig að þau haldist í sem lífvænlegustu formi (Gilmour o.fl., 1993). Efna-meðhöndlun (aðferð 1) er algeng en þá fer sýnið í gegnum margskonar efnameðferð og þurrkun sem kallast „critical point drying“ (CPD). Þá er sýni sem hefur verið þurrkað með etanóli/acetóni flutt í „the critical point drying tæki“. CO₂ gas undir þrýstingi er látið flæða inn í klefann og yfir sýnið, síðan er farið fram hjá „critical point“ í fasalínuritinu þannig að sýnið fer beint úr vökva-fasa yfir í lofttegund. Síðan er sýnið gullhúðað í þrjár mínútur. Í staðinn fyrir þessa efnameðhöndlun og CPD er hægt að frysta sýnið með fljótandi köfnunarefni (cryo-SEM) áður en það er gullhúðað (aðferð 2).

Aðferð 1. Efna-meðhöndlun

1. Sýni sett í ílát sem inniheldur 2% gluteraldehyde í 0,025 mol/L phosphate buffer með pH 7 og látið standa í 4 klst eða 16 klst við 4°C
2. Sýni þvegið tvisvar sinnum með 1 ml af phosphate buffer
3. Þurrkun í hækkandi styrk af etanóli
 - a. 10% v/v ethanol í 15 mín
 - b. 30% v/v ethanol í 15 mín
 - c. 50% v/v ethanol í 15 mín

- d. 70% v/v ethanol í 15 mín
- e. 90% v/v ethanol í 15 mín
- f. 100% v/v ethanol í 15 mín
- g. Þurrkun í CPD: Critical Point Drying búnaður frá Bio-Rad, Polaron Division, Watford England

Gullhúðun með Edwards Sputter Coater S1508

Aðferð 2. Frostmeðferð – (cryopreparation)

Yfirborðssýni er sett á sérstakan sýnahaldara en þá var sýnið skrúfað upp á stöng eins og sýnt er á mynd 5. SEM sýninu er stungið í fljótandi köfnunarefni við -196°C eða lægra hitastig. Frystibúnaður er sýndur á mynd 9 (Oxford CT 1500 Cryostation). Eftir frystingu er sýnið sett í rafeindasmásjá og hitað uppí -80°C undir lofttæmi til að laust vatn þorni (þurrugufun) og síðan kælt aftur í -170°C áður en sýnið er gullhúðað. Þessi síðustu skref fara fram inni í SEM-smásjanni.

2.2.3.4 Viðloðun baktería við yfirborð. Seinni tilraun

Í þessum hluta var festing baktería sem voru einangraðar úr náttúrulegri örveruþekju á ryðfrítt stál, poly vinyl chloride (PVC), polyurethane (PU), og voltareimar (Volti) rannsökuð. Tilhögun tilrauna var sú sama og í fyrri tilraun nema að snertitíminn var núna 24, 72 og 120 klst og aðeins tvær aðferðir voru valdar til að meta festingu bakteríanna. Aðferðirnar voru hefðbundin penslun og ATP-ljósmaeling en það voru þær sem gáfu skýrustu niðurstöðurnar og þannig mestu upplýsingar.

2.2.3.5 Tölfræðileg úrvinnsla á tilraunum með viðloðun baktería á yfirborð.

Könnuð voru áhrif mismunandi yfirborðs og snertitíma á viðloðun mismunandi baktería. Við úrvinnslu á niðurstöðum varðandi festingu mismunandi baktería á mismunandi yfirborð eftir mislangan snertitíma var meðaltal ásamt staðalfráviki reiknað. Þá var tölfræðileg úrvinnsla gerð með Number Cruncher Statistical Software

2000 (NCSS, 329, North 1000 East, Kaysville, Utah 84037), með ferveikagreiningu, ANOVA. Athugað var hvort marktækur munur væri á meðalgildum örverumælinga þegar $p=0,05$. Þar sem munur milli einstakra meðaltala var marktækur var lagt mat á hann með samanburðarprófi Duncan's, Tukeys og/eða Newman-Keuls.

2.3 Áhrif hreinsiefna á vöxt baktería

Markmiðið með þessum verkhluta var að rannsaka áhrif mismunandi hreinsiefna á vöxt nokkurra baktería með það að leiðarljósi að gera þrif markvissari og árangursríkari. Alls voru athuguð 8 hreinsiefni (A-H) og 12 bakteríustofnar.

2.3.1 Bakteríur

Bakteríurnar voru þær sömu og voru notaðar í rannsóknunum hér að framan auk þeirra fimm sem einangruðust úr fiskvinnslu sem hafði lent í vandræðum vegna mengunar af iðragerlum eftir þrif. Bakteríutegundirnar eru: *P. putida*, *Aeromonas*, *P. fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Aeromonas*, *Shewanella putrefaciens*, *L. monocytogenes*. Auk þess var einum stofni af *L. monocytogenes* (H-01-170-2) bætt við, en hann höfðu starfsmenn Rf einangrað í hreinlætisúttekt í laxavinnslu (Birna Guðbjörnsdóttir & Hélène Lauzon, 2002).

2.3.2 Þvotta- og sótthreinsiefni

Hreinsiefnin sem prófuð voru er lýst í töflu 3 og eru þau öll víða notuð í fiskiðnaði á Íslandi. Öll nema tvö þ.e. G og H flokkast sem sótthreinsiefni. Ekki voru öll efnin prófuð á allar bakteríurnar. Nánari upplýsingar um hvaða efni var prófað á hvaða bakteríu er að sjá í töflu 4.

2.3.3 Mat á áhrifum hreinsiefna á bakteríur í lausn

„Microtiter“ aðferð var notuð til að meta áhrif sótthreinsiefna á bakteríurnar og var mældur lágmarksstyrkur efnis sem hindrar vöxt baktería þannig að enginn vöxtur sé mælanlegur og kallast það MIC eða „*minimum inhibitory concentration*“ (Hjörleifur Einarsson & Hélène Lauzon, 1995). MIC gefur upplýsingar um minnsta styrk sem hindrar vöxt baktería en drepur þær ekki endilega. Í þessu tilviki var þéttni bakteríuvaxtar mæld með ljósgleypnimæli við 590 nm.

2.3.3.1 Framkvæmd

Við framkvæmdina var notaður 96 holu bakki (Microwell plate 96U, Nunclon, W.L. Nunc A/S, Danmörk) og var fyrsta röðin notuð fyrir blank (með efni en án baktería), önnur fyrir kontrol (án efnis en með bakteríu) og afgangur var fyrir efnin og bakteríur. Alltaf var skilin

Tafla 3. Hreinsiefni og notendastyrkur þeirra

Nafn	Efnaflokkur	Ráðlagður styrkur	Sýrustíg (pH) óblandað	Sýrustíg (pH) í ráðlögðum styrk
A	Fjörgild ammóníumsamband, iso-thiazolones og ortho phenyl phenol	Tilbúin lausn	3.2	3.2
B	Fjörgilt ammóníumsamband	3 %	12.2	10.9
C	Fjörgilt ammóníumsamband	1 %	7.2	7.4
D	Fjörgilt ammóníumsamband	1 %	8.2	10.8
E	Klór sambönd (og lítið magn af brómsalti).	1 % (200-300ppm)	13	12
F	Natríumhypóklóríð (NaOCl)	200 ppm (ca. 0.3 %)	14	11
G	Klórkvöðuefni (KOH og NaOCl)	5 %	14	12.8
H	Basískt hreinsiefni (NaOH)	3 %	13.3	12.2

Tafla 4. Yfirlit yfir bakteríustofna og þvotta- og sótthreinsiefni sem voru prófuð

Bakteríustofn	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>L. monocytogenes</i> - rækja	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>L. monocytogenes</i> - lax		x	x	x	x	x	x	x
<i>P. putida</i>		x	x		x	x	x	
<i>P. fluorescens</i>		x	x		x	x	x	
<i>Serratia liquefaciens</i>	x	x	x	x				x
<i>S. putrefaciens</i>					x	x	x	
<i>Aeromonas</i>				x	x	x	x	x
<i>Serratia</i> - H-04-187-2-1				x				x
<i>Serratia</i> - H-04-195-6-3				x				x
<i>Serratia</i> - H-04-192-5-3				x				x
<i>Serratia</i> - H-04-198-8-3				x				x
<i>Pseudomonas</i> - H-04-184-1-1				x				x

eftir auð holuröð eftir blank og ef fleiri en eitt efni/ein baktería var prófuð í sama bakkanum þá var skilin eftir auð holuröð á milli þeirra. Þetta var gert til að koma í veg fyrir mengun á milli holuraða. Tvöföld þynning af sóthreinsiefni (100µl) í BHI seyði (100µl) var útbúin í 96 holubökkum. Lokamagn í holu er 200µl. Aðferðinni er lýst hér að neðan.

a) Blankur → 50µl af BHI seyði og 100 phosphate buffer (Butterfield's) og 50µl efni

Kontrol → 50µl af BHI seyði og 50µl phosphate buffer (Butterfield's) og 100µl af þynntri bakteríulausn (10^4).

100µl flutt í næstu holu þar af leiðir að styrkur efnis þynnist til helminga.

Sýni:

- 100µl BHI seyði
- 100µl efni
- 100µl rækt í hverja holu

b) Bakkar voru settir í ræktun við 20-22 °C og lesið var af 2-4 sinnum á 71 klst tímabil.

c) Aflestur var framkvæmdur með Titertek Multiskan Plus ljósmæli model MK II (Flow Laboratories) og A_{590} lesið.

2.3.3.2 Túlkun niðurstaðna

Hlutfall (%) af þétni miðað við kontrol sem er án efnis. Miðað er við 0.05 aukningu í aflestri miðað við blank sem breytingu.

2.3.4 Aðferðir til að meta áhrif hreinsiefna á bakteríur fastar við yfirborð

Megintilgangur með þessum verkhluta var að prófa og að finna aðferð sem hægt væri að nota til að meta áhrif hreinsiefna á vöxt baktería sem eru fastar við yfirborð. Örveruþekja var látin myndast á glerblásnu stáli (AISI-304:2B) og á polyvinyl chloride (PVC) í 72 klst samkvæmt lýsingu í kafla 2.2.3.3.1 hér fyrir framan nema að stærð sýna var minni eða 1 cm². Eftir 72 klst snertitíma voru sýnin hreinsuð þrisvar sinnum með dauðhreinsuðu eimuðu vatni. Eftir það var hreinsiefni hellt yfir sýnin og látið liggja á í ákveðinn tíma eftir því hvort um var að ræða oxandi efni (E,F,G), snertitími 10 og 30 mín., eða yfirborðsvirk efni

(A,C,D) en þá var snertitíminn 10, 30 og 180 mín. Tilraunauppsetning er sýnd í töflu 5. Fyrir hverja mælingu voru tekin tvísýni.

Eftir hvern snertitíma voru sýni tekin annars vegar með penslunaraðferðinni sem var lýst hér að framan og hins vegar með Malthus tækni þar sem örveruvöxtur er mældur í lausn skv. Leiðni-mælingu (nánari lýsinga hér fyrir aftan).

2.3.4.1 Hefðbundin penslun með bómullarpinna

Aðferð var framkvæmd eins og lýst er í kafla 2.2.3.3.2.1. Skálar voru ræktaðar við 22°C fyrir *Pseudomonas* tegundir og við 35°C fyrir *Listeria*.

2.3.4.2 Malthus leiðnimælingar - aðferðafræði

2.3.4.2.1 Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á fjölda *Listeria* við 25°C ræktun og gerð staðalkúrfu

a) *Undirbúningur Listeria ætis*: Þessi mæliaðferð var prófuð samkvæmt upplýsingum sem gefnar voru af Malthus framleiðandanum, nema að ræktunarhitastiginu var breytt úr 35°C í 25°C. Þetta var gert vegna þess að fyrirséð var að það þurfti að rækta *Pseudomonas* samtímis við tilraunina, en sumar tegundir sem tilheyra þessari ættkvísl vaxa ekki við 30°C eða hærri hita (Hélène Lauzon, munnlegar upplýsingar). Þar sem *Listeria* vex ágætlega við stofuhita varð 25°C fyrir valinu. Notað var tilbúið Malthus *Listeria* æti samkvæmt aðferðinni „Fully disposable cell method“ (Malthus *Listeria* selective broth # 945-451), þ.e. einnota plastsellur með *Listeria* æti. Fyrir notkun þurfti að undirbúa sellurnar á sértekkan hátt: tapparnir voru losaðir, sellurnar látnar í gufubað í 30 mín, sellunum lokað strax eftir gufubaðið og látnar kólna í 30-60 mín. Fyrir sáningu var Malthus *Listeria* Food Supplement (#490-156) og Malthus *Listeria* selective supplement (#490-064) bætt út í sellurnar. Sýnismagn var 0,1 ml í hverri sellu. Sérstakir (gulir) yfirtappar voru settir á sellurnar og þær látnar í Malthus baðið þar til svörun fékkst.

b) *Gerð staðalkúrfu*: Rækt (24 klst í TSB-YE við 22°C) af *Listeria monocytogenes* (úr rækjuvinnslu) var þynnt tífalt (1 ml þynnt í 9 ml

Tafla 5. Tilraunauppsetning við athugun á áhrifum sóthreinsiefna á örverur fastar við yfirborð

Verkunartími (mín)	Efni						Kontrol (saline)
	A	C	D	E	F	G	
10	x	x	x	x	x	x	x
30	x	x	x	x	x	x	x
180	x	x	x				x

kælt MRD) frá 10^{-1} til 10^{-7} . Sýni (0,1 ml) af hverri þynningu var skammtað í tvær sellur, tapparnir settir á og sellurnar látnar í Malthus baðið (25°C). Upplýsingar um sýnin voru skráðar í tölvu. Þegar svörun fékkst var tímalengdin (DT-detection time) fyrir hvert sýni skráð. Einnig var *Listeria* fjöldinn í næturræktinni metinn á hefðbundinn hátt, þ.e. 0,1 ml af völdum þynningum sett á TSA-YE skálar og kólóniurnar taldar eftir þriggja daga ræktun við 22°C. Út frá þessum fjölda var staðalkúrfan gerð, aðhvarfslína metin og fundið gildi R^2 .

c) Sérhæfni mæliaðferðarinnar (*selectivity*) gagnvart *Pseudomonas* tegundum: Ræktir af völdum *Pseudomonas* stofna (tafla 4) voru þynntar. Þynningar (10^{-2} og 10^{-4}) af *Pseudomonas putida* og af *Pseudomonas* blöndu (með öllum 5 stofnum) var sáð í *Listeria* sellur og fylgst með þeim sellum í Malthus baðinu. Einnig voru tvær blöndur af *P. putida* og *Listeria monocytogenes* útbúnar: ein með 1000-falt minna af *Listeria* frumum (ca 100-1000/ml) en *P. putida* (100.000-1.000.000/ml) og hin með jafnmargar frumur (hærra magn). Þetta var gert til að athuga hversu sérhæft þetta æti væri, þ.e. hvort *Pseudomonas* tegundir næðu að fjölga sér í þessu æti og jafnframt að útiloka fölsk, jákvæð svör og að kanna hvort hægt væri að meta *Listeria* fjölda í sýnum sem einnig eru menguð með *Pseudomonas* tegundum.

2.3.4.2.2 Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á fjölda *Pseudomonas* tegundar við 25°C ræktun og gerð staðalkúrfu

a) Undirbúningur *Pseudomonas* ætis: Þessi aðferð við talningar á *Pseudomonas* tegundum var framkvæmd samkvæmt upplýsingum sem gefnar voru af Malthus framleiðandanum. SPYE æti (#490-001) var búið til samkvæmt leiðbeiningum, dauðhreinsað (121°C í 15 mín.) og Modified CFC supplement (Ref X108) bætt út í fyrir notkun. Þrjú ml af tilbúnu SPYE-CFC ætinu voru skammtaðir í dauðhreinsaðar Malthus sellur og 1 ml sýni bætt út í. Sérstakir (rauðir) yfir-tappar voru settir á sellurnar og þær látnar í

Malthus baðið þar til svörun (DT) fékkst.

b) Gerð staðalkúrfu: Ræktir (24 klst í TSB-YE við 22°C) af völdum *Pseudomonas* stofnum (tafla 5) voru þynntar. *Pseudomonas putida* var þynnt sér í lagi (1 ml þynnt í 9 ml kælt MRD) frá 10^{-1} til 10^{-7} . Blanda af *P. putida* og hinum fjórum *Pseudomonas* stofnum var einnig útbúin (5 x 0,2 ml þynnt í 9 ml kælt MRD) og þynnt áfram frá 10^{-2} til 10^{-7} . Sýni (1 ml) af hverri þynningu var skammtað í tvær SPYE-CFC sellur, tapparnir settir á og sellurnar látnar í Malthus baðið (25°C). Upplýsingar um sýnin voru skráðar í tölvu. Þegar svörun fékkst var tímalengdin (DT) fyrir hvert sýni skráð. Einnig var *Pseudomonas* fjöldinn í næturræktunum metinn fyrir *P. putida* og *Pseudomonas* blönduna á hefðbundinn hátt, þ.e. 0,1 ml af völdum þynningum sett á Marine Agar (MA, Difco) og modified *Pseudomonas*-CFC (Oxoid, samkvæmt Stanbridge og Board, 1994) skálar og kólóniurnar taldar eftir þriggja daga ræktun við 22°C. Flúorljómandi kólóniur voru einnig taldar á CFC ætinu. Út frá þessum fjölda var staðalkúrfan gerð, aðhvarfslína metin og fundið gildi R^2 .

c) Sérhæfni mæliaðferðarinnar (*selectivity*) gagnvart *Listeria*: Þynningar (10^{-2} og 10^{-4}) af *Listeria monocytogenes* voru sáðar í SPYE-CFC sellur og fylgst með þeim sellum í Malthus baðinu. Eins og fyrr greindi var tveimur blöndum (*P. putida* og *L. monocytogenes*) einnig sáð í SPYE-CFC sellur. Þetta var gert til að athuga hversu sérhæft þetta æti væri, þ.e. hvort *Listeria* gæti fjölgað sér í þessu æti, jafnframt að útiloka fölsk, jákvæð svör og að kanna hvort hægt væri að meta *Pseudomonas* fjölda í sýnum sem einnig eru menguð með *Listeria* tegundum.

2.3.4.2.3 Mat á fjölda *Pseudomonas putida* og *Listeria monocytogenes* eftir sótthreinsun

Malthus sellur voru útbúnar eins og lýst er í köflum 2.3.4.2.1a og 2.3.4.2.2a. Þar sem sýnin voru mengað stál, var bætt dauðhreinsuðu MRD þynningarvatni í hverja sellu (1 ml fyrir SPYE-

Tafla 6. Heiti og uppruni bakteríustofna

Bakteríustofn	Stofnanúmer	Uppruni bakteríustofna
<i>Pseudomonas putida</i>	H-03-302-14	fiskvinnsluumhverfi
<i>Pseudomonas I</i>	54	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 10°C
<i>Pseudomonas I</i>	127	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 0°C
<i>Pseudomonas II</i>	38	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 10°C
<i>Pseudomonas II</i>	131	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 0°C

CFC en 0,1 ml fyrir *Listeria* ætið) til að ná réttu heildarmagni í sellunum og hægt væri að nota staðalkúrfuna til útreikningar á fjölda bakteríanna. Eftir meðhöndlun sýna voru þau sett í tilbúnu Malthus sellurnar og ræktað var við 25°C upp í hámark 33 klst. fyrir *P. putida* en 43 klst. fyrir *L. monocytogenes*, en samkvæmt staðalkúrfunni gefur þessi tími til kynna að <1 fruma var upphaflega í sýninu. Þegar svörun fékkst var tímalengdin (DT) fyrir hvert sýni skráð og fjöldinn umreiknaður.

3. NIÐURSTÖÐUR

3.1 Úttekt á hönnun á fiskvinnslubúnaði

Nákvæm samantekt um úttektirnar er ekki birt í þessari skýrslu en hefur verið send viðkomandi aðilum. Niðurstöður matsins leiddu í ljós ýmislegt sem má laga varðandi hönnunina m.t.t. hreinlætis. Helst má nefna að mikið var um lárétta fleti þannig að afrennsli var ekki gott; hola prófíla; óæskilegar skrúfusamsetningar; lélegar suður; dauð rými t.d. í leguhúsum (mynd 10) og færribönd sem draga í sig raka eins og mynd 11 sýnir.

Einnig var töluvert um brúnir eða fláa sem



Mynd 10. Lega full af óhreinindum



Mynd 11. (a) Burðargrind (prófílar) er opin í þann enda sem snýr að gólfi (b) Slétt belti sem safnar í sig raka og lárétt hlíf sem safnar raka og óhreinindum

erfitt var að þrifa og óhreinindi náðu að safnast fyrir á þeim stöðum. Færribönd voru oft mjög lokuð, erfitt að losa þau, mikið af burðarefni og þau voru því illþrifanleg.

Úttektirnar leiddu í ljós að margt hefur batnað á síðustu árum ef borin eru saman ný og gömul tæki en enn þarf að laga marga þætti og leggja meiri áherslu á hreinlæti og þrif við hönnun á tækjum. Helstu framfarirnar eru að nýrri tækin eru ekki eins lokuð og eru útbúin þannig að auðvelt er að opna þau og taka í sundur til að auðvelda þrif. Sum færribönd eru auðvelt að losa í sundur þó svo að í sumum tilfellum séu þau mjög löng og þung. Tækin/vinnslubúnaður er oft of flókin og segja má að það sé verið að nota óþarflega mikið efni í þau. Hönnuðir og framleiðendur mættu taka það til athugunar, þ.e hvað af öllu þessu efni er virkilega nauðsynlegt. Helstu niðurstöður þessa verkhluta voru að framleiðendur vinnslubúnaðar fyrir matvælavinnslu þurfa að koma sér upp ákveðnu verklagi þar sem kröfur til hreinlætis eru hafðar í fyrirrúmi og að hægt sé að taka út eða meta þessa þætti. Verklag sem komið er á verður að hafa augljós viðmið þannig að auðvelt verði að greina frá þá þætti sem þarf að breyta. Fyrirtækin sem framleiða vinnslubúnað og tóku þátt í þessum verkhluta hafa þegar endurbætt að hluta til sinn vinnslubúnað m.t.t. hreinlætis þannig að auðveldara verði að halda honum hreinum. Þau eru einnig að koma á ákveðnu verklagi og að mynda þrifahópa í sínum fyrirtækjum þannig að þrifavæn hönnun verður eitt af markmiðum og stefnumálum þeirra.

Upplýsingum um yfirborðsefni og hreinsi-efni var einnig safnað saman í þessari úttekt og eru þær sýndar í viðauka 1 og voru algengustu efnin notuð við rannsóknir á örveruþekju í kafla 2.2.3 og við rannsóknir á áhrifum sótthreinsi-efna sem lýst er í kafla 2.3.

3.2 Rannsóknir á örveruþekju (biofilmu)

3.2.1 Örverusamsetning á stálsýnum

Niðurstöður bentu greinilega til að örverur náðu að festa sig á stálplötunum sem var komið fyrir á hinum ýmsu stöðum í gegnum vinnslu-ferilinn bæði í fiskvinnslu og í rækjuvinnslu.

3.2.1.1 Fiskvinnsla

Heildarfjöldi örvera á sýnum sem komið var fyrir í fiskvinnslu var mjög hár, þó voru þessi sýni tekin eftir að búið var að þrifa vinnsluna. Niðurstöð-ur örverutalninga eru sýndar í töflum 7-8. Talningar voru frá 21.000-800.000 cfu/cm² og þar af voru 0,1-1,3 % H₂S-myndandi bakter-íur. Yfirborð sýnanna var 39 cm² en venjulega er miðað við að yfirborð sé hreint ef fjöldi örvera er minna eða jafnt og 5 cfu/cm² á snertiflötum afurðarinnar. Hafa verður þó í huga að sýnin voru ekki í beinni sneringu við

Tafla 7. Örverutalningar á sýnaplötum í fiskvinnslu – hefðbundin penslun

Sýnastaður	Örverufjöldi/cm ² – Járnagar – 15°C/7daga		Listeria
Fiskvinnsla	Alls	H ₂ S- myndandi	
Við karfaflokkara	Týnt sýni		
Á skurðarvél 1	<1	<1	neikvæð
Á flæðilínu við 3. sæti frá hægri	390.000	15.000	neikvæð
Vigtareining eftir flæðilínu	810.000	63.000	neikvæð
Millifæriband f. seinni skurðarvél	21.000	2.800	neikvæð
Flokkari - 3. lúga frá vinstri e. lausfrysti	<1	<1	neikvæð
IQF- Innmatari á færribönd	150.000	130	neikvæð
Vigt að karfavél	53.000	510	neikvæð
Prófill undir tröppubandi v. karfavél	210.000	390	neikvæð
Á skurðarvél 2	77.000	390	neikvæð

Tafla 8. Örverutalningar á sýnaplötum í fiskvinnslu – hljóðbylgjur

Sýnastaður	Örverufjöldi/cm ² – Járnagar – 15°C/7daga		Listeria
Fiskvinnsla	Alls	H ₂ S- myndandi	
Við karfaflokkara	Týnt sýni		
Á skurðarvél	<1	<1	neikvæð
Á flæðilínu við 3. sæti frá hægri	810.000	21.000	neikvæð
Vigtareining eftir flæðilínu	2.000.000	46.000	neikvæð
Millifæriband f. seinni skurðarvél	22.000	1.600	neikvæð
Flokkari - 3. lúga frá vinstri e. lausfrysti	<1	<1	neikvæð
IQF- Innmatari á færribönd	41.000	390	neikvæð
Vigt að karfavél	220.000	270	neikvæð
Prófill undir tröppubandi v. karfavél	210.000	1.100	neikvæð
Á skurðarvél 2	57.000	1.500	neikvæð

afurðirnar en samt mjög nálægt afurðasvæði og teljast því í óbeinni sneringu við þær. Hætta á krossmengun frá þessum stöðum er því mikil. Greinilegt er að vinnubrögð við þrif voru ekki nógu markviss og því næst ekki góður árangur. Engin *Listeria* greindist í þessum sýnum.

3.2.1.2 Rækjuvinnsla

Heildarfjöldi örvera á sýnum úr rækjuvinnslu var frá 8-15.000 cfu/cm² þar af voru 4-25 % H₂S-myndandi bakteríur (tafla 9). Engin *Listeria* greindist í sýnum teknum af sýnaplötunum. Í rækjuvinnslunni var fjórum tegundum af mismunandi meðhöndluðum A304:2B stálsýnum komið fyrir en upplýsingar um meðhöndlun á þeim má sjá í töflu 9. Ekki greindist munur ($p > 0,05$) á örverufjölda á mismunandi yfirborði þegar samanburður var gerður á öllum sýnunum og ekki var tekið tillit til staðsetningar. Slípað yfirborð virkaði þó frekar hvetjandi á festingu örvera þar sem í flestum tilfellum var meiri örverufjöldi á þeim sýnum í samanburði við þau sem voru ómeðhöndluð eða fengu bara sýrubað. Mesti munurinn virtist þó vera tengdur þeim vinnubrögðum við þrif sem eru viðhöfð á mismunandi svæðum fyrir og eftir suðu. Sýni staðsett við pillunarvél komu þó illa út en það er mjög erfitt og snúið að þrifa þá vel.

Tafla 9. Örverutalningar á sýnaplötum í rækjuvinnslu

Sýnastaður	Teg sýnis A304-2B	Örverufjöldi/ cm ² – Járnagar – 15° C/7daga		Listeria
		Alls	H ₂ S-myndandi	
Rækjuvinnsla				
Við suðupott	Ekkert unnið	6800	1400	neikvæð
	Eftir sýrubað	7100	500	neikvæð
	Slípað	8400	2100	neikvæð
	Slípað og sett í sýrubað	15000	1800	neikvæð
Suðusvæði við palla	Ekkert unnið	400	20	neikvæð
	Eftir sýrubað	1100	50	neikvæð
	Slípað	450	110	neikvæð
	Slípað og sett í sýrubað	840	40	neikvæð
Á pillunarfél	Ekkert unnið	920	<1	neikvæð
	Eftir sýrubað	790	<1	neikvæð
	Slípað	2400	<1	neikvæð
	Slípað og sett í sýrubað	1700	<1	neikvæð
Við þvælara	Ekkert unnið	31	<1	neikvæð
	Eftir sýrubað	30	<1	neikvæð
	Slípað	8	<1	neikvæð
	Slípað og sett í sýrubað	26	<1	neikvæð

3.2.1.3 Örverusamsetning

Alls var einangraður 391 stofn úr rækjuvinnslu og 175 stofnar úr fiskvinnslunni. Munurinn liggur í því að fleiri stálsýnum var komið fyrir í rækjuvinnslunni og voru 25 bakteríur einangraðar og greindar af hverri stálsýnaplötu.

Fiskvinnsla

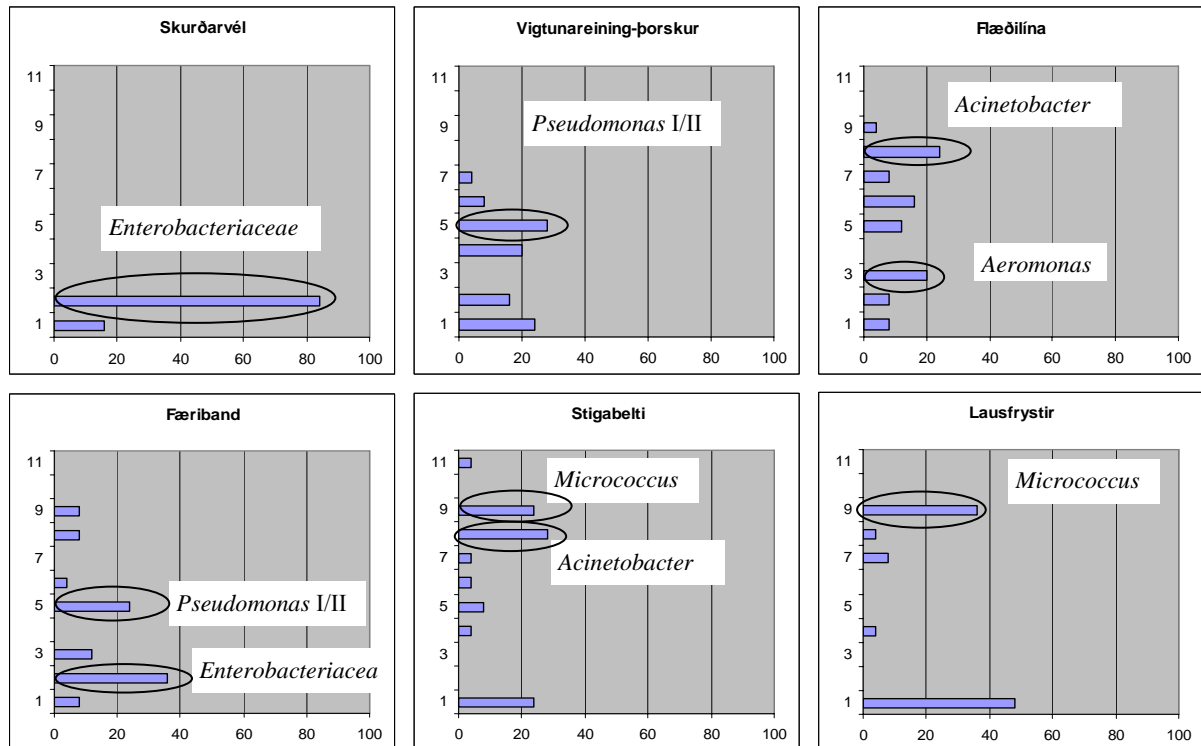
Helstu hópar baktería sem einangruðust úr fiskvinnslu eftir hefðbundna penslun eru sýndir í töflu 10 og á mynd 12 og voru: *Enterobacteriaceae* (22%), *Micrococcus* (11%) og *Pseudomonas* I/II (10%). Einnig var nokkuð stór hópur baktería sem greindist sem coryneforms (9%) en til þessa hóps flokkast alls konar Gram-jákvæðar stafлага bakteríur sem hægt er að greina frekar niður í tegundir þó það hafi ekki verið gert hér. Þessi hópur greindist þó aðeins í einhverjum mæli á vigtunareiningu fyrir karfa. En karfi er mun feitari fiskur en þorskur og ufsi

sem fóru í gegnum hina sýnatökustaðina. Þær örverur sem losaðar voru með hljóðbylgjum, sem var aðeins gert við sýnin úr fiskvinnslu greindust sem *Enterobacteriaceae* (17%), *Aeromonas* (11%), *Pseudomonas* I/II (17%), *Acinetobacter* (18%) og coryneforms (12%). Einnig einangruðust aðrar óþekktar Gram-neikvæðar örverur (10%). Ekki var mikill munur á heildarfjölda örvera sem greindust eftir penslunar- eða hljóðbylgjuaðferð. Helsti munur á samsetningu örvera miðað við mismunandi aðferðir við einangrun var að eftir hljóðbylgju-meðferð einangraðist einnig hópur *Acinetobacter* en eftir penslun þá greindust einnig *Micrococcus* tegundir. Mikilvægt er að hafa í huga að hugsanlega hefur aðferðin sem slík ekki þessi áhrif þar sem um mismunandi sýni var að ræða.

Tafla 10. Örverusamsetning á stálsýnum í fiskvinnslu (penslun)

Örverutegund	Sýnatökustaðir										Alls	(%)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX			
Dauðar	-	2	6	2	-	12	3	6	4	35	20	
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	2	4	9	-		2		21	38	22	
<i>Aeromonas</i> spp.	-	5		3	-					8	5	
Gram-neikvæðar/óþekktar	-		5			1		1		7	4	
<i>Pseudomonas</i> I,II	-	3	7	6	-			2		18	10	
<i>Pseudomonas</i> III,IV	-	4	2	1	-		1	1		9	5	
<i>Moraxella</i> spp		2	1			2	2	1		8	5	
<i>Acinetobacter</i> spp	-	6		2	-	1		7		16	9	
<i>Micrococcus</i> spp	-	1		2	-	9		6		20	11	
coryneforms							15			15	9	
<i>Planococcus</i> spp								1		1	<1	
Alls										175		

*I-skurðarvél-1, II-flæðilína, III-vigt-1,IV-færiband, V- flokkunarfél, VI-IQF, VII-vigt-2, VIII-stigaband, IX-skurðarvél-2



Rækjuvinnsla

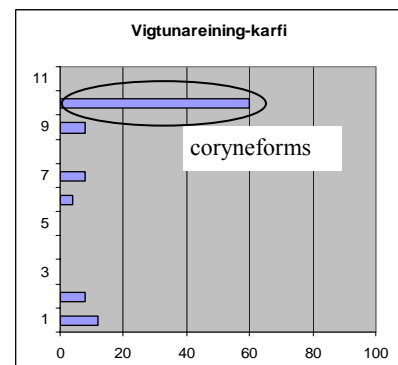
Algengustu tegundir örvera sem greindust í rækjuvinnslu eru sýndar á mynd 13 og á töflu 11: Þær eru: *Pseudomonas* I/II (54%), *Aeromonas* (12%) og *Pseudomonas* III/IV (6%).

Ef niðurstöður eru teknar frekar saman þá taldist stærsti hópurinn í rækjuvinnslu til Gram-neikvæðra bakteria (81%) og þar af voru *Pseudomonas* teg. flestar (60%). Aðrir mikilvægir Gram-neikvæðir hópar töldust til *Aeromonas* og *Moraxella*. Það sama koma fram í fiskvinnslunni þ.e. að stærsti hópurinn sem greindist í fiskvinnslunni taldist einnig til Gram-

Mynd 12.

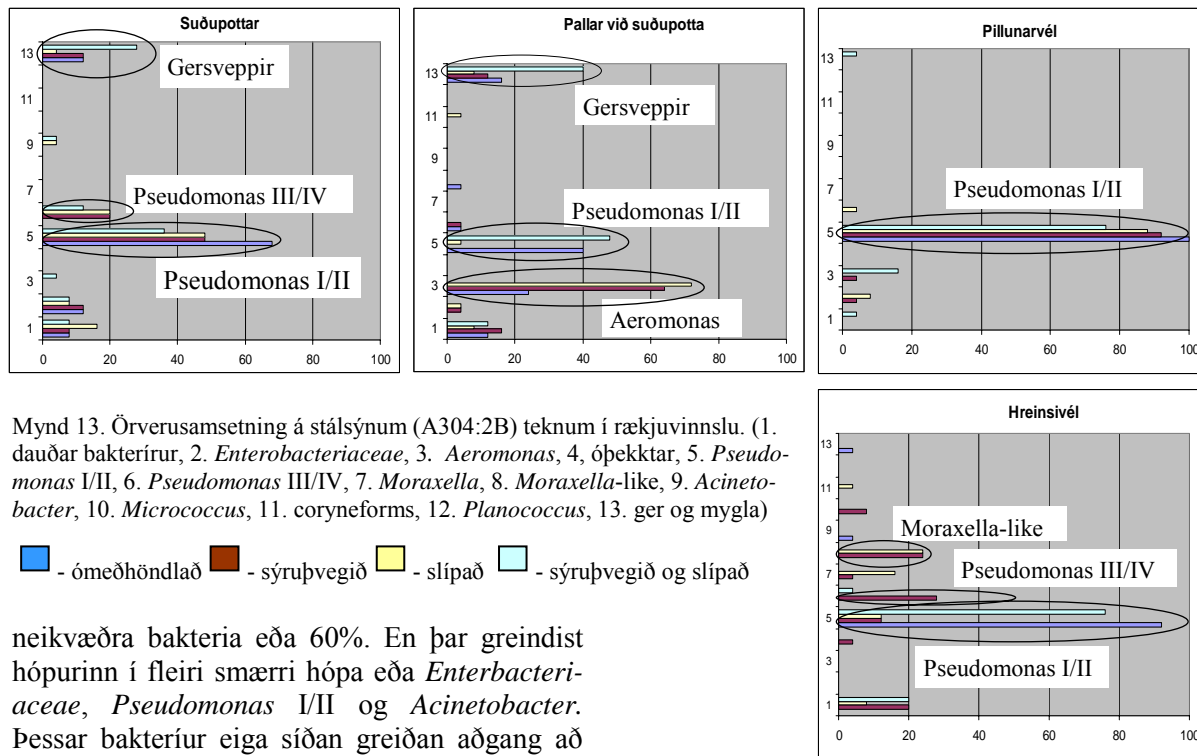
Örverusamsetning á sýnum teknum í fiskvinnslu (7 staðir). (1. dauðar bakterírur, 2.

Enterobacteriaceae, 3. *Aeromonas*, 4. óþekktar, 5. *Pseudomonas* I/II, 6. *Pseudomonas* III/IV, 7. *Moraxella*, 8. *Acinetobacter* 9. *Micrococcus*, 10. coryneforms, 11. *Planococcus*)



Tafla 11. Örverusamsetning á stálsýnum í rækjuvinnslu

Örverutegund	Sýnatökustaðir*																Alls	(%)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI		
Dauðar	2	2	4	2	3	4	2	3				1		5	2	5	35	9
<i>Enterobacteriaceae</i>	3	3	2	2		1	1			1	2						15	4
<i>Aeromonas</i> spp.				1	6	16	18			1		4					46	12
Gram-neikvæðar/ óþekktar														1			1	<1
<i>Pseudomonas</i> I,II	17	12	12	9	10		1	12	25	23	22	19	23	3	3	19	210	54
<i>Pseudomonas</i> III,IV		5	5	3	1	1					1			7		1	24	6
<i>Moraxella</i> spp.														1	4		5	1
<i>Moraxella</i> -like spp.					1									6	6		13	3
<i>Acinetobacter</i> spp.			1	1									1				3	1
<i>Micrococcus</i> spp.														2			2	1
coryneforms							1									1	2	
<i>Planococcus</i> spp.																	0	0
Gersveppir	3	3	1	7	4	3	2	10				1	1				35	9
	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	16	25	391	



Mynd 13. Örverusamsetning á stálsýnum (A304:2B) teknum í rækjuvinnslu. (1. dauðar bakteríur, 2. *Enterobacteriaceae*, 3. *Aeromonas*, 4. óþekktar, 5. *Pseudomonas* I/II, 6. *Pseudomonas* III/IV, 7. *Moraxella*, 8. *Moraxella*-like, 9. *Acinetobacter*, 10. *Micrococcus*, 11. coryneforms, 12. *Planococcus*, 13. ger og mygla)

■ - ómeðhöndlað ■ - sýrupvegið ■ - slípað ■ - sýrupvegið og slípað

neikvæðra bakteria eða 60%. En þar greindist hópurinn í fleiri smærri hópa eða *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* I/II og *Acinetobacter*. Þessar bakteríur eiga síðan greiðan aðgang að afurðunum í gegnum vinnsluferilinn og geta haft áhrif á geymsluþolið.

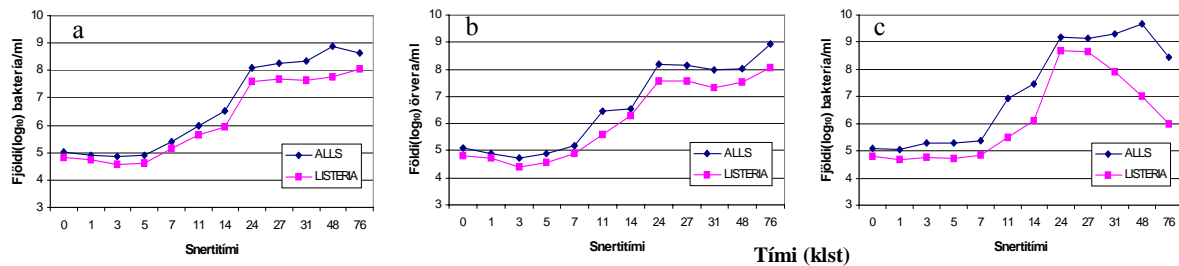
Eftir greiningu með API-20E kom í ljós að 50% örvera sem greindust sem *Enterobacteriaceae* voru af tegundinni *Serratia liquefaciens* og var hún því valin til frekari rannsókna. Þetta á við bæði um bakteríur sem greindust í rækjuvinnslu og í fiskvinnslu. Af nokkrum þekktum tegundum af *Serratia* er *S. liquefaciens* mjög algeng í náttúrunni, þá helst í/á plöntum og í meltingarvegi nagdýra. Coryneforms sem greindust í nokkrum tilfellum er hópur óreglu-legra Gram-jákvæðra staflaga bakteria sem að öllu jöfnu eru ekki taldir til skemmdarbaktería eða sjúkdómsvaldandi bakteria. Sumar *Pseudomonas* tegundir teljast til hóps sem kallaður er sérhæfðar skemmdarbakteríur. Engin *Listeria* greindist í sýnum teknum af sýnaplötunum hvorki úr fiskvinnslunni né úr rækjuvinnslunni.

3.2.1.4 Sameindafræðilegar aðferðir

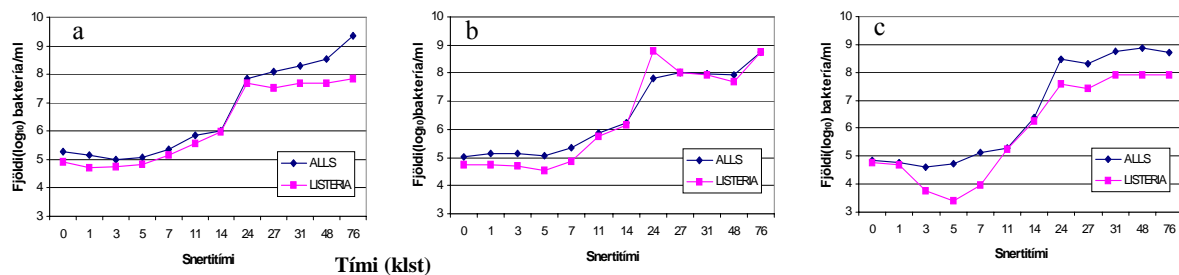
Þegar búið var að framkvæma hefðbundna ræktun eftir penslun á stálplötunum var vökvinn sem eftir er settur í frysti og geymdur þar til DNA-einangrun fór fram. Í verkefninu var lögð mikil vinna í PCR mögnunina. Þegar unnið var í því að aðlaga aðferðirnar og finna rétta keyrslu var unnið með DNA úr hreinræktum af bakteríum. Erfitt var að finna réttar PCR aðstæður þar sem ýmis vandamál komu upp s.s. „smurningur“ banda en með endurteknum prófunum

tókst að finna réttar aðstæður. Unnið var í því að magna upp nógu mikið DNA svo að hægt sé að klippa það og síðan rafdraga. Þegar réttu PCR aðstæðurnar voru fundnar komu upp vandræði þar sem neikvæður staðall var mengaður, þannig að fram komu bönd í sýni sem á ekki að innihalda neitt DNA, þetta orsakaðist af því að verið var að vinna með þrimera fyrir allar bakteríur og minnsti snefill af mengun varð til þess að það magnaðist upp DNA. Þannig að öll böndin sem sáust voru í raun mengun. Það var sannreynt með því að klippa afurðina með *HaeI* skerðisími (New England Biolabs) og raf-dregið á hefðbundinn hátt til að sjá hvort bönd væru til staðar, kom í ljós að öll böndin sem komu fram voru eins og neikvæði staðallinn.

Þegar sýnin voru skoðuð nánar kom í ljós að eitthvað hafði farið úrskeiðið í DNA einangruninni og ekkert DNA var til staðar. Þannig að þegar til átti að taka reyndist ekki unnt að framkvæma T-RFLP aðferðina á þeim sýnum sem tekin voru af stálplötunum. Ekki er vitað hver orsök er fyrir því að DNA tapaðist, en það var notuð hefðbundin Klór-phenól aðferð við einangrunina, líklegt er þó að DNA hafi tapast í millifasa sem kom fram eða þá að það hafi verið svo lítið af því. Því er ekki unnt að sýna neinar niðurstöður úr þessum verkhluta, þó svo að mikil vinna hafi verið lögð í hann.



Mynd 14. Vöxtur *L. monocytogenes* í rækt með bakteríum einangruðum úr fiskvinnslu (*Pseudomonas* III/IV(a), *Pseudomonas* I/II(b) og *Serratia liquefaciens*(c))



Mynd 15. Vöxtur *L. monocytogenes* í rækt með bakteríum einangruðum úr rækjuvinnslu (*Pseudomonas* I/II (a), *Aeromonas* (b) og *Pseudomonas* III/IV (c))

3.2.2 Vaxtarílraunir í rækjuseyði: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* I/II, *Pseudomonas* III/IV, *Aeromonas* og *Serratia liquefaciens*

Mynd 14 sýnir vöxt *L. monocytogenes* í rækt með bakteríum einangruðum úr fiskvinnslu. Eftir um 6 klst var bakterían farin að fjölga sér. Greinilegt er að *L. monocytogenes* lifir vel í návist *Pseudomonas* tegunda hvort sem um er að ræða teg. I/II eða III/IV. Eftir 76 klst er hún enn að fjölga sér. Hins vegar virðist nábyli við *S. liquefaciens* ekki vera hagstætt og eftir u.þ.b. 24 klst fer fjöldi *L. monocytogenes* minnkandi. Mynd 15 sýnir vöxt *L. monocytogenes* í návist baktería sem hafa verið einangraðar úr vinnslu-umhverfi rækju. Niðurstöður þar sýna það sama að *L. monocytogenes* vex vel í nábyli við *Pseudomonas* tegundir og einnig í nábyli við *Aeromonas* teg.

Út frá þessum niðurstöðum var ákveðið að velja bakteríur til að halda áfram með við rannsóknir á festingu baktería við mismunandi yfirborðsefni. Fyrir valinu urðu *Pseudomonas putida* (I/II), *Pseudomonas* III/IV sem síðar greindist sem *Shewanella putrefaciens* og *Serratia liquefaciens* einangraðar úr fiskvinnslu og *Pseudomonas fluorescens* (I/II) og *Aeromonas* úr rækjuvinnslu. Ætlunin var að velja aðeins tvær *Pseudomonas* tegundir sem höfðu mismikil áhrif á vöxt *L. monocytogenes*. En þar sem

Aeromonas virtist hafa mjög hagstæð áhrif á vöxt *L. monocytogenes* og *Serratia liquefaciens* óhagstæð áhrif voru þær því einnig teknar með til að athuga viðloðun við fast yfirborð.

3.3 Tilraunir á viðloðun baktería við yfirborð

3.3.1 Hrófismælingar

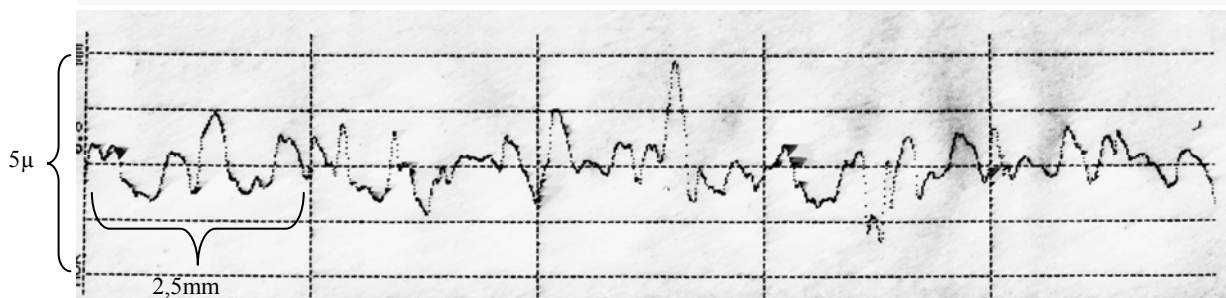
Niðurstöður hrófismælinga eru sýndar í töflu 12. Niðurstöður eru gefnar í μm og eru meðaltal af þremur mælingum. Ra gildin eru mjög mismunandi og gefa til kynna að glerblásna stálið og polyurethane séu með grófasta yfirborðið. Ra gildin gefa upplýsingar um meðal grófleika á ákveðnu lengdarbili á sýninu

Mynd 16 sýnir dæmi um yfirborð með Ra-1,7 μ , Rz-9,4 μ og Rmax-12,9 μ . Ra gildið tekur ekki tillit til hæstu toppa eða lægstu dala en gefur bara meðalgildi en eins og myndin sýnir þá er töluverður munur þar á milli. Rz gildið mælir 5 hæstu toppana og fimm lægstu dalina og gefur meðaltal af hæstu toppunum og lægstu dölunum og eru meðaltölin lögð saman. Rmax gefur upplýsingar um mestu hrófisdýpt á ákveðnu svæði. Mjög gott samband var á milli þessara mæligilda þar sem fylgnistuðullinn r^2 var 0,93 fyrir Rz og Ra og 0,94 fyrir Rmax og Ra. Fyrir Rz og Rmax var fylgnistuðullinn 0,99 (mynd 17). Mikið ósamræmi var á milli einstakra mælinga þegar plastsýni úr PU voru mæld með hrófismæli og gefur það til kynna að

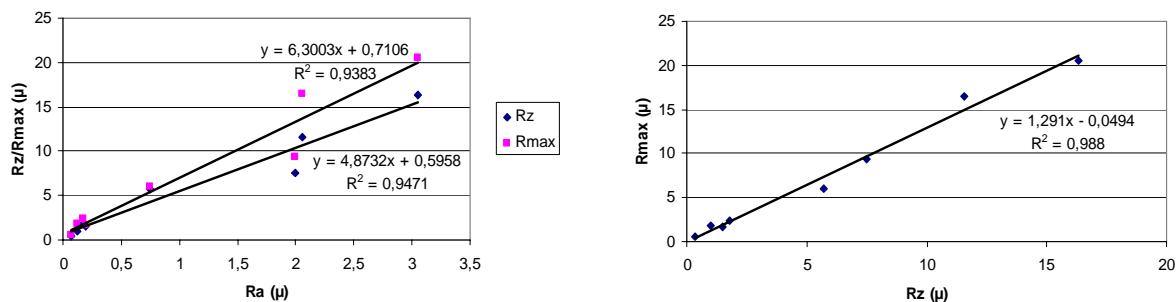
Tafla 12. Hrýfismælingar á mismunandi yfirborði (µm)*

Efni	Ra	Rz	Rmax	Rq	Rp	Rt	R3z
Ómeðhöndlað stál A304-2B	0,17	1,77	2,33	0,23	0,40	2,43	1,27
Slípað stál A304-2B	0,19	1,50	1,67	0,24	0,57	1,80	1,20
Glerblásið stál A304-2B	0,75	5,73	6,07	0,95	2,73	6,47	4,50
Polyethylene - slétt	0,12	1,00	1,80	0,17	0,37	1,80	0,47
Polyethylene - gróft	2,06	11,57	16,43	2,65	5,73	17,90	4,50
Poly vinylchloride	2,00	7,5	9,4	2,36	3,67		
Polyurethane	3,05	16,33	20,47	3,76	7,3		10,9
Volta-reimar	0,07	0,35	0,5	0,08	0,3		

*Ra,Rq: meðalgrófleiki (mean roughness)
 Rz,Rmax: dýpi raufa (roughness depth)
 Rp: hæð toppa (peak height)
 R3z: dýpi raufa - grunnur (base roughness depth)



Mynd 16. Útprintun eftir hrýfismælingu. Ra-1,7µ, Rz-9,4µ. og Rmax 12,9. Mögnunin er 5µ lóðrætt og 2,5 mm lárætt

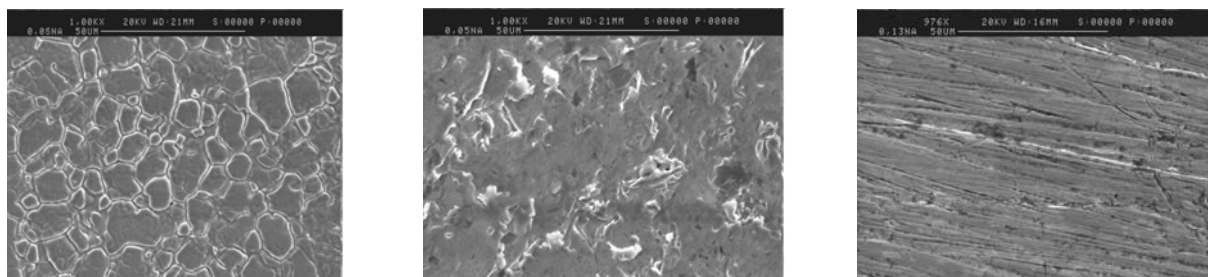


Mynd 17. Samband á Ra, Rz og Rmax.

sýnin séu ekki mjög einsleit eins og virðist vera með öll hin sýnin. Það var nánast ómögulegt að mæla PU-sýnin því þau vildu dragast með mæl-
 inum.

Myndir 18-20 sýna myndir teknar í rafeinda-
 smásjá í 1000 sinnum stækkun. Þær sýna greini-

lega mismunandi mynstur í yfirborðunum þar sem glerblásna stálið (mynd 18) og PE-gróft (mynd 19) er grófast og er það í samræmi við niðurstöður hrýfismælinga með hrýfismæli. Athyglisvert er að skoða mynstrið sem kemur fram á stályfirborðunum og að sjá hvernig mis-

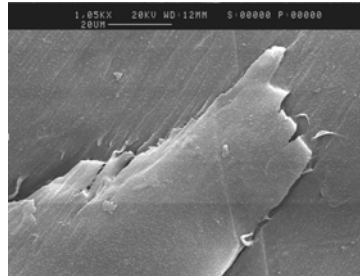
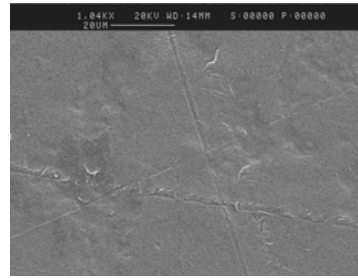


Ómeðhöndlað stál (Ra-0,16-0,17µ)

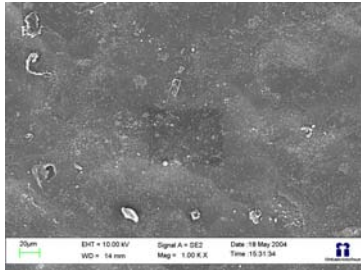
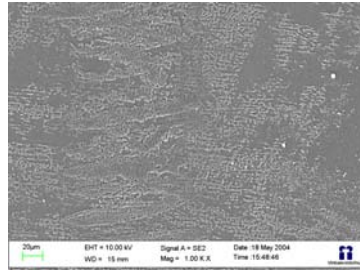
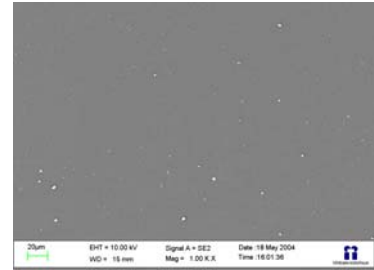
Glerblásið stál (Ra-0,7-0,8µ)

Slípað stál (Ra-0,16-0,22µ)

Mynd 18. SEM-myndir af mismunandi stáli. 1000x stækkun.

Gróft polyethylene (RA -1,6-2,9 μ)Slétt polyethylene (Ra-0,1-0,14 μ)

Mynd 19. SEM myndir af polyethylene. 1000x stækkun.

PVC (Ra-2,97-3,09 μ)PU (Ra-1,02-3,23 μ)

Volti (Ra-0,050,1)

Mynd 20. SEM myndir af PVC, PU og Voltareimur. 1000x stækkun.

munandi meðferð breytir áferðinni. Einnig er greinilega munur á PE-sýnunum sem sýnd eru á mynd 19 þar sem annað sýnið er mun grófara en hitt. Þessi munur kemur fram við vinnslu (fræsingu) á plastinu en ef vinnslan er mjög hröð þá verður áferðin grófari. Hraði á vinnslunni hefur bein áhrif á afköst fyrirtækisins. Plastsýnin (PVC, PU og volti) sem sýnd eru á mynd 20 sýnast mun sléttari en stálsýnin þó má sjá votta fyrir glufum og holum.

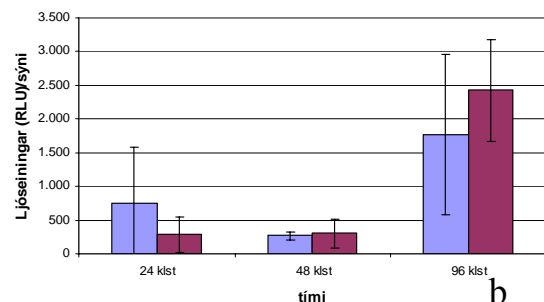
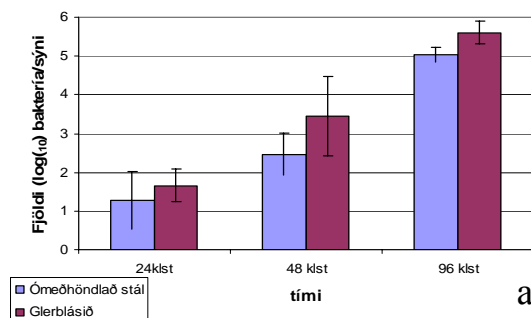
3.3.2 Áhrif yfirborðsefna á viðloðun örvera. Fyrri tilraun

Í upphafi voru prófaðar fimm aðferðir til að meta festingu og reyndust aðeins tvær gefa marktækar upplýsingar miðað við núverandi aðbúnað. Ein aðferð var alveg dæmd úr leik

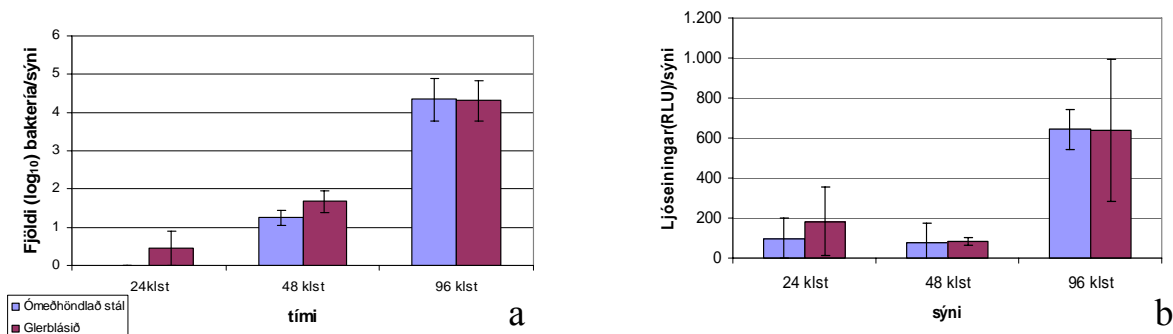
eftir nokkrar tilraunir en það var aðferð, þar sem sýnið er látið snerta (snertiskálar) ætíð í skammann tíma. Sú aðferð kom illa út og eru þær niðurstöður ekki sýndar hér. Mjög erfitt reyndist að magngreina fjölda baktería. Niðurstöður tveggja aðferða, hefðbundinni penslun og ATP ljósmælingu, eru sýndar á myndum 21-27. Einnig eru sýndar nokkrar myndir teknar af örveruþekju í smásjá eftir litun með AO (mynd 28) og eftir skoðun í rafeindasmásjá (myndir 29-32).

3.3.2.1 Niðurstöður hefðbundinna örverumælinga og ATP mælinga

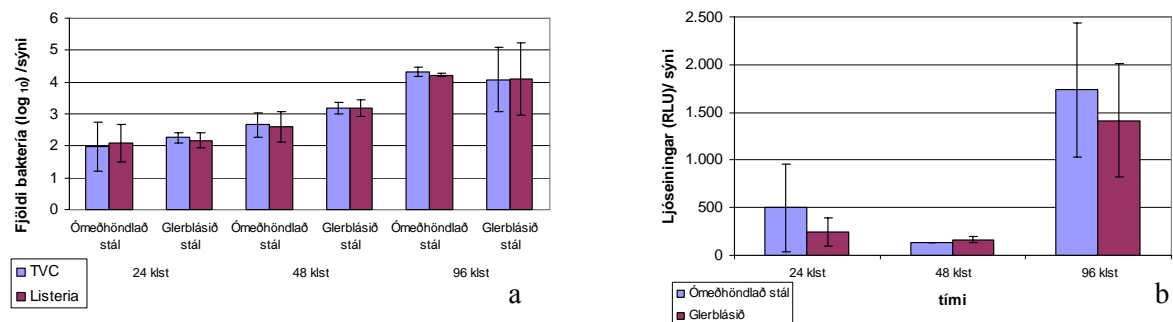
Enginn munur greindist á festingu *L. monocytogenes* og *Pseudomonas* I/II á ómeðhöndlað stál og glerblásið nema þegar hreinrækt af *L. monocytogenes* var prófuð.



Mynd 21. Viðloðun *Listeria monocytogenes* við tvö konar stál eftir mismunandi tíma. Viðloðun metin með hefðbundinni penslun og talningu á PCA (a) og ATP-ljósmæli (b). Þrísýni



Mynd 22. Viðloðun *Pseudomonas* I/II við tvenns konar stál eftir mismunandi tíma. Viðloðun metin með hefðbundinni penslun og talningu á PCA (a) og ATP ljósmælin (b). Þrísýni.

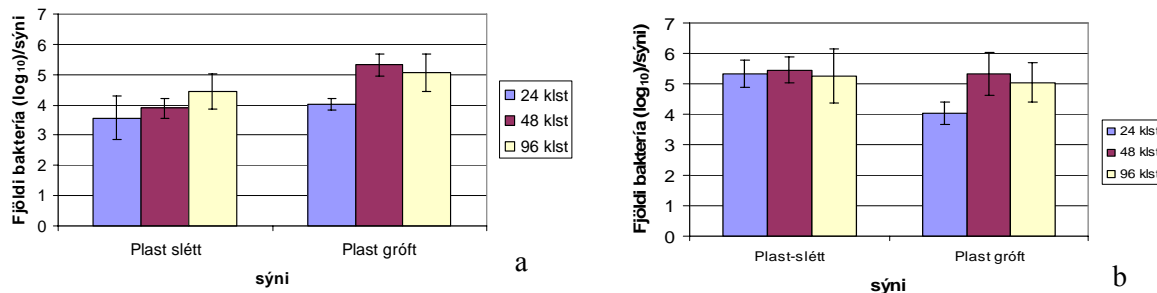


Mynd 23. Viðloðun *L. monocytogenes* og *Pseudomonas* I/II í blandaðri rækt við tvenns konar stál eftir mismunandi tíma. Viðloðun metin með hefðbundinni penslun og talningu á PCA (a) og ATP-ljósmæli (b). Þrísýni.

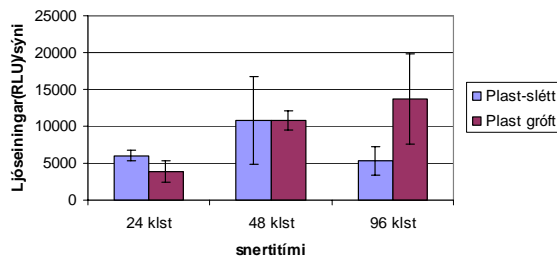
Mynd 21 sýnir viðloðun *L. monocytogenes* á tvenns konar stályfirborð metin með tveimur mismunandi aðferðum. Sýnin voru tekin í þrísýni. Þar kemur fram munur á festingu *L. Monocytogenes* sem er meiri á glerblásnu stáli en ómeðhöndluðu ($p < 0,05$). Mynd 22 sýnir sams konar niðurstöður fyrir *Pseudomonas* I/II og mynd 23 fyrir blandaða rækt af *Pseudomonas* I/II og *L. monocytogenes*. Þær niðurstöður sýna engan mun á festingu við mismunandi yfirborð. Hreinrækt með *L. monocytogenes* festist greinilega best á stályfirborðið í samanburði við hreinrækt af *Pseudomonas* I/II eða blöndu af þessum tveimur ræktum.

Í öllum tilvikum koma fram mikil áhrif tíma og er myndun örveruþekju mest eftir 96 klst ($p > 0,05$). Það á bæði við um örverumælingar eftir hefðbundna penslun og mælingar með ATP-ljósmæli. Niðurstöður eftir ATP-ljósmælingu benda til að hreinrækt af *L. monocytogenes* festist betur við glerblásið yfirborð í samanburði við ómeðhöndlað og er það í samræmi við niðurstöður hefðbundinni örverumælinga.

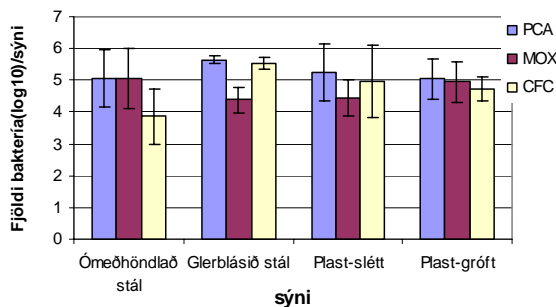
Greinilega kemur fram í öllu tilvikum að ATP mælingin er ekki nógu næm til að meta örverufjölda þegar hann er undir 1000 cfu/ml. Þar af leiðir að ekki er hægt að taka mark á



Mynd 24. Viðloðun *L. monocytogenes* (a) og *Pseudomonas* I/II (b) á tvenns konar plast. Viðloðun metin með örverumælingu eftir penslun. Þrísýni.



Mynd 25. Viðloðun blöndu af *L. monocytogenes* og *Pseudomonas* I/II á tvenns konar plast. Viðloðun metin með ATP-mælingu. Þrísýni.



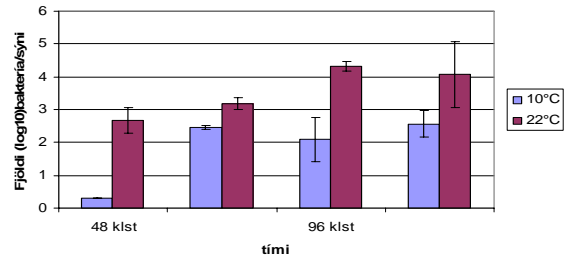
Mynd 26. Viðloðun *Pseudomonas* I/II og *L. monocytogenes* í blandaðri rækt. Örverutalningar á mismunandi ætum. PCA-heildarfjöldi, MOX-*Listeria*, CFC-*Pseudomonas*. Þrísýni. Sýni tekin eftir 96 klst snertitíma.

niðurstöðum með henni fyrir en eftir 96 klst. snertitíma.

Viðloðun *L. monocytogenes* og *Pseudomonas* I/II í hreinrækt og í blandaðri rækt á misgróft polyethylene (PE) er sýnd á myndum 24-26. Samanburðarpróf sýna að þegar bakteríurnar eru í hreinrækt festast þær betur við slétta PE ($p < 0,05$) en við grófa PE (mynd 24). Mælingar með ATP-ljósmaeli sem sýndar eru á mynd 25 sýna að eftir 96 klst mælast meiri óhreinindi/bakteríur á grófa PE.

Mynd 26 sýnir festingu baktería í blandaðri rækt sem metin er með þrenns konar æti, PCA sem er almennt næringaræti, MOX sem er sérhæft fyrir *Listeria* bakteríur og CFC sem er sérhæft æti fyrir *Pseudomonas* tegundir. Þar kom í ljós að *Pseudomonas* I/II átti erfiðara ($p < 0,05$) með að festa sig við ómeðhöndlað stál í samanburði við annað yfirborð sem prófað var. Hins vegar festist hún miklu betur en *L. monocytogenes* við glerblásið stál og á slétt PE ($p < 0,05$).

Mikilvægt er að leggja áherslu á að báðar þessar tegundir sem verið var að prófa festust í ríkum mæli á allt yfirborð.



Mynd 27. Festing blöndu af *L. monocytogenes* og *Pseudomonas* I/II við 10°C og 22°C við ómeðhöndlað stál og glerblásið stál eftir mismunandi tíma. Festing metin eftir penslun og talningu á PCA. Þrísýni.

Mynd 27 sýnir áhrif hitastigs á festingu *L. monocytogenes* í blandaðri rækt með *Pseudomonas* I/II. Greinilega komu fram áhrif hitastigs á festingu baktería með allt að 100 sinnum minni festingu ($p < 0,05$) við lægra hitastig (10°C) en áhrif snertitímans voru ekki marktæk ($p > 0,05$) en þau eru mjög greinileg við 22°C ($p < 0,05$).

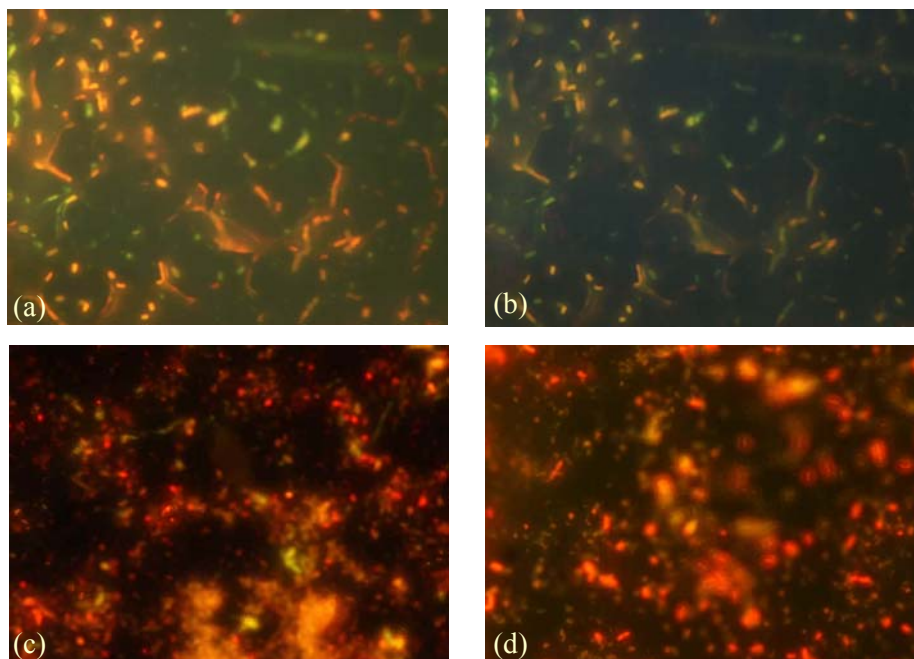
3.3.2.2 Niðurstöður smásjárskoðunar eftir litun með AO

Ekki fengust nógu góðar myndir til að hægt væri að telja bakteríufrumurnar og að mæla yfirborð örveruþekjunnar. Mynd 28 sýnir örveruþekju myndaða af *L. monocytogenes* (a) og *Pseudomonas* I/II (b) og blöndu af þessum tveimur bakteríustofnum.

Meiri vinnu þarf að leggja í þjálfun uppbyggingu á þessu sviði en þessi aðferð er talin mjög góð. Einn galli er þó við þessa aðferð, það getur verið erfitt að greina á milli lifandi og dauðra fruma (Wirtanen o.fl. 2001).

3.3.2.3 Niðurstöður eftir skoðun með rafeindasmásjá

Viðloðun bakteríanna var að síðustu skoðuð í rafeindasmásjá. Með því að skoða örveruþekju í rafeindasmásjá er hægt að fá upplýsingar um byggingu örveruþekjunnar, um fjölsykruhjúpinn og staðsetningu fruma. Þessi aðferð gefur hins vegar ekki þannig niðurstöður að hægt sé að skoða þær og meta tölfræðilega. Það þarf að undirbúa sýnin vel til að vernda frumurnar í sem lífvænlegustu formi. Báðar aðferðir við undirbúning, sem lýst er í kafla 2.2.3.3.1 voru prófaðar og skilaði hvorug leiðin góðum árangri. Þó virtist efnameðferð og þurrkun sem kallast „critical point drying“ gefa betri niðurstöður heldur en frostþurrkun. Sú aðferð er mjög tímafrek og hægt að skoða fá sýni í einu. Myndir 29-32 sýna SEM-myndir af örveruþekju á mismun-

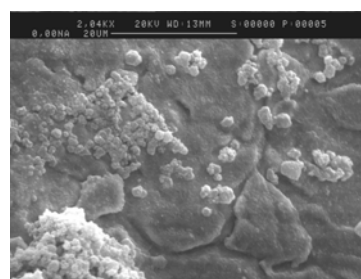
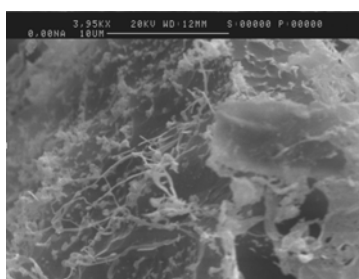
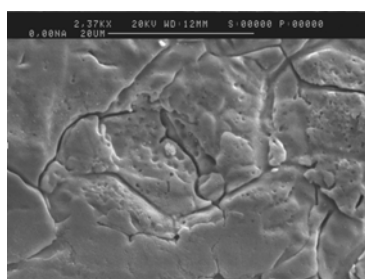


Mynd 28. Myndir af *L. monocytogenes* (a) *Pseudomonas* I/II (b) og blöndu af *Pseudomonas* I/II og *L. monocytogenes* (c) eftir litun með acridine orange. Skoðað í ljósmásjá undir UV-ljósi. Stækkun 1000x.

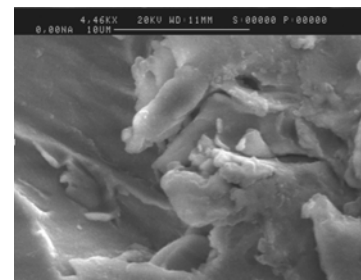
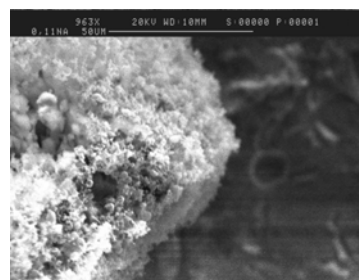
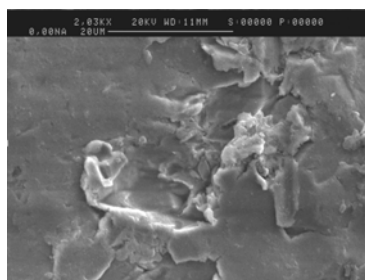
andi yfirborði Myndir 29 og 30 eru eftir að sýnin voru efnameðhöndluð en myndir 31 og 32 teknar eftir að sýni voru fryst fyrir skoðun. Eftir frýstingu á sýni komu fram einhvers konar kúlur á myndunum sem í fyrstu gætu verið metnar sem bakteríur en eru að öllum líkindum ískristallar. Þetta sést skýrt á mynd 32.

3.3.3 Áhrif yfirborðsefna á viðloðun örvera – seinni tilraun

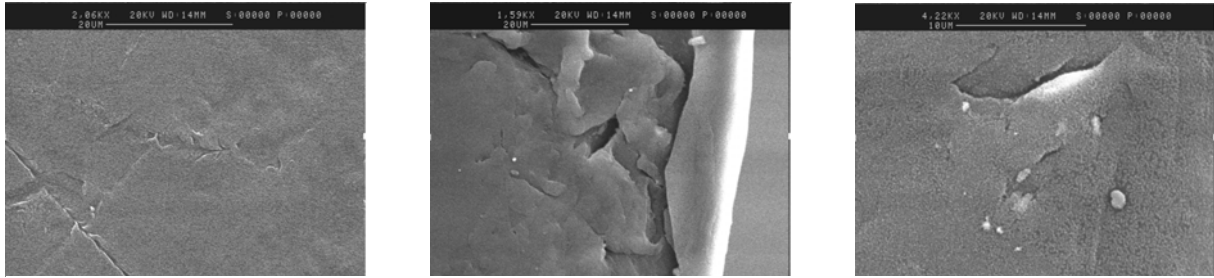
Niðurstöður viðloðunar *L. monocytogenes*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Aeromonas*, *Serratia liquefaciens* og *Shewanella putrefaciens* við mismunandi plasttegundir og glerblásið stál eru sýndar á myndum 33-38 eftir mælingu með hefðbundinni penslun og á mynd 39 eftir mælingu með ATP-ljósmæli.



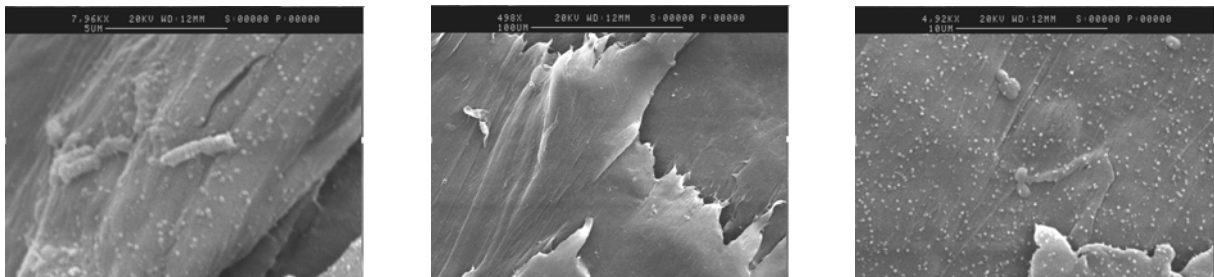
Mynd 29. Örveruþekja á ómeðhöndluðu stáli.



Mynd 30. Örveruþekja á glerblásnu stáli.



Mynd 31. Örveruþekja á sléttum plastsýnum (PE).



Mynd 32. Örveruþekja á grófum plastsýnum (PE).

Þær benda til þess að mismunandi bakteríur festast misvel við mismunandi yfirborð og eins að þær hafa mismikil áhrif á vöxt *L. Monocytogenes*. Þó er greinilegt að allar þessar bakteríur eru vel til þess fallnar að festa sig við það yfirborð sem hér voru prófað. Það styður þá kenningu að nær allar bakteríur hafi getu til að festa sig við yfirborð ef aðstæður leyfa (Wirtanen o.fl. 2000).

Það kom skýrt fram að hvert einstakt yfirborðssýni var mjög frábrugðið öðrum og því hafði það áhrif á festingu baktería og var staðalfrávik á fjölda baktería sem festist við yfirborðið mjög stórt í sumum tilvikum. Lengri snertitími leiddi alltaf til þess að fleiri bakteríur náðu að festa sig við yfirborðið og var sá munur marktækur ($p < 0,05$).

Þegar *L. monocytogenes* var í blandaðri rækt með *P. putida* (mynd 33) þá náði hún yfirtökum í ræktinni og var viðloðunin mest á glerblásið stál og PVC og var sá munur marktækt meiri ($p < 0,05$) en festingin á Volta reimar og PU þó hún hafi samt verið töluverð.

Niðurstöður af blandaðri rækt með *P. Fluorescens* og *L. monocytogenes* (mynd 34) voru að mörgu leyti áhugaverðar þar sem í upphafi eða eftir 24 klst var *P. fluoerescens* sterkari í sambýlinu. Eftir 72 klst virtist *L. monocytogenes* vera með yfirhöndina í ræktinni og en varð síðan aftur undir eftir 120 klst snertitíma. Sérstaklega á þetta við um Voltareimarnar og PVC. Ekki var mikill munur á heildarviðloðun við

mismunandi yfirborð þó hún hafi verið marktækt meiri ($p > 0,05$) á PVC og glerblásna stálið.

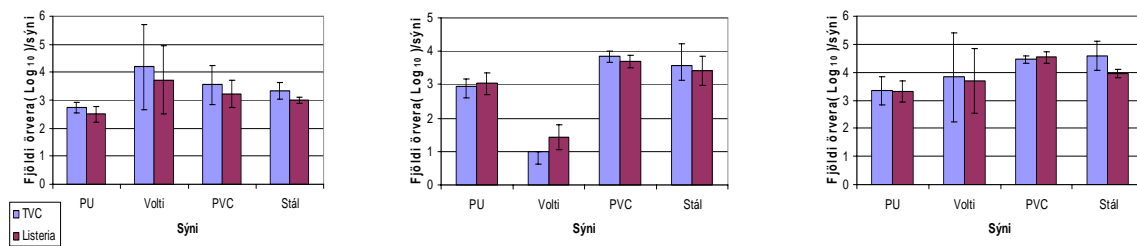
Blönduð rækt af *Aeromonas* og *L. Monocytogenes* (mynd 35) festist betur við PVC og glerblásið stál og minnst við Voltareimar og var sá munur marktækur ($p < 0,05$). *L. Monocytogenes* virtist ná yfirhöndinni í sambýlinu.

Greinilegt var að *L. monocytogenes* var ekki sterk í sambýli við *Serratia liquefaciens* (mynd 36). Heildarviðloðun af þessari rækt var þó mun meiri eða 2-3 log meiri en þeirra sem á undan er getið. Í þessu tilviki var ekki hægt að sýna fram á marktækan mun ($p > 0,05$) á viðloðun við mismunandi yfirborð.

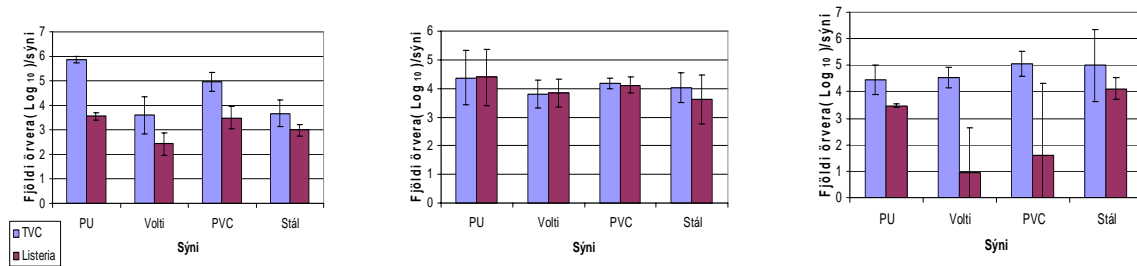
L. monocytogenes virtist ná yfirhöndinni í rækt með *Shewanella putrefaciens* sem er þekkt skemmdarbaktería í fiski (mynd 37). Heildarviðloðun var mest við stál eftir 120 klst en ekki mikill munur ef aðeins er litið á festingu *L. monocytogenes* ($p > 0,05$).

Að lokum var öllum bakteríunum blandað saman í einn kokteil og þá festust þær enn betur við yfirborðin (mynd 38). Munar þar líklega mest um *Serratia liquefaciens* en eins og áður kom fram náði sú blanda mestri heildarviðloðun á fast yfirborð. *L. monocytogenes* líður ágætlega í þessu fjölbreytta sambýli og nær að festa sig á allt yfirborð og þá mest á PVC og stál.

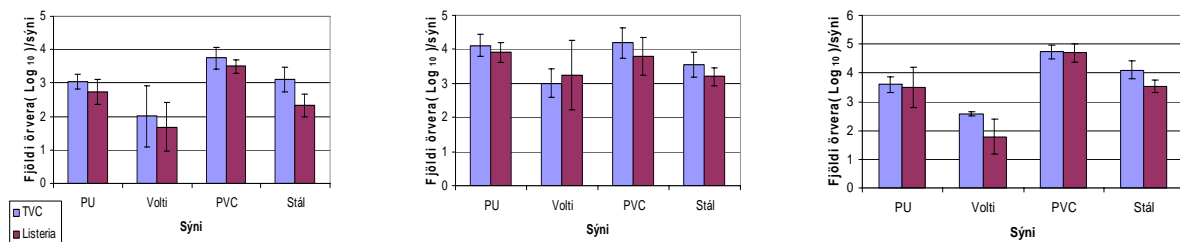
Ef allar niðurstöðurnar eru teknar saman þá var viðloðun við Voltareimar alltaf marktækt minni ($p < 0,05$) en við hin efnin og mest við PVC. Ekki er þó hægt að greina marktækan



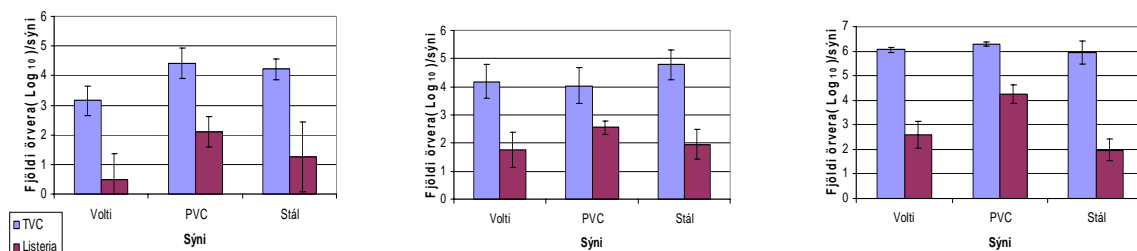
Mynd 33. Viðloðun *L. monocytogenes* á mismunandi yfirborð (polyurethane, voltareimar, polyvinyl chloride og glerblásið stál) í sambýli við *P. putida*. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24, 72 og 120 klst



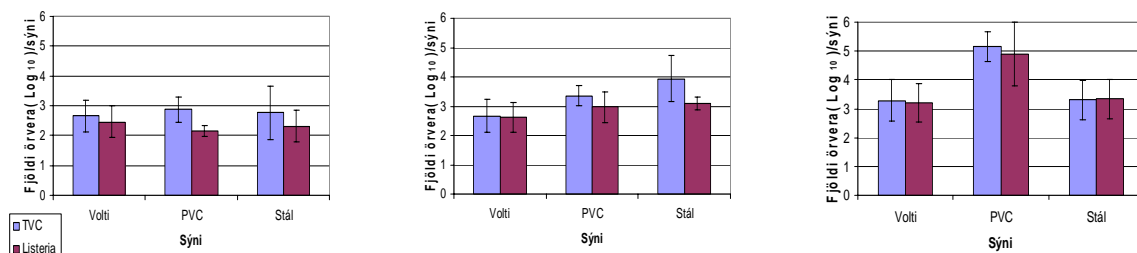
Mynd 34. Viðloðun *L. monocytogenes* á mismunandi yfirborð (polyurethane, voltareimar, polyvinyl chloride og glerblásið stál) í sambýli við *P. fluorescens*. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24, 72 og 120 klst



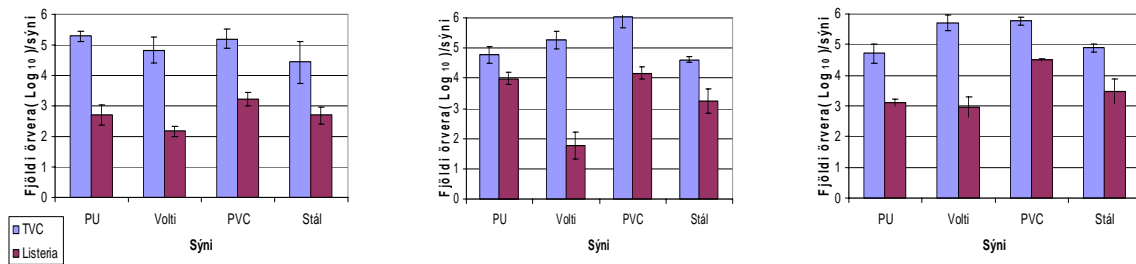
Mynd 35. Viðloðun *L. monocytogenes* á mismunandi yfirborð (polyurethane, voltareimar, polyvinyl chloride og glerblásið stál) í sambýli við *Aeromonas* spp. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24, 72 og 120 klst.



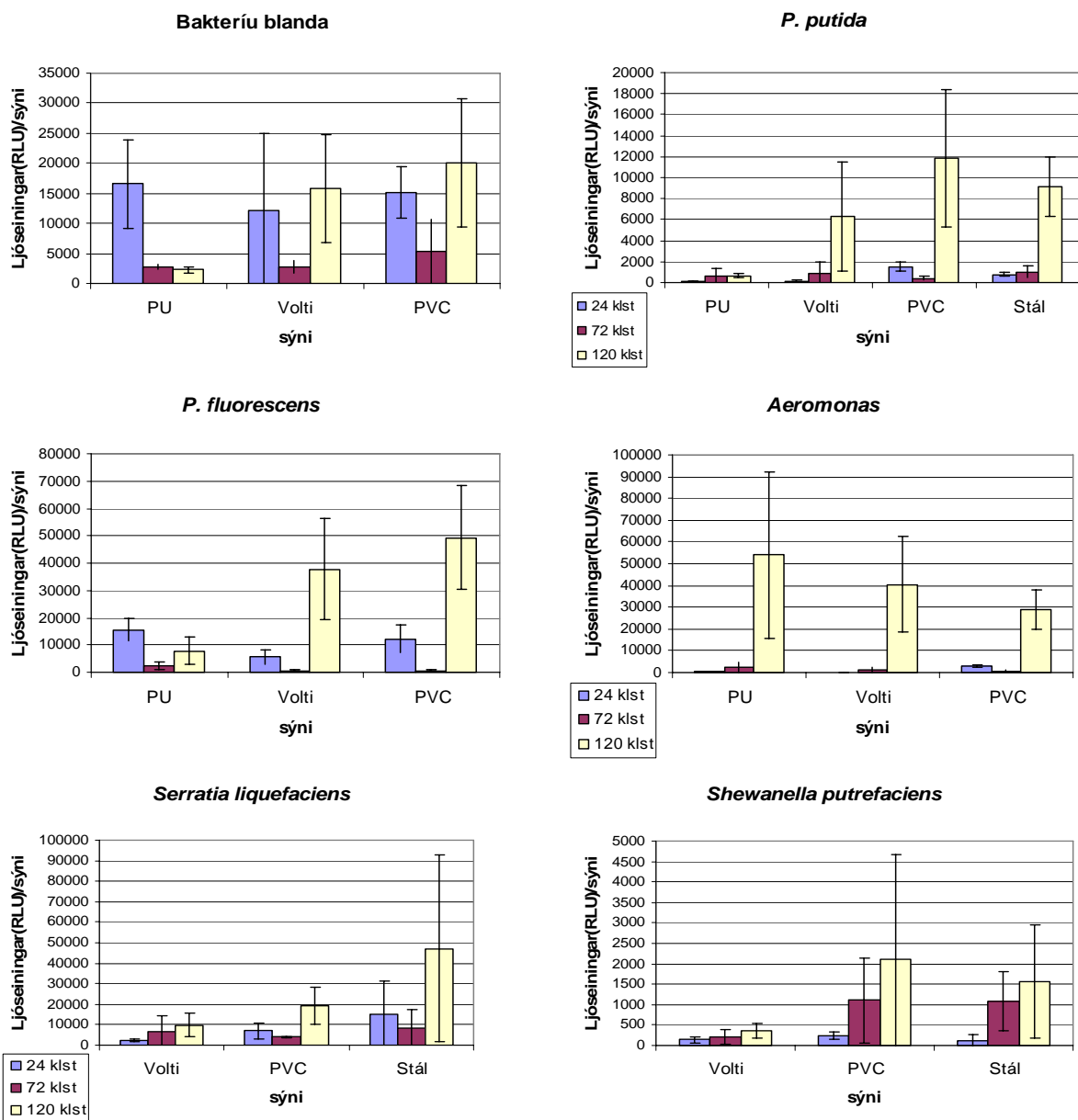
Mynd 36. Viðloðun *L. monocytogenes* á mismunandi yfirborð (polyurethane, voltareimar, polyvinyl chloride og glerblásið stál) í sambýli við *Serratia liquefaciens*. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24, 72 og 120 klst



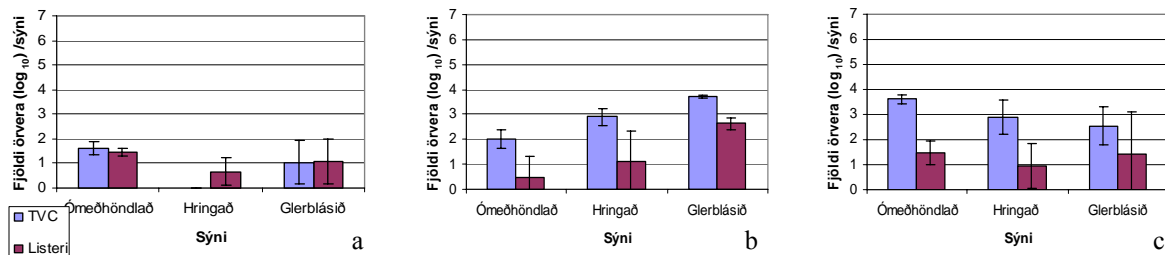
Mynd 37. Viðloðun *L. monocytogenes* á mismunandi yfirborð (polyurethane, voltareimar, polyvinyl chloride og glerblásið stál) í sambýli við *Shewanella putrefaciens*. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24, 72 og 120 klst



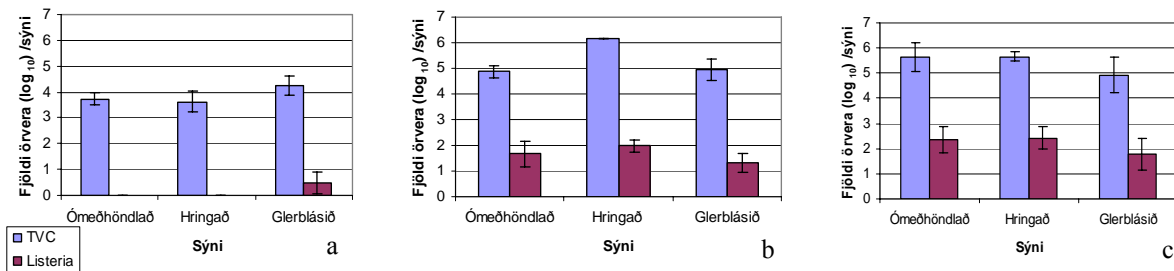
Mynd 38. Viðloðun *L. monocytogenes* á mismunandi yfirborð (polyurethane, voltareimar, polyvinyl chloride og glerblásið stál) í blandaðri rækt með *P. putida*, *P. fluorescens*, *Aeromonas* spp., *Serratia liquefaciens* og *Shewanella putrefaciens*. Þrisýni Sýni tekin eftir 24, 72 og 120 klst.



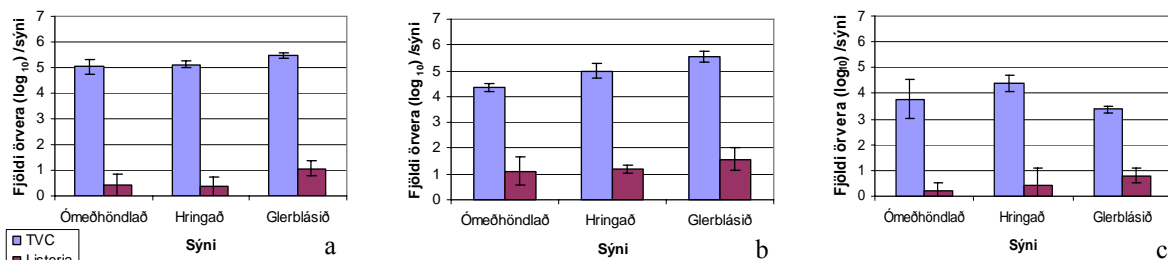
Mynd 39. Viðloðun *L. monocytogenes* á mismunandi yfirborð (polyurethane, voltareimar, polyvinyl chloride og glerblásið stál) í blandaðri rækt með *P. putida*, *P. fluorescens*, *Aeromonas* spp., *Serratia liquefaciens* og *Shewanella putrefaciens*. ATP-mæling í þrisýni.



Mynd 40. Viðloðun *L. monocytogenes* á ryðfrítt stál (AL304-2B) (ómeðhöndlað, slípað og glerblásið) í bland-aðri rækt með *Aeromonas* spp. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24 (a) 72(b) og 120(c) klst.



Mynd 41. Viðloðun *L. monocytogenes* á ryðfrítt stál (AL304-2B) (ómeðhöndlað, slípað og glerblásið) í blandaðri rækt með *Serratia liquefaciens*. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24 (a) 72(b) og 120(c) klst.



Mynd 42. Viðloðun *L. monocytogenes* á ryðfrítt stál (AL304-2B) (ómeðhöndlað, slípað og glerblásið) í blandaðri rækt með *Pseudomonas fluorescens*. Þrísýni. Sýni tekin eftir 24 (a) 72(b) og 120(c) klst

mun á festingu við glerblásið stál í samanburði við festingu við PVC.

Ef litið er á einstakar bakteríublöndur þá hafði blanda með *Serratia liquefaciens* mestu heildarviðloðunina og síðan blanda með öllum stofnunum, þá blanda með *P. fluorescens*. Ef aðeins er litið á festingu *L. monocytogenes* þá virtist sem *P. putida* hefði mestu áhrifin á hana, þá *P. fluorescens*, síðan blanda af öllum bakteríunum. Minnstu áhrifin voru í blöndu með *Aeromonas* eða *Serratia liquefaciens*.

Niðurstöður ATP-mælinga eru sýndar á mynd 39. Ekki var þessi mæliaðferð mjög góð þegar verið var að skoða viðloðun baktería þar sem örverufjöldi minni en 1000 cfu/einingu greinist varla með ATP mælingunni.

Mjög mikill munur var á viðloðun óhreininda eftir yfirborði eins og staðalfrávikidi á mældum ljóseiningum gefur til kynna. Munur á festingu eftir snertitíma er þó greinilegur. Þessar

mælingar gefa einnig til kynna að blönduð rækt með *L. monocytogenes* og *Shewanella putrefaciens* festist minna samanborið við hinar blöndurnar og er munurinn allt að tuttugufaldur. Mjög erfitt er að draga viðtækar ályktanir af þessum niðurstöðum enda fékkst ekki marktækur munur ($p > 0,05$) á festingu við mismunandi efni. En munurinn var marktækur ($p < 0,05$) ef litið er á snertitímann með meiri festingu eftir 120 klst. Meginniðurstöðurnar eru þær að í öllum tilfellum nema í sambýli með *P. fluorescens* festist *L. monocytogenes* best við PVC og í flestum tilvikum minnst við Voltareimar. Niðurstöður viðloðunar við mismunandi meðhöndlað stál eru sýndar á myndum 40-42. Stálið var AISI 304:2B ómeðhöndlað, slípað eða glerblásið. Ra gildin voru 0,16-0,17 μ fyrir ómeðhöndlað stál, 0,16-0,22 fyrir slípað stál og 0,7-0,8 μ , fyrir glerblásið stál. Enginn munur ($p > 0,05$) var á

heildarviðloðun á mismunandi stál, þegar horft er á hverja bakteríu fyrir sig, þó svo að mikill munur væri á grófleika. Viðloðun blandaðra rækta með *P. fluorescens* og *Serratia liquefaciens* og *L. monocytogenes* er mikil eða 10^5 - 10^6 cfu/sýni og sýna þessar blöndur því mikla tilhneigingu til að mynda örveruþekju á ryðfríu stáli. Blönduð rækt með *Aeromonas* hafði minnstu heildarviðloðunina eða 10^2 - 10^3 cfu/sýni. Enginn munur var síðan á áhrifum mismunandi baktería á viðloðun *L. monocytogenes* í þessum blönduðu ræktum ($p>0.05$).

3.4 Áhrif sótthreinsiefna á bakteríur

3.4.1 Bakteríur í lausn

Tafla 13 sýnir minnsta styrk (MIC) sótt-hreinsiefna sem hindra vöxt mismunandi baktería eftir 19-24 klst snertitíma og tafla 14 eftir 65-75 klst snertitíma. Af einhverjum ástæðum virkaði þessi aðferð ekki vel þegar verið var að skoða áhrif hefðbundins klórs (F) en ef klór-blandan innihélt yfirborðsvirk efni eins og efni E og G þá var hægt að mæla MIC fyrir þau efni. Þegar hefðbundinni klórlausn var bætt í próflausnina þá varð hún skýjuð, en það leiddi til þess að aflestur varð mjög hár miðað við blank og gat því mistúlkast sem vöxtur. Í þeim tilfellum hefði verið æskilegt að rækta uppúr holu-

bakkanum til að staðfesta vöxt baktería. Það var ekki gert í þessari tilraun.

Þessar niðurstöður benda greinilega til að ættkvíslin *Serratia* hefur myndað ákveðið þol gegn 5 af þeim 7 efnum sem voru prófuð. Það tók samt um 70 klst þar til vöxtur kom fram í ráðlögðum styrk. Þessar upplýsingar geta að hluta til skýrt það hversu algengt er að einangra hana úr fiskivinnluumhverfi þrátt fyrir aukna áherslu á þrif.

Öll efnin virkuðu vel á *L. monocytogenes* og var MIC langt fyrir neðan ráðlagðan styrk nema fyrir efni E en þá kom fram vöxtur þegar ráðlagður styrkur hafði verið þynntur til helminga.

Það sama gildi um *P. putida* og *P. fluorescens*. Athyglisvert var að sjá að flest efnin höfðu hindrandi áhrif á vöxt *Pseudomonas* tegunda en mikið hefur verið fjallið um áunnið þol þessarar ættkvíslar gegn mörgum sótt-hreinsiefnum.

Taka skal fram að í þessu prófi var verið að prófa áhrif efnanna á eina bakteríutegund í einu og í lausn en sú staða er ekki fyrir hendi úti í vinnsluumhverfinu þar sem margar tegundir lifa saman og eru oftast fastar við eitthvert yfirborð og verja hver aðra fyrir utanað komandi áhrifum eins og t.d. sótthreinsiefnum.

Tafla 13. MIC fyrir mismunandi bakteríur og mismunandi sótthreinsiefni e. 19-24 klst snertitíma. Gildin eru meðaltal minnst 3 mælinga. Ráðlagður styrkur af hverju efni er gefinn upp í sviga.

Bakteríustofn	A (m.a. FAS*) (tilbúin lausn)	B (FAS) (3%)	C (FAS) (1%)	D (FAS) (1%)	E (Klórefni) (1%)	F (Klórefni) (200 ppm)	G (Klórefni) (5%)	H (þvottaefni) (3%)
<i>L. monocytogenes</i> - rækja	-	-	0.004	0.0156	0.25	Virkaði ekki	0.078	0.012
<i>L. monocytogenes</i> - lax	-	-	-	0.0156	0.5	Virkaði ekki	0.078	0.047
<i>Pseudomonas putida</i>	-	0.047	0.007	-	0.5	Virkaði ekki	1.25	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	0.5	Virkaði ekki	1.25	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	0.004	-	-	1(24klst)	-	-	-	1.5
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	-	-	-	Virkaði ekki	0.625	-
<i>Aeromonas</i>	-	-	-	0.125	-	Virkaði ekki	1.25	1.5
<i>Serratia</i> - H-04-187-2-1	-	-	-	0.5	-	-	-	0.375
<i>Serratia</i> - H-04-195-6-3	-	-	-	0.25	-	-	-	0.75
<i>Serratia</i> - H-04-192-5-3	-	-	-	-	-	-	-	3 (22 klst)
<i>Serratia</i> - H-04-198-8-3	-	-	-	0.5	-	-	-	0.375
<i>Pseudomonas</i> - H-04-184-1-1	-	-	-	0.5	-	-	-	1.5

* FAS- fjörgilt ammóníumsamband.

Tafla 14. MIC fyrir mismunandi bakteríur og mismunandi sóttreinsiefni eftir 65-75 klst snertitíma. Gildin eru meðaltal minnst 3 mælinga. Ráðlagður styrkur af hverju efni er gefinn upp í sviga.

Bakteríustofn	A (m.a. FAS*) (tilbúin lausn)	B (FAS) (3%)	C (FAS) (1%)	D (FAS) (1%)	E (Klórefni) (1%)	F (Klórefni) (200 ppm)	G (Klórefni) (5%)	H (þvottaefni) (3%)
<i>L. monocytogenes</i> - rækja	-	-	0.004	0.0156	0.5	virkaði ekki	0.156	0.047
<i>L. monocytogenes</i> - lax	-	0.047		0.0156	0.5	virkaði ekki	0.156	0.047
<i>Pseudomonas putida</i>		0.188	0.0625		1 (47 klst)	virkaði ekki	2.5 (48klst)	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		0.188	0.0625		0.5	virkaði ekki	1.25(48klst)	
<i>Serratia liquefaciens</i>	0.0312	3 (68 klst)	1 (65 klst)	1 (71 klst)				1.5
<i>Shewanella putrefaciens</i>					1 (47 klst)	virkaði ekki	2.5 (48 klst)	
<i>Aeromonas</i>				0.125	0.5	virkaði ekki	2.5 (48 klst)	1.5
<i>Serratia</i> - H-04-187-2-1				0.5				0.375
<i>Serratia</i> - H-04-195-6-3				1(71 klst)				0.75
<i>Serratia</i> - H-04-192-5-3				1(71 klst)				3 (71 klst)
<i>Serratia</i> - H-04-198-8-3				0.5				1.5
<i>Pseudomonas</i> - H-04-184-1-1				0.5				1.5

* FAS- fjörgilt ammóníusamband

Efni H var eina efnið sem er venjulega notað sem þvottaefni en sýndi samt að það hefur hindrandi áhrif á vöxt flestra bakteríanna sem voru prófaðar nema í einu tilfelli þar sem *Serratia* náði að vaxa í ráðlögðum styrk eftir 71 klst.

3.4.2 Bakteríur fastar við yfirborð

3.4.2.1 Virkni hreinsiefna metin með hefðbundinni penslun

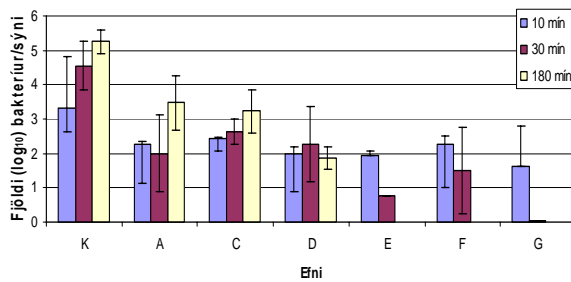
Myndir 43-46 sýna niðurstöður tilrauna þegar áhrif hreinsiefna á *P. putida* og *L. monocytogenes* eru skoðuð þegar þær eru fastar við yfirborð. Annars vegar á poly vinyl chloride (PVC) og hins vegar á ryðfrítt glerblásið stál (AISI304:2B). Efni A, C og D eru fjörgild ammóníusambönd og voru áhrif þeirra prófuð eftir þrjú mismunandi tíma en E, F og G eru klórefni og voru prófuð við tvo mismunandi tíma. Fjörgild ammóníusambönd sem eru yfirborðsvirk halda virkni lengur en oxandi efni eins og t.d. klórefni. Í öllum tilvikum var prófaður sá styrkur sem mælt er með að nota af framleiðendum eða seljendum.

Mynd 43 sýnir áhrif hreinsiefna á vöxt *P. putida* á PVC yfirborði. Klórefnið G sem inniheldur einnig KOH og er því skilgreint sem

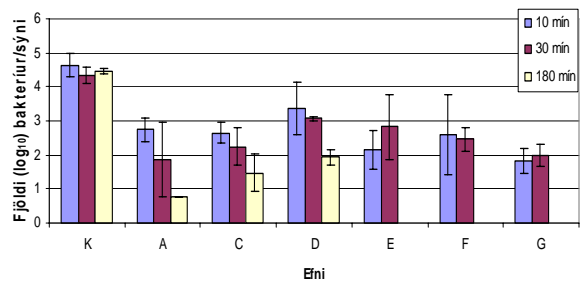
hreinsiefni virkaði best og þá voru áhrifin meiri eftir lengri snertitíma (30 mín). Ekki greindist marktækur munur á áhrifum sem efnin höfðu á vöxt baktería eftir 10 mín. snertitíma. Efni F sem er hefðbundinn klór hafði þó greinilega minnstu virknina af klórefnum sem voru prófuð og munar þar líklega mestu um yfirborðsvirk efni sem E og G innihalda. Efni A, C og D sem öll eru yfirborðsvirk og innihalda fjörgild ammóníusambönd náðu greinilega ekki að koma í veg fyrir vöxt *P. putida* og höfðu marktækt minni áhrif á vöxt baktería í samanburði við klórefnin ($p < 0,05$).

Athyglisvert er að skoða áhrif A og C með tilliti til snertitímans en það virtist sem bakteríur næðu að fjölga sér þrátt fyrir nærveru sótt-hreinsiefna. Það bendir til þess að styrkur efnanna sem var notaður var ekki nægjanlegur en einnig gæti hluti skýringarinnar verið sá að þvottur sýna með þeirri skolaðferð sem notuð var hér hafi skilið eftir leifar af rækjuseyðinu og þær nýst sem næring fyrir bakteríurnar.

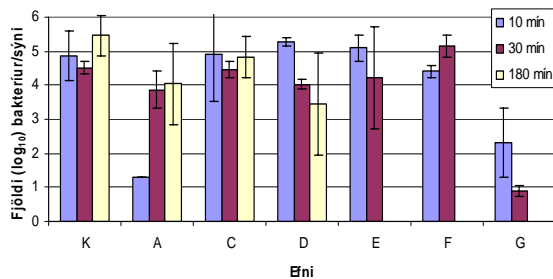
Mynd 44 sýnir áhrif hreinsiefna á vöxt *L. monocytogenes* sem er föst við PVC-yfirborð og þar kemur greinilega fram að þessi baktería er viðkvæmari fyrir efnunum en *P. putida* sem var lýst hér að framan. Enn er það efni G sem virðist hafa mestu áhrifin af þeim klórefnum



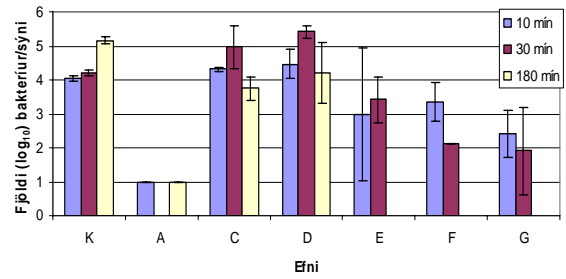
Mynd 43. Áhrif hreinsiefna á *P. putida* á föstu yfirborði úr PVC. A,C,D eru fjörgild ammóníum-sambönd og E,F,G eru klórefni. K er kontrol.



Mynd 44. Áhrif hreinsiefna á *L. monocytogenes* á föstu yfirborði úr PVC. A,C,D eru fjörgild ammóníumsambönd og E,F,G eru klórefni. K er kontrol.



Mynd 45. Áhrif hreinsiefna á *P. putida* á föstu yfirborði úr ryðfríu stáli. A,C,D eru fjörgild ammóníumsambönd og E,F,G eru klórefni. K er kontrol.



Mynd 46. Áhrif hreinsiefna á *L. monocytogenes* á föstu yfirborði úr ryðfríu stáli. A,C,D eru fjörgild ammóníumsambönd og E,F,G eru klórefni. K er kontrol.

sem prófuð voru en einnig virðast áhrif efnis A vera töluverð og þau aukast með tímanum öfugt við það sem sást þegar áhrifin á vöxt *P. putida* voru skoðuð. Efni D sýndi sýnilega minnstu áhrifin á vöxt *L. monocytogenes*. Munur á áhrifum þessara hreinsiefna á vöxt *L. monocytogenes* við PVC var þó í engu tilfelli tölfræðilega marktækur ($p > 0,05$).

Myndir 45 og 46 sýna áhrif sömu hreinsiefna á *P. putida* og *L. monocytogenes* sem fastar eru við stályfirborð. Þar kemur einnig í ljós að efni G hefur mest áhrif á vöxt bakteríanna og er sá munur marktækur ($p < 0,05$). Eftir 10 mínútna snertitíma hefur efni A sýnileg mestu áhrifin ($p < 0,05$), bæði á vöxt *P. putida* og *L. monocytogenes* en þau áhrif hverfa með lengri snertitíma þegar vöxtur *P. putida* er skoðaður. Efni C og D hafa nánast engin áhrif á vöxt *L. monocytogenes* ef borið er saman við samanburðarsýnin (K). Það sama gildir um öll efnin nema G ef litið er á vöxt *P. putida*.

Greinilegt er í þessari tilraun að áhrif hreinsiefna eru minni á bakteríur sem eru fastar við ryðfrítt glerblásið stál í samanburði við

PVC. Mikilvægt er að skoða þetta í frekari rannsóknunum. Þessi aðferð sem hér var prófuð til að meta áhrif hreinsiefna á bakteríur sem eru fastar við yfirborð gefur allgóðar vísbendingar um áhrif efnanna og einnig hvort sá styrkur sem var prófaður sé nægjanlegur til að halda vexti bakteríanna niðri í ásættanlegu magni. Í þessari tilraun koma greinilega fram vísbendingar um að ráðlagður styrkur þessara efna er ekki nægjanlegur og þarf því að endurskoða hann í ljósi þessara niðurstaðna.

3.4.2.2 Malthus aðferð

3.4.2.2.1 Sérhæfni og staðalkúrfa fyrir Malthus aðferðirnar:

Mynd 47 sýnir staðalkúrfur sem fengust fyrir *Pseudomonas* tegundir og *L. monocytogenes*. Eftirfarandi jafna var notuð til að meta fjölda *L. monocytogenes* ($R^2 = 0,9953$):

$$\text{Log fjöldi } Listeria/ml = (-0,2543 * DT) + (10,83 + \log(\text{þynningarfaktor}))$$

Lágmarks gildi (detection limit=DT) fyrir fljótandi sýni er 10 frumur/ml (það er DT um

42,6 klst) vegna þess að 0,1 ml sýni er sáð. Með þynntum sýnum verður einnig að taka tillit til viðbótarþynningar sem á sér stað. Hins vegar þegar sýnið er stálplata, reiknast fjöldi *Listeria* fruma fyrir hverja plötu (án þynningarfaktors). Eftirfarandi jafna var notuð til að meta fjölda *P. putida* ($R^2 = 0,9949$):

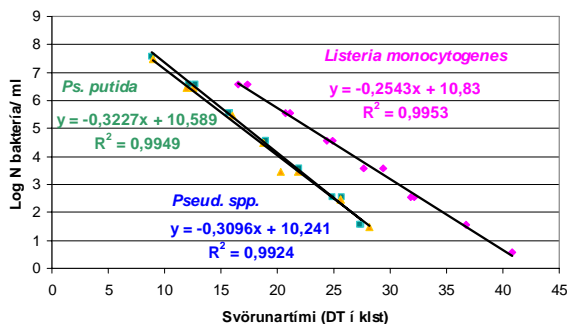
$$\text{Log fjöldi } Ps. \text{ putida/ml} = (-0,3227 \cdot \text{DT}) + (10,589 + \log(\text{þynningarfaktor}))$$

Með þynntum sýnum verður að taka tillit til viðbótar þynningar. Lágmarks DT í þessu tilviki er um 32,8 klst. Hins vegar þegar sýnið er stálplata, reiknast fjöldi *P. putida* fruma fyrir hverja plötu (án þynningarfaktors). Þegar blandaðar voru nokkrar *Pseudomonas* tegundir fékkst svipuð kúrfa og fyrir *P. putida* hreinrækt.

Sérhæfni Malthus-ætanna var sannreind með tilliti til *Pseudomonas* og *Listeria* tegunda. Svörun fékkst ekki þegar *Pseudomonas* ræktir voru sáðar út í *Listeria* sellur og sömuleiðis fékkst ekki svörun þegar *L. monocytogenes* var sáð út í CFC-SPYE sellur eða sérhæfðar *Pseudomonas* sellur. Aftur á móti var mögulegt að magngreina *L. monocytogenes* eða *Pseudomonas* ræktir í blönduðum sýnum af þekktum örverufjölda. Sama svar fékkst og þegar viðkomandi hreinræktum var sáð. Þetta gerir okkur kleift að meta fjölda *L. monocytogenes* eða *Pseudomonas* við rannsóknir á örveruþekju þar sem mismunandi örverur til staðar.

3.4.2.2 Virkni hreinsiefna metin með Malthus tækni

Myndir 48 og 49 sýna niðurstöður um áhrif hreinsiefna á *P. putida* (mynd 48) og *L. monocytogenes* (mynd 49) metnar með Malthus. Greinilega kemur fram að því lengur sem hreinsiefnin fæ að virka á bakteríurnar því meiri

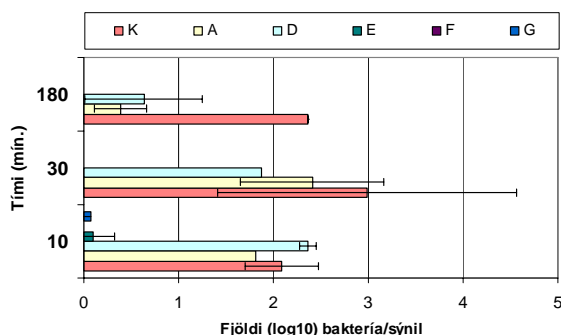


Mynd 47. Línulegt samband fjölda baktería og svörunartíma (DT).

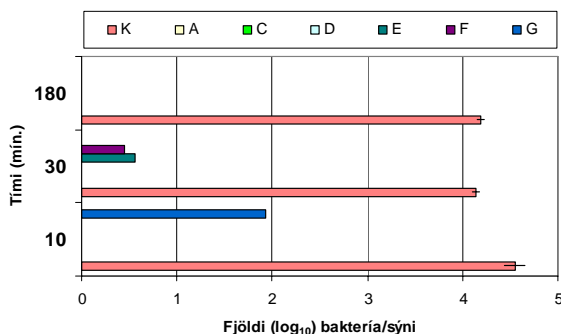
áhrif hafa þau. Efnin sem innihéldu fjörgild ammóníusambönd (A,C,D) virkuðu greinilega vel á *L. monocytogenes* en ekki á *P. putida*. Efnin sem innihéldu klór (E, F, G) virkuðu vel á báðar bakteríurnar. Bent skal á að efni C var ekki prófað á *P. putida* og þess vegna engar niðurstöður sýndar. Vöxtur kom fram eftir mjög langan DT tíma eftir meðhöndlun á *P. putida* með A og D í 180 mín. og það sama á við um E, F og G og virðist því sem að frumurnar laskist aðeins en drepist ekki og ná sér þá strik ef tími og aðstæður leyfa.

4. UMRÆÐUR

Þetta verkefni skiptist í þrjá hluta, þar sem þrífavæn hönnun á vinnslubúnaði var skoðuð, viðloðun baktería við mismunandi yfirborð þar sem áhrif ryðfrís stáls, plastefna og bakteríu- tegunda á viðloðun *L. monocytogenes* var skoðuð. Þá voru einnig athuguð áhrif nokkurra hreinsiefna á valdar bakteríu- tegundir. Í upphafi verkefnisins var úttekt á þrífavænni hönnun á vinnslubúnaði í fiskvinnslu og rækjuvinnslu



Mynd 48. Áhrif hreinsiefna á *P. putida* sem er föst á stályfirborð



Mynd 49. Áhrif hreinsiefna á *L. monocytogenes* sem er föst á stályfirborð

skoðuð í samvinnu við framleiðendur og hönnuði. Í ljós kom að framleiðendur höfðu ekki aðgang að upplýsingum um hvaða efni eða yfirborðsáferð þeir ættu að velja í búnaðinn. Því var farið í að rannsaka viðloðun ýmissa örveruhópa á algengustu yfirborðsefnin sem eru í vinnslubúnaði í dag. Til að ná í bakteríutebundur sem lifa í raunverulegu vinnsluumhverfi var örveruþekja látin myndast á sýnplötum úr ryðfríu stáli út í fiskvinnslu og rækjuvinnslu og örverur á þeim einangraðar og þær notaðar við rannsóknir á viðloðun við yfirborðsefnin. Þar sem ýmislegt í fyrri hluta þessa verkefnis benti til þess að hreinsiefnin sem verið var að nota virkuðu ekki sem skyldi voru athuguð áhrif nokkurra algengra hreinsiefna á fyrrnefndar bakteríur. Hér á eftir verður fjallað um helstu niðurstöður hvers verkhluta fyrir sig.

4.1 Úttekt á hönnun á vinnslubúnað

Mikilvægi þrífavænnar hönnunar er óumdeilt. Þó svo að almennum hreinlætisreglum sé fylgt varðandi þrif og húsnæði verður aldrei hægt að ná stjórn á mengun af völdum örvera nema að þeim svæðum þar sem óhreinindi geti safnast fyrir verði fækkað eða eytt eða a.m.k. þau gerð aðgengileg fyrir þrif. Þá er átt við staði eins og hvöss horn, dauða enda, hol rör (profilar), gróf samskeyti og því um líkt. Þessi tilraun leiddi í ljós að framleiðendur vinnslubúnaðar hafa ekki aðgang að upplýsingum um hvaða efni eða yfirborðsáferð væri best að velja í búnaðinn til að gera hann auðhreinanslegri. En val á yfirborðsefnum eins og plast eða stál og meðhöndlun, t.d. slípun, pússun og efnameðhöndlun eru mjög mikilvægt atriði sem þarf að hafa í huga við hönnun á tækjum. Algengasta stályfirborðið er ýmist glerblásið eða slípað. Glerblásið stál er yfirleitt talið vera á mörkunum með að teljast gott m.t.t. hreinlætis vegna þess hve gróft yfirborðið er en Ra gildi á glerblásnu sýnunum sem hér voru skoðuð voru samt innan marka sem EHEDG gefur upp og er $0,8 \mu\text{m}$ (Hauser o.fl., 2004). Ef illa gengur að þrifa getur það leitt til þess að leifar af afurðum sitja eftir á tækjum og að örverur geta fest sig við yfirborð og myndað örveruþekju. Meginályktunin sem hægt er að draga af þessum verkþætti er að hönnuðir og framleiðendur vinnslubúnaðar fyrir matvælavinnslu þurfa að koma sér upp ákveðnu verklagi þar sem kröfur til hreinlætis eru hafðar í fyrirrúmi og að hægt sé að taka út og meta þessa þætti. Það verklag, sem komið er

á, verður að hafa augljós viðmið þannig að auðvelt verði að greina frá þá þætti sem þarf að breyta.

4.2 Rannsóknir á örveruþekju

4.2.1 Myndun örveruþekju í rækju- og fiskvinnslu

Niðurstöður þessa verkþáttar leiddi í ljós að örveruþekjan sem myndaðist á yfirborði stálsýna í rækju- og fiskvinnslu samanstóð aðallega af gram-neikvæðum bakteríum. Örverufjöldinn sem greindist gaf einnig til kynna að ekki væri um að ræða þykka örveruþekju sem styður þá kenningu að sjaldnast sé hægt að finna hana í opnum kerfum matvælavinnslu. Þykk örveruþekja er venjulega með 10^8 cfu/cm^2 (Holah & Timperley, 1999b) en í þessari rannsókn greindist hún mest 10^5 cfu/cm^2 . Hærrí örverufjöldi á sýnplötum úr fiskvinnsluumhverfi í samanburði við rækjuvinnslu bendir til þess að þrifaáðferðir þar hafi ekki verið eins árangursríkar. Ef þrifaáðferðir eru ekki góðar og umhverfisáðstæður hagstæðar getur örveruþekja með *Listeria* bakteríum myndast á mismunandi yfirborðsflötum (Beresford o.fl., 2001). Á þessum sýnplötum greindist herra hlutfall af s.k. skemmdarbakteríum og iðragerlum ef borið er saman við fyrri úttektir í fiskvinnslu og rækjuvinnslu (Birna Guðbjörnsdóttir & Hjörleifur Einarsson, 1998b), þar sem herra hlutfall greindist af *Moraxella/Acinetobacter* og *Flavobacterium/ Cytophaga*. Þessar tegundir eru ekki taldar til sérstakra skemmdarbaktería. Coryneforms bakteríur komu sterklega fram í báðum þessum rannsóknum. Athyglisvert var að af heildargerlafjölda greindist lægra hlutfall af H_2S -myndandi bakteríum á sýnplötum teknum í fiskvinnslu í samanburði við rækjuvinnslu. Það gæti stafað af meiri samkeppni við aðrar bakteríur í fiskvinnslunni þar sem heildarfjöldi var mikilu hærrí á þeim stálsýnum. Þegar heimildir eru skoðaðar er ekki hægt að finna niðurstöður til að bera saman örverusamsetningu í fiskvinnslu og rækjuvinnslu. Ein grein (Bagge-Ravn o.fl., 2003) birtir þó örverusamsetningu úr vinnsluumhverfi reykt lax, úr síldarvinnslu og kaviarvinnslu. Töluverður munur er á örverusamsetningu milli mismunandi vinnsla en þó er það sameiginlegt að *Pseudomonas* tegundir og iðragerlar greinast í öllum þessum vinnslum eins og í þessari rannsókn. Af *Pseudomonas*-stofnunum sem einangruðust í þessu verkefni

voru *P. putida* og *P. fluorescens* algengustu tegundirnar. Þær eru taldar til mikilvægra skemmdarvalda í ferskum og kældum fiski (Gram & Huss, 1996).

Stærsti hópur iðragerlanna var *Serratia liquefaciens* sem er mjög útbreiddur í náttúrulegu umhverfi og eru oft notaður sem bendiörvera við mat á árangri þrifa. Greinileg er að þær þrifa- og sótthreinsiaðferðir sem notaðar eru ná ekki að halda Gram-neikvæðu bakteríum innan viðunandi marka. Þekkt er að *Pseudomonas*-tegundir hafa þol gegn fjörgildum ammóníum-samböndum en það er mjög algengt að þau efni séu notuð við sótthreinsun í matvælavinnslum á Íslandi.

Engin *Listeria* greindist af stálsýnum. Athyglisvert var að sjá að á stálsýnum sem komið var fyrir á suðusvæði rækjuvinnslunnar greindust gersveppir, en á þessu svæði er mikil gufa og rakamyndun og nær þetta herbergi aldrei að þorna. Í rannsókn Bagge-Ravn o.fl. (2003) kom í ljós að gersveppir voru áberandi í síldarvinnslu og þyrfti því að taka tilliti til þess þegar verið er að skipuleggja þrif. Miðað við niðurstöður þessa verkefnis gæti verið skynsamlegt fyrir rækjuiðnaðinn að gera slíkt hið sama. Í þessu verkefni tókst ekki að skoða samsetningu örveruflórunnar í náttúrulegum sýnum með sameindafræðilegum aðferðum, þar sem DNA tapaðist við einangrun. T-RFLP aðferðin er hins vegar ennþá í fullri þróun á Rf og er verið að nota hana í öðrum verkefnum.

4.2.2 Tilraunir með viðloðun örvera á yfirborð

4.2.2.1 Aðferðir

Til að byrja með voru 5 aðferðir við að mæla örverur í örveruþekju prófaðar. Tvær þeirra byggðust á notkun smásjár og gáfu þær niðurstöður aðeins vísbendingu um byggingu örveruþekju en ekki tölulegar upplýsingar. Ræktun á agarskálum eftir hefðbundna penslun og ATP-ljós-mæling gáfu mestu upplýsingarnar. Undirbúningur sýna fyrir skoðun í rafeindasmásjá er flókinn en er samt mjög mikilvægur til að halda örverusýninu í sem lífvænlegustu formi. Tvær aðferðir (efnameðhöndlun og frystimeðferð) við undirbúning voru prófaðar og skilaði hvorug góðum árangri. Fleiri möguleikar eru fyrir hendi varðandi undirbúning á bakteríusýnum fyrir skoðun í rafeindasmásjá sem áhugavert er að skoða. Má þar helst nefna efnameðferð með

Hexamethyldisilazane, Polysciences Inc. (Dekker o.fl., 1991) og munnlegar upplýsingar frá John Austin frá „Health Products and Food Branch, Health Canada“). Við mælingar á grófleika yfirborðs var árangursríkt að skoða það í rafeindasmásjá hvort sem það var úr ryðfríu stáli eða plastefnum. Þá þarf ekki að meðhöndla sýnin eins og þegar verið er að skoða örveruþekju. Grófleikinn var líka mældur með hrýfismæli. Þau Ra gildi sem fengust við mælingarnar á ryðfríu stáli voru í öllum tilvikum lægri en það sem getið er um í heimildum (Lelieveld o.fl., 2003) og voru innan marka sem EHEDG gefur upp sem er $Ra=0,8\mu\text{m}$ (Hauser o.fl., 2004). Það má síðan deila um það hvort mæling á Ra gildi sem verið er að nota sem mælikvarða gefi nógu góðar upplýsingar um það hvort yfirborð sé auðhreinсанlegt eða ekki. Svipaðar upplýsingar er hægt að fá úr Rz og Rmax gildum en þau gefa nákvæmari upplýsingar um mikilvægar raufar á yfirborði. Rz og Rmax eru viðkvæmari fyrir breytingum á grófleika en Ra. Það hefur verið bent á að það sé betra samband á milli hreinlætis og Rz og Rmax en á milli hreinlætis og Ra. Með rannsókn sinni bentu þeir Frank & Chmielewski (2001) á að það gæti verið æskilegt að fá einnig upplýsingar um Rz og Rmax þegar velja á yfirborðsefni fyrir matvælavinnslu.

4.2.2.2 Viðloðun baktería á mismunandi yfirborð

Allar bakteríurnar sem voru prófaðar festast auðveldlega við allt yfirborð sem var prófað. Ekki var hægt að greina mun á festingu þegar bakteríunum var blandað saman þrátt fyrir mismunandi grófleika á yfirborðinu. Það bendir til þess að þrátt fyrir að yfirborð séu talið mjög slétt, eins og ómeðhöndlaða eða kaldvalsada stálið og slétt PE, geta bakteríur fest sig auðveldlega við það ef aðstæður leyfa. Athyglisvert er að bakteríurnar í hreinrækt festust betur við glerblásna stálið en margar viðloðunarrannsóknir eru aðeins framkvæmdar á einni tegund baktería. Hafa skal í huga að í náttúrunni og í vinnsluumhverfi eru bakteríurnar oftast í sambýli við aðrar bakteríur og er því nauðsynlegt að taka tillit til þess þegar verið er að rannsaka viðloðun. Til að afla meiri upplýsinga um val á yfirborðsefnum var viðloðun nokkurra baktería við slípað stál prófað og nokkur algeng plastefni en þau voru polyvinyl chloride, polyurethane og Voltareimar. Ekki var hægt að greina mun á viðloðun baktería við mismunandi tegundir af

ryðfríu stáli þó að greinilegur munur væri á grófleika þeirra. Í þessu tilvikum var rannsökuð viðloðun *L. monocytogenes* í sambýli með *Aeromonas*, *Serratia liquefaciens* og *Pseudomonas fluorescens*. Allar þessar bakteríublöndur festust í ríku mæli á allt yfirborð. Athyglisvert er að *Serratia liquefaciens* virðist ekki hafa hagstæð áhrif á viðloðun *L. monocytogenes* nema á PVC þrátt fyrir mikla viðloðun á öllu yfirborði. Það er í samræmi við niðurstöður í vaxtartilraununum þar sem hún hafði neikvæð áhrif á vöxt hennar í rækjuseyði. Ef allar niðurstöðurnar eru teknar saman og ekki tekið tillit til snertitímans þá var viðloðun allra bakteríuræktanna minnst við Voltareimar og mest við PVC og glerblásið stál og á það bæði við um heildarviðloðun og festingu *L. monocytogenes*. Ef litið er á einstakar bakteríublöndur þá hafði blanda með *Serratia liquefaciens* mestu viðloðunina og síðan blanda með öllum stofnunum, þá blanda með *P. fluorescens*. Ef aðeins er litið á festingu *L. monocytogenes* þá hafði *P. putida* mestu áhrifin á hana, þá *P. fluorescens*, síðan blanda af öllum bakteríunum. Minnstu áhrifin voru í blöndu með *Aeromonas* og *Serratia liquefaciens*. Þessar niðurstöður eru í samræmi við aðrar rannsóknir sem hafa sýnt fram á að *Pseudomonas* tegundir hafi mjög hagstæð áhrif á festingu *Listeria* við yfirborð (Bourion & Cerf, 1996, Hassan o.fl. 2004). Þess ber að geta að sum plastefni eru gljúp og geta þar af leiðandi tekið upp vökva og efni úr hráefninu og þannig verið gróðrarstía fyrir örverur. Dæmi um slíkt plast er polyurethane og PVC sem er einnig erfitt að þrifa og staðfesta niðurstöður þessa verkefnis það þar sem viðloðun var mikil við þetta yfirborð. Áhrif tíma komu mjög sterkt fram í öllu tilvikum nema þegar umhverfshitastig var lækkað í 10°C, en þá kom greinilegur munur fram þar sem bakteríublanda af *L. monocytogenes* og *Pseudomonas* I/II festist ekki eins vel við stál eða plast og við 22°C og var munurinn allt að 10-100 faldur. Verkefnið hefur skilað upplýsingum um hvernig algengar fiskbakteríur festast við algengt yfirborðsefni sem notað eru í búnað fyrir vinnslu sjávarafurða. Þessi yfirborðsefni eru einnig algeng í öðrum matvælaíðnaði og má þar sérstaklega nefna í kjöt- og kjúklingaframleiðslu. Enn eins og áður sagði þá er sléttara yfirborð engin trygging fyrir því að auðveldara sé að þrifa það eða að halda því hreinu. Það er því ljóst að ef koma á í veg fyrir festingu örvera þarf að finna nýjar leiðir til

að meðhöndla stálið til að gera það auðhreinсанlegra. Það er einnig margt annað sem hægt er að gera til að minnka líkur á að örverur festi sig við yfirborð vinnslubúnaðar. Mikilvægast af öllu er að hanna vinnslubúnað þannig að hann sé einfaldur að byggingu, auðvelt sé að þrifa hann og að hann nái að þorna þar sem örverur þurfa vatn til að vaxa og fjölga sér. Í þeim tilgangi skal bent á mikilvægi þess að fara eftir hreinlætiskröfum. Má þar nefna kröfur varðandi suðu, samsetningar, horn og burðargrindur en koma verður í veg fyrir að uppsöfnum óhreininda sem leitt gæti til myndunar örveruþekju eigi sér stað.

4.3 Áhrif hreinsiefna á bakteríur

Til að koma í veg fyrir að örverur nái að festa sig á vinnslubúnað þarf að þrifa mjög vel í lok vinnudags og einnig að nota áhrifarík þvotta- og sótthreinsiefni og þá í fullnægjandi styrk. Niðurstöður þessa verkefnis benda til þess að styrkur sótthreinsiefna sem verið er að nota nægi ekki til að drepa bakteríurnar. Efnin virðast aðeins hindra vöxt þeirra í ákveðinn tíma og getur það skýrt slakan árangur þrifa. Megintilgangur sótthreinsunar í matvælaíðnaði er að fækka örverum sem eru á snertiflötum matvæla og að draga úr hættu á krossmengun yfir í afurðina. Ef sótthreinsun er ábótavant er það yfirleitt vegna þess að það er verið að nota of lágan styrk af efninu eða að verkunartími þess er of stuttur. Aðrir þættir sem geta haft áhrif eru óhreinindi sem eftir sitja og að hitastig á sótthreinsilausn sé ekki viðunandi. Þessi rannsókn leiddi í ljós að vöxtur *Pseudomonas* stofna var hindraður með öllum efnunum nema efni E sem er klórefni. Þetta á einnig við báða *L. monocytogenes* stofnana. Þessar niðurstöður fengust eftir að virknin var metin á bakteríur í lausn. Annað kom í ljós þegar áhrif sótthreinsiefna var metin á bakteríur sem voru fastar við yfirborð. Það var gert með tvenns konar aðferðum, hefðbundinni penslun og Malthus aðferð. Það kom greinilega fram að efnin virkuðu ekki eins vel á vöxt baktería ef þær voru fastar við yfirborð. Niðurstöður beggja aðferðanna bentu til þess að öll efnin virkuðu betur á *L. monocytogenes* en á *P. putida*. Malthus-aðferðin var aðeins prófuð á tvær bakteríutegundir þar sem útbúa þarf staðalkúrfur fyrir hverja bakteríu sem á að mæla en aðalmarkmiðið var að kanna hvort aðferðin væri góð til að meta virkni hreinsiefna þannig að nægjanlegar upplýsingar fengjust um gæði aðferðarinnar. Nokkuð samræmi var á milli

Þessara tveggja aðferða varðandi virkni hreinsiefnanna þar sem klórefnin virtust vera virkari og þá helst efni G sem inniheldur bæði yfirborðsvirk efni og KOH og flokkast því sem þvottaefni en ekki sótthreinsiefni. Niðurstöður eftir mælingu með Malthus voru meira afgerandi og gaf hún til kynna að efnin hefðu meiri virkni í samanburði við mælingu með penslun. Einn stór munur á þeim tveimur aðferðum sem prófaðar voru hér er varðandi sýnastærð stálplata sem voru pófaðar. Annars vegar 14 cm² (penslun) og 1 cm² (Malthus) og var því ómögulegt að staðla skolun eða þvott sýnanna fyrir meðferð með efnunum. Mun auðveldara var að skola og þvo litlu sýnin þar sem hægt var að hrista þau í Vortex hristara. Stærri sýnaplötturnar sem voru penslaðar voru skolaðar í petriskál. Hafa verður í huga að aðeins hluti af bakteríum nást af yfirborði með penslun á meðan Malthus aðferðin greinir allar ræktanlegar örverur á sýninu. Takmarkandi þáttur við Malthus-aðferð er sýnastærðin en ekki er hægt að vinna með stærri en 1-2 cm² sýni til að hægt sé að koma þeim fyrir í ræktunarsellunum. Í þessari rannsókn komu fram sterkar vísbendingar um að stofnar sem tilheyra ættkvíslinni *Serratia* hafa þróað þol eða náð að aðlagast þeim efnunum sem voru prófuð hér. Það hefur verið sýnt fram á að *E. coli* er viðloðandi í sumum matvælavinnslum (Holah o.fl., 2002) en hún og *Serratia liquefaciens* teljast til ættarinnar *Enterobacteriaceae*. Það bendir til þess að ráðlagður styrkur flestra efnanna sem voru prófuð séu ekki bakteríudrepanði heldur hindri aðeins vöxt baktería og þá aðeins í ákveðinn tíma. Lítil gaumur hefur verið gefinn að þolnum stofnum í matvælavinnslum en þekkt er að *Pseudomonas* bakteríur eru mjög þolnar gagnvart hinum ýmsu efnunum, t.d. fjörgildum ammóníumsamböndum (Langsrud o.fl., 2003b).

Þessar aðferðir sem voru prófaðar hér til að meta áhrif hreinsiefna á bakteríur hvort sem er í lausn eða fastar við yfirborð gáfu allgóðar vísbendingar um áhrif efnanna og einnig hvort sá styrkur sem var prófaður sé nægjanlegur til að halda vexti bakteríanna niðri í ásættanlegu magni. Í þessari tilraun koma greinilega fram vísbendingar um að ráðlagður styrkur þessara efna er ekki nægjanlegur og þarf því að endurskoða hann í ljósi þessara niðurstaðna. Greinilegt er í þessari tilraun að áhrif hreinsiefna eru minni á bakteríur ef þær eru fastar við ryðfrítt

glærblásið stál í samanburði við PVC. Mikilvægt er að skoða þetta í frekari rannsóknum.

5. LOKAORÐ

Örverur sem berast í matvæli geta valdið sjúkdómum og örverur sem ná að festa sig á yfirborð tækja eru mun þolnari gagnvart hreinsis- og sótthreinsiefnum en aðrar. Það er því afar mikilvægt að þeir starfsmenn sem sinna þrifum séu fyllilega meðvitaðir um þá hættu sem sem getur myndast ef þrifin skila ekki tilætluðum árangri og örverur ná að festa sig í umhverfinu. Til að sem bestur árangur náist þurfa starfsmenn vinnslunnar, efna-, örveru- og vélaverkfræðingar að vinna saman. Starfsmenn sem eru ábyrgir fyrir vali á vinnslubúnaði, verða að þekkja grunnkröfur varðandi þrifavæna hönnun. Einnig er mikilvægt að þrifafólk og þeir sem eru ábyrgir fyrir þrifum þekki þessar kröfur og þá sérstaklega þeir sem vinna á há-áhættusvæðum eða þar sem hreinlætisstig er hátt.

Bakteríur sem eru fastar við yfirborð og hafa þróað með sér þol gegn sótthreinsiefnum getur haft fjárhagsleg áhrif á afkomu matvælaíðnaðarins og bæði með því að minnka geymsluþol matvæla og með áhrifum á heilsu manna sérstaklega í þeim tilfellum þegar sjúkdómsvaldandi bakteríur eiga í hlut.

6. ÞAKKARORÐ

Marel hf, 3X-stál hf og Reimaþjónustan fá bestu þakkir fyrir að útvega og undirbúa sýni úr ryðfríu stáli og plastefnum. Jón Matthías og Birgir Jóhannsson hjá Iðntæknistofnun fá þakkir fyrir aðstoð við skoðun í rafeindasmásjá og hryfismælingar og starfsfólk örverustofu Rf fyrir ómælda aðstoð við örverumælingar.

7. HEIMILDIR

- 21CFR; Code of Federal regulations, Title 21, Part 170-199, Food and Drug Administrations.
- Aase., B. Sundheim, G. Langsrud, S. & Rørvik. L.M. (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 62: 57-63.
- Allison, D. (1998) Exopolysaccharide production in bacterial biofilms. Biofilm Journal, 3: Paper 2 (BF98002).
- Arnold, J. W. & Bailey, G. W. (2000) Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: Scanning Electron and Atomic

- force microscopy study. Poultry Science 79: 1839-1845.
- Arnold, J. W. & S. Silvers (2000) Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. Poultry Science 79: 1215-1221.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C. & Gram, L. (2003) The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning. Int. J. Food Microbiol. 87: 239-250.
- Banks, J.G., L.M. Rossiter & A.E. Clark (1989). Selective detection of *Pseudomonas* in foods by a conductance technique. Í: A. Balows, R.C. Tition & A. Turano (ritstj.). Rapid Methods and Automation in microbiology and Immunology, Brescia: Brixia Academic Press, bls. 725-727..
- Beresford, M.R. Andrew, P.W. & Shama, G. (2001) *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. J. Appl. Microbiol. 90:1000-1005.
- Birgir Guðlaugsson & Birna Guðbjörnsdóttir (1997) Hönnun og hreinlæti. Vélabrögð, 18: 20-29.
- Birna Guðbjörnsdóttir & Hjörleifur Einarsson (1998a) Mat á þrifum með ATP-mæli. Rf-skýrsla 9-98: 1-14.
- Birna Guðbjörnsdóttir & Hjörleifur Einarsson (1998b) Úttekt á hreinlæti í íslenskum fiskiðnaði. Rf-skýrsla 10-98: 1-24.
- Birna Guðbjörnsdóttir & Sigrún Guðmundsdóttir (2001) *Listeria* og *Listeria monocytogenes* í rækjuvinnslu. Rf-skýrsla 01-01: 1-21.
- Birna Guðbjörnsdóttir & Hélène L. Lauzon (2002) Spoilage and safety of cold smoked fish – Topic 2; Contamination with *Listeria monocytogenes* (FAIR CT96-1207). Rf-skýrsla 19-02: 1-24.
- Birna Guðbjörnsdóttir, Guðjón Þorkelsson, Árni Sigurðsson & Ragnheiður Halldórsdóttir (2003) Leiðbeiningar um þrifavæna hönnun (hygienic design) fyrir framleiðendur vinnslubúnaðar fyrir matvælaframleiðslu. Rf-skýrsla 19-03: 1-25.
- Blackman, I. C. & J. F. Frank (1996) Growth of *Listeria monocytogenes* as a Biofilm on Various Food processing Surfaces. J. Food. Prot. 59: 827-831.
- Bourion F., & Cerf, O. (1996) Disinfection efficacy against pure-culture and mixed-population biofilms og *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon and rubber. Sciences Des Aliments, 16: 151-166.
- Capell, C.J., R.M. Kirby & M.O. Moss (1995). A method and medium for electrical detection of *Listeria* spp. from food. Int. J. Food Microbiol. 25, 169-178
- Carpentier, B. & Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry (a review). J. Appl. Bacteriology 75: 499-511.
- Curiel, G.J., Hausen, G. & Timberley, D.A. (1996) Hygienic design of equipment for open processing. Campden Food & Drink Research Association, Chipping Campden, EHEDG Doc 13:1-23.
- Dekker, N.P., Claudia, J.L. & Brooks, G.F. (1991) Scanning electron microscopy of piliated *Neisseria gonorrhoeae* processed with hexamethyldilazane. J. of Electron Microscopy Technique, 19: 461-467.
- Downes, F.P. and Ito, K. (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th edition. American Publ. Health Association, Washington.
- Dupont, J., D. Ménard, C. Hervé & B. Minier (1994). Analytical procedure for use of conductance measurements to estimate *Escherichia coli* in shellfish. J. Appl. Bacteriol. 77: 296-302.
- EEC Evrópu tilskipun No.89/109/EEC (1988) „On the approximation of the laws of the Member States relating to materials and articles intended to come into contact with foodstuffs“.
- EEC Evrópu tilskipun No. 2002/72/EEC (2002) „Relating to plastic material and articles intended to come into contact with foodstuffs“: Official Journal of the European Communities No. L 220/18. Með breytingum birtum í EC-tilskipun 2004/19. Official Journal of the European Communities No. L 71/8.
- Elvers, K.T., Peters; A.C. & Griffith, C.J., (1999) Development and control of biofilms in the food industry. Í: J. Wimpenny, P. Gilbert, J. Walker, M. Brading & R. Bayston (ritstj.). Biofilms - the good, the bad and the ugly. Cardiff: Bioline, bls. 139-145.
- Flint, S. H., J. D. Brooks & Bremer, P.J. (1997a) The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel. J. Appl. Microbiol. 83: 508-517.
- Flint, S. H., J. D. Brooks & Bremer, P.J. (1997b). Use of the Malthus conductance growth analyser to determine numbers of thermophilic streptococci on stainless steel. J. of Appl. Microbiol. 83: 335-339
- Flint, S. H., J. D. Brooks & Bremer, P.J. (2000) Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. J. Food Engineering 43: 235-242.
- Frank J. F. & Chmielewski, R. A.N. (2001) Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. J. Food Prot. 64: 1178-1182.
- Friis, A. (2002) Hygienic design of process equipment. Rules and regulations. Fyrirlestur á Norfá námskeiði (Hygienic design phd course) sem haldið var í Biocentrum-DTU í Lyngby, okt. 2002.
- Fuhrman, J. A.; Comeau, D. E.; Hagström, A. & Chan, A. M. (1988). Extraction from Natural Planktonic Microorganisms of DNA suitable for Molecular Biological Studies. Appl. Environm. Microb., 54: 1426-1429.
- Geesey, G.G. (2001) Bacterial behavior at surfaces. Current Opinion in Microbiology 4: 296-300.
- Geiser, M., Avci, R. & Lewandowski, Z. (2002) Microbially initiated pitting on 316L stainless steel. Inter. Biodeterioration & Biodegradation 49: 235-243.
- Gibson, H., Taylor, J.H., Hall, K.E. & Holah, J.T. (1999) Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. J. Appl. Microbiol. 87:41-48.

- Gilbert, P. (2000) Biofilms: Problems of control. Published by the Society for general Microbiology - Community Structure and Co-operation in Biofilms. SGM series, 59:1-25.
- Gilmour, A., Wilson, A.B. & Fraser, T.W. (1993) Microbial adherence to food contact surfaces. In: Denyer, S.P., Gorman, S.P. & Sussman, M. (ritstj.) Microbial Biofilms: Formation and Control. (The Society for Applied Bacteriology; Technical Series No. 30). Blackwell Scientific Publications, London, bls. 293-313.
- Gram, L., Trolle, G. & Huss, H.H. (1987) Detection og specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. Int. J. of Food Microbiol., 4: 65-72.
- Gram, L. & Huss, H.H. (1996) Microbiological spoilage og fish and fish products. Int. J. of Food Microbiol., 33: 121-137
- Hannes Magnússon & Kristín Traustadóttir (1980) Geymsluþol reykrar síldar í loftdregnum plastumbúðum. Tæknitiðindi Rf. 119: 1-23.
- Hannes Magnússon & Emilia Martinsdóttir. (1995) Storage Quality of Fresh and Frozen-thawed Fish in Ice. J. Food Sci. 60: 273-278.
- Hassan, A.N. Birt, D.M. & Frank, J.F. (2004). Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* biofilm on a condensate-forming surface. J. Food Prot. 67: 322-327.
- Hauser, G, Curiel, G.J., Bellin, H.-W.Cnossen, H.J., Hofman, J., Kastelein, J., Partington, E., Peltier, Y. & Timberley, A.W. (2004) Hygienic equipment design criteria. 2nd ed., Campden Food & Drink Research Association, Chipping Campden, EHEGD Doc 8:1-13.
- Hélène L. Lauzon (2002) Topic 3: Development of biological measures for *Listeria* spp. in the manufacture of cold-smoked fish. (FAIR CT96-1207). Rf-skýrsla 20-02: 1-47.
- Herald, P. J. & E. A. Zottola (1988) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperature and pH values. J. Food Sci. 53: 1549-1552.
- Hjörleifur Einarsson & Hélène L. Lauzon (1995) Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61: 669-676.
- Holah, J, Higgs, C, Robinson, S, Worthington, D & Spenceley, H. (1990). A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. Letters in Applied Microbiology, 11: 255-259.
- Holah, J.T., Lavaud, A., Peters, W. & Dye, K.A. (1998) Future technique for disinfectant efficacy testing. Inter. Biodeterioration & Biodegradation 41:273-279.
- Holah, J & Timberley, A. (1999a) Hygienic design of food processing facilities and equipment. In G. Wirtanen, S. Salo and A. Mikkola, eds.: Proceedings of 30th R³-Nordic Contamination Control Symposium, VTT Symposium 193, Espoo: Libella Painopalvelu, 11-39.
- Holah, J & Timberley, A. (1999b) Biofouling: Cleanability problems in food processing. In G. Wirtanen, S. Salo and A. Mikkola, (eds.): Proceedings of 30th R³-Nordic Contamination Control Symposium, VTT Symposium 193, Espoo: Libella Painopalvelu, 177- 186.
- Holah, J.T., Taylor, J.H., Dawson, D.J. & Hall, K.E. (2002) Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 92(Suppl. 1): 111S-120S.
- Hood, S. K. & E. A. Zottola (1997) Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food system. Int. J. of Food Microbiol. 37: 145-153.
- Howard, G.T. (2002) Biodegradation of polyurethane: a review. Int. Biodeterioration & Biodegradation 49: 245-252.
- Hugh, R. & Leifson, E.(1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative Gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-26.
- ISO-International standard (1998) Geometrical Product Specifications (GPS) – Surface texture: Profile method -- Terms, definitions and surface texture parameters. ISO 4287:1998.
- ISO-International standard (2002). Safety of machinery - Hygiene requirements for the design of machinery. ISO 14159:2002.
- ÍST EN 1672-2:1997. Staðlaráð Íslands (1997) Vélar til matvælavinnslu - Grunnhugtök - 2. hluti: Hreinlætiskröfur. Íslenskur staðall.
- Joseph, B. & Otta S.K (2001) Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. Int. J. Food Microbiol 64: 367-472.
- Krieg, N.R. & Holt, J.G.(Ed.) (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Krysinski, E.P., Brown, L.J., Marchisello, T.J. (1992) Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. Int. J. Food Microbiol 55: 246-251.
- Kumar, C.G. & Anand, S.K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. Int. J Food Microbiol. 42: 9-27.
- Kusumaningrum, H.D, Riboldi, G., Hazeleger, W.C. & Beumer; R.R. (2003) Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. Int. J Food Microbiol 85: 227-236.
- Langsrud, S., Siingh Sidhu, M., Heir, E. & Holck, A.I. (2003a) Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. Int. Biodeterioration & Biodegradation 51:283-290.
- Langsrud, S., Sundheim, G. & Borgmann-Strahsen, R. (2003b) Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. J. Appl. Microbiol 95: 874-882.
- Lelieveld, H.L.M, Mostert, M.A. & Curiel, G.J. (2003) Hygienic equipment design In: Lelieveld, H.L.M, Mostert, M.A, Holah, J. & White, B (ritstj.). Hygiene in food processing, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 122-166
- Lemaitre, J-P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Dives, C. & Rousset, A. (1998) Plasmid-mediated resistance to

- antimicrobial agents among *Listeriae*. J. Food Prot. 61: 1459-1464.
- Lundén J. M., Miettinen M. K., Autio T. J. & Korkeala H. J. (2000) Persistent of *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact time. J. Food Prot. 63: 1204-1207.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. & Magny, P. (1990) Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. J. Food Prot. 53: 742-746.
- Marsh, T.L. (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Curr. Opinion in Microbiol. 2: 323-327
- Massol-Deya, A., Odelson, D., Hickey, R. & Tiedje, J. (1995). Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). Molecular Microbial Ecology Manual 3.3.2: 1-8
- McClain, D. & Lee, W.H. (1989) FSIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products. Lab. Comm. No. 57, revised May 24, 1989. U.S. Dept. of Agric (USDA), FSIS, Microbiol. Div., Beltsville, Md.
- Norwood, D. E. & A. Gilmour (1999) Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. J. Appl. Microbiol. 86: 576-582.
- Norwood, D. E. & A. Gilmour (2000) The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. J. Appl. Microbiol. 88: 512-520.
- Norwood, D. E. & Gilmour A. (2001) The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies as a function of temperature. Letters in Appl. Microbiol. 33: 320-324.
- Osborn, A. M.; Moore, E.R.B. & Timmis, K.N. (2000). An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Environmental Microbiology 2(1): 39-50.
- Percival, S.L. (1999) Biofilm reduction by choice of material, filtration, surface roughness and molybdenum ions. Í: J. Wimpenny, P. Gilbert, J. Walker, M. Brading & R. Bayston (eds). Biofilms - the good, the bad and the ugly. Cardiff: Bioline, bls. 155-170.
- Petitt, S.B. (1989). A conductance screen for enterobacteriaceae in foods. Í: C.J. Stannard, S.B. Petitt & F.A. Skinner (ritstj.), Rapid Microbiology Methods for Foods, Beverages and Pharmaceuticals. Oxford: Blackwell Science, bls. 131-141.
- Pless, P., K. Futschik & E. Schopf (1994). Rapid detection of salmonellae by means of a new impedance-splitting method. J. Food Prot. 57: 369-375.
- Raaska, L. & Carpén, L. (1999) Biofilm formation and corrosion of stainless steel. Í: J. Wimpenny, P. Gilbert, J. Walker, M. Brading & R. Bayston (ritstj.). Biofilms - the good, the bad and the ugly. Cardiff: Bioline, bls. 355-357.
- Richards, J.C.S., A.C. Jason, G. Hobbs, D.M. Gibson & R.H. Christie (1978). Electronic measurements of bacterial growth. J. Phys. E. Sci. Instrum. 11: 560-568.
- Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C. & Tompkin, R.B. (1996) Microbiological specifications of food pathogens. Microorganisms in foods 5. Chapman & Hall, London, UK for ICMSF, 513 s.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. & Mackey, B.M. (1998). The effect of the growth environment on lag phase of *Listeria monocytogenes*. Int. J. of Food Microbiol. 44: 83-92.
- Shewan, J.M., Hobbs, G. & Hodgkiss, W. (1960) A determinative scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. J. Appl. Bact. 23: 379-390.
- Sigrún Guðmundsdóttir (2000) *Listeria* gagnagrunnur, Rf-skýrsla 10-00: 1-2.
- Sinde, E. & Carballo, J. (2000) 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. 17: 439-447.
- Snowdon, J.A., Buzby, C. & Roberts, T. (2002) Epidemiology, Cost and Risk of Foodborne Disease. Í: Cliver, D.O. & Riemann, H.P. (ritstj.) Foodborne diseases, 2nd Elsevier Science, bls. 31-51.
- Stanbridge, L.H. & Board, A.R. (1994) A modification of the *Pseudomonas* selective medium, CFC, that allows differentiation between meat Pseudomonads and Enterobacteriaceae. Letters in Appl. Microbiol. 18: 327-328.
- Staney, J.T (1999). Bacterial Biodiversity: a Time for Place. ASM News, 65: 681-687.
- Stanley P.E. (1989) A Concise Beginner's Guide to Rapid Microbiology Using Adenosine Triphosphate (ATP) and Luminescence. I: ATPLuminescence. Rapid Methods in Microbiology; SAB Technical Series no. 26: Blackwell Scientific Publ. London.
- Steenard, P., Maas, H. Van Den Bogaard, J., Pinchin, R. & De Boer, M. (2002) Production and use of food-grade lubricants. Campden Food & Drink Research Association, Chipping Campden, EHEDG Doc. 23: 1-21.
- Stencel, C. (2000). Microbial Diversity: Eyeing the Big Picture. ASM News, 65: 142-14.
- Stewart, P.S., Rayner, F., Roe, F. & Rees, W.M. (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. J. Appl. Microbiol. 91: 525-532.
- Sundheim, G., Hagtvedt, T. & Dainty, R. (1992) Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. Food Microbiology 9: 161-167.
- Tuompo, H., Slo., Scheinin S., Mattila-Sandholm, T. & Wirtanen, G. (1999) Chelating agents and detergent in sampling biofilms. Í: J. Wimpenny, P. Gilbert, J. Walker, M. Brading & R. Bayston (ritstj.). Biofilms - the good, the bad and the ugly. Cardiff: Bioline, bls. 113-120.

- Wirtanen, G., Saarela, M. & Mattila-Sandholm, T. (2000) Biofilms - Impact on hygiene in food industries. Í: J. D. Bryers (ritstj.), Biofilms II: Process Analysis and Applications, Wiley-Liss, Inc.:327-372.
- Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M. & Mattila-Sandholm, T. (2001) Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 20: 37-50.
- Wood, S.R., Kirkham, J, Mash, P.D., Shore, R.C., Nattress, B. & Robison, C. (2000). Architecture of Intact Natural Human Plaque Biofilms Studied by Confocal Laser Scanning Microscopy. J. Dent Res 79: 21-27.
- Zottola, E.A. & Sasahara, K.C. (1994) Microbial biofilms in the food processing industry. Should they be a concern. Int. J. Food Microbiol. 23: 125-148.

<http://www.steel.org>

<http://www2.din.de/index.php?lang=en>

<http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/primer.html>

<http://www.mel.nist.gov/div821/webdocs-13/surfcilib.htm>

ViðAUKI 1:

Algengustu yfirborðsefni sem notuð eru við byggingu á vinnslubúnaði og algengustu þvotta- og sótthreinsiefni notuð við þrif í matvælavinnslum

<i>Plastefni</i>	<i>Ryðfrítt stál</i>	<i>Gúmmí</i>
POM/acetal	Kaldvalsað, heitvalsað, sýruþvegið, burstað stál.	Nítríl
PE-1000	304L og 316L sem hægt er að sjóða	Neoprem
PE-500	Nota mest 304L og 304 og 316L og 316.	
PE-300	303 ekki hægt að sjóða en auðvelt að renna.	
PC		
Polyurethane		

Hreinsiefni

Mörg efni á markaðnum með sama grunn því verður miðað við að prófa efni sem tilheyra hverjum flokk.

<i>Þvottaefni</i>	<i>Sótthreinsiefni</i>
Sterk basísk þvottaefni pH-12-13	Klórefnimörg plastefni þola ekki klór eða klórblönduð efni. Klórðíoxíð sem er stabiliserað er nýjung á markaðnum og lofar góðu. Það fer ekki eins illa með tæki og önnur klórefni en virkar mjög vel á allar flestar
Sterk basíks efni með klórefnum	<i>Fjörgild ammóníumsambönd</i> benzalkonium chloride. Yfirborðs-virkt efni sem fer ekki illa með tækin. Virka ekki á alla örveruhópa eins og sumar skemmdarbakteríur.
Veik basísk þvottaefni	<i>Alkylamínsambönd</i> - brotna mjög hratt niður í umhverfinu
Sterk súr þvottaefni pH 3	<i>Byotrol</i> - Nýtt áhugavert yfirborðsvirkt efni
Veik súr þvottaefni - lífrænar sýrur	<i>Stabilized-klórðíoxíð</i> (SCD)- nýtt áhugavert