

Vekst og overlevelse av matrelaterte bakterier på antimikrobielle overflater

Growth and survival of food-associated bacteria on antimicrobial surfaces

Gunn Sigrid Høiby-Pettersen

Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Masteroppgave 30 stp. 2010

FORORD

Denne oppgaven har blitt utført som en del av Mastergradstudiet i Matvitenskap ved Universitetet for miljø og biovitenskap (UMB). Arbeidet med oppgaven ble utført ved Nofima Mat AS.

Tiden på Nofima har vært svært lærerik og spennende. Jeg vil spesielt takke mine veiledere ved Nofima, forsker Trond Møretrø og forsker Solveig Langsrud for god veiledning og oppfølging gjennom både det praktiske arbeidet og skriveprosessen. Jeg ønsker også å takke Olivier Habimana for gode råd og hjelp på laben. En takk rettes også til de øvrige ansatte ved avdelingen for mikrobiologi og emballasje.

Jeg vil også takke min hovedveileder ved UMB, professor Helge Holo.

Ås, mai 2010

Gunn Sigrid Høiby-Pettersen

SAMMENDRAG

Det er de siste årene kommet en rekke produkter på markedet med påståtte antimikrobielle egenskaper, der antimikrobielle forbindelser er inkorporert i eller ligger som belegg utenpå produktet. To slike antimikrobielle forbindelser er triclosan og nanosølv. Begge forbindelsene finnes i en rekke kommersielle produkter for eksempel såpe, kremer, tannkrem og husholdningsprodukter som skjærebrett. Hensikten med disse undersøkelsene var å undersøke om skjærebrett som inneholdt henholdsvis triclosan og nanosølv, hadde antimikrobiell effekt på matrelaterte bakterier. Undersøkelsene omfattet kontroll av overlevelse og vekst av bakterier på disse skjærebrettene, undersøkelse av MIC for de antimikrobielle forbindelsene i ulike bakteriesuspensjoner og agardiffusjons-assay av de ulike typene skjærebrett.

Kuponger av skjærebrettene med bakteriesuspensjon som ble undersøkt ble inkubert ved henholdsvis 70 og 100 % relativ fuktighet. MIC for triclosan og sølv ble undersøkt i mikrotiter brett med samtlige enkelt stammer. Agardiffusjonsforsøket ble først gjort på kuponger av samtlige materialer med bakteriesuspensjoner av fem overnattkulturer. Deretter ble kupongen med triclosan undersøkt ved agardiffusjons-assay mot samtlige enkelt stammer. Bakteriegruppene som ble benyttet var *E. coli*, *Salmonella*, *Serratia*, koagulase negative *Staphylococcus* sp., *St. aureus* og *L. monocytogenes*. Resultatene viste at ingen kuponger med nanosølv hemmet veksten, men på kupongen med triclosan kunne effekt sees ved 70 % relativ fuktighet. Nanosølv var ikke tilgjengelig da MIC skulle undersøkes, sølvnitrat ble i stedet benyttet. Alle benyttede stammer med få unntak fikk MIC for sølvnitrat 15,63 ppm. Tre *L. monocytogenes* stammer og en *Serratia* stamme fikk MIC 31,25 ppm AgNO₃. Resultatene etter undersøkelsene av MIC for triclosan ga større variasjon mellom bakteriegruppene. Det kunne i tillegg observeres små forskjeller innad i de ulike bakteriegruppene. Resultatene av agardiffusjonsforsøket hvor samtlige materialer ble testet mot hver bakteriegruppe viste at kun materialet med triclosan ga hemmesone. Hver enkelt stamme ble derfor undersøkt ved agardiffusjons-assay mot dette materialet, og samtlige stammer ble hemmet og det kunne observeres hemmesone med unntak på skåler med *Serratia* sp. Resultatene av MIC undersøkelsene for triclosan og agardiffusjons-assay med materiale med triclosan samsvarte nokså godt.

Tre kuponger av materialet med triclosan ble i tillegg undersøkt for virkning etter omfattende

vask. Disse tre kupongene ble vasket nesten hver dag i to måneder i en husholdnings vaskemaskin. Agardiffusjons-assay av disse kupongene mot ubehandlede kuponger av samme type viste en signifikant forskjell på hemmesonenes størrelse, noe som tyder på at materialet over tid vil miste sin virkning på grunn av vask og slitasje.

ABSTRACT

Over the last years a large range of products with alleged antimicrobial effect have been developed and are available on the market. The antimicrobial agents are incorporated throughout the material or coating covering the product. Two such agents are triclosan and nanosilver particles. These antimicrobial agents can be found in products like soaps, lotions, toothpaste and different household products like cutting boards. The purpose of this research was to investigate the antimicrobial effect of cutting boards incorporated with triclosan or nanosilver. The research included testing of growth and survival of food-associated bacteria on the cutting boards, test of MIC for the antimicrobial agents in different bacteria suspensions and agardiffusion-assay of the different cutting boards.

The cutting boards were cut into coupons. Bacteria suspension were added to the coupons and incubated in atmospheres with 70 and 100 % RH. The triclosan and nanosilver's MIC was tested using microtiter plates for each strain. The agardiffusion-assay was first done with all the materials using bacteria suspensions with five bacteria strains, followed by agardiffusion-assay with the triclosan containing coupon against each strain. Strains of *E. coli*, *Salmonella*, *Serratia*, coagulase-negative *Staphylococci*, *St.aureus* and *L. monocytogenes* were used. The results showed that none of the coupons incorporated with nanosilver inhibited the bacteria growth, but the triclosan containing coupon showed effect in atmosphere with 70 % RH. Nanosilver was not accessible when the MIC was tested and silver nitrate was used as a substitute. All bacteria strains with a few exceptions got a MIC of 15,63ppm silver nitrate. Three strains of *L. monocytogenes* and one strain of *Serratia* got a MIC of 31,25ppm silver nitrate. The MIC-testing results of triclosan varied more for the different bacteria groups and also showed some small variation between strains of the same species. In the agardiffusion-assay done with bacteria suspensions, only the coupon with triclosan gave inhibition rings. Each strain was therefore tested against this coupon, and all strains were inhibited except the five *Serratia* strains. The results of triclosan MIC testing and agardiffusion-assay with the Microban coupon showed compliance. The antimicrobial effect of three coupons with triclosan was tested using agardiffusion-assay after an extensive washing. The coupons had been washed in a household dishwasher nearly every day for two months. The agardiffusion-assay showed that the washing had effected their antimicrobial effect significantly, indicates that the material will lose its effect due to washing and wearing.

INNHALDSFORTGNELSE

1 INNLEDNING

2 TEORI	9
2.1 Antimikrobielle virkestoffer	10
2.1.1 Triklosan	10
2.1.2 Nanosølv	12
2.2 Hygiene i næringsmiddelindustrien	12
2.2.1 Desinfeksjon	12
2.2.2 Biofilm	13
2.3 <i>Escherichia coli</i>	14
2.3.1 Shigatoksinproduserende <i>E. coli</i> , STEC/Enterohemorragisk <i>E. coli</i> , EHEC	14
2.3.2 Shigatoksin	15
2.3.3 <i>E. coli</i> relatert til næringsmidler.....	15
2.4 <i>Salmonella</i>	16
2.4.1 Virulensfaktorer	17
2.4.2 <i>Salmonella</i> relatert til næringsmidler	17
2.5 <i>Serratia</i>	17
2.6 <i>Staphylococcus</i> sp.	18
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.6.1.1 Virulensfaktorer	18
2.6.1.2 <i>St. aureus</i> relatert til næringsmidler	19
2.6.2 Koagulase Negative Stafylokokker	19
2.7 <i>L. monocytogenes</i>	20
2.7.1 Virulensfaktorer	21
2.7.2 <i>L. monocytogenes</i> relatert til næringsmidler	21
3 MATERIALER OG METODER	22
3.1 Medier og løsninger	22
3.1.1 Medier	22
3.1.2 Løsninger	22

3.2 Bakteriestammer	23
3.2.1 Oppbevaring og dyrking av bakterier	25
3.3 Antimikrobielt materiale	26
3.4 Sterilisering av kuponger	27
3.5 Innledende forsøk	27
3.6 Overlevelse av matrelaterte bakterier på antimikrobielle overflater	28
3.6.1 Antall bakterier før påføring på antimikrobielt materiale	28
3.6.2 Påføring av bakteriesuspensjon på kuponger	28
3.6.3 Inkubering av kuponger	28
3.6.4 Beregning av antall overlevende bakterier	29
3.7 Hemmetest – Minste Inhiberende Konsentrasjon	29
3.8 Hemmetest – agardiffusjonsforsøk	30
3.8.1 Innledende forsøk	30
3.8.2 Agardiffusjonsforsøk med Microbankuponger(M1)	30
3.8.3 Agardiffusjon med vaskede Microbankuponger	30
3.9 Antimikrobiell effekt på kyllingfilets naturlige bakterieflora	31
3.9.1 Kyllingfilet kontroller	31
3.9.2 Eksponering av kyllingfilet på kuponger	31
3.9.3 Beregning av antall bakterier på kuponger og kyllingfileter	31
3.10 Statistiske metoder	32
4 RESULTATER	33
4.1 Innledende forsøk	33
4.2 Vekst og overlevelse av matrelaterte bakterier på antimikrobielle overflater	35
4.3 Hemmetest – Minste Inhiberende Konsentrasjon	43
4.4 Agardiffusjonsforsøk	44
4.4.1 Innledende forsøk	44
4.4.2 Agardiffusjon av Microbankuponger	45
4.4.3 Agardiffusjon av vaskede Microbankuponger	45
4.5 Antimikrobiell effekt av skjærebrett på kyllingfilets naturlige bakterieflora	47
5 DISKUSJON	48

6 KONKLUSJON	55
7 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	56
REFERANSER	57
VEDLEGG	65

1 INNLEDNING

Krysskontaminering ved tillaging av mat er en viktig smittevei for sykdomsfremkallende og kvalitetsforringende mikroorganismer. Mikroorganismene kan feste seg til, vokse og danne biofilm og/eller overleve på overflater i kjøkken og næringsmiddelindustrien. Næringsmidler som kommer i direkte eller indirekte kontakt med slike overflater kan bli kontaminert.

Det er en rekke ulike materialer som kan komme i kontakt med næringsmidlene. Tradisjonelle eksempler er plast, tre, papir og rustfritt stål. De siste årene har det derimot kommet nye typer materialer på markedet med påståtte antimikrobielle egenskaper. Triklosan og nanosølv er antimikrobielle forbindelser som i økende grad benyttes i kjøkkenprodukter og i næringsmiddelindustrien, men disse antimikrobielle virkestoffene er også lansert i en rekke ulike produktgrupper. De er å finne i tekstiler, produkter for personlig hygiene som for eksempel såpe og fuktighets krem, i sportsutstyr, i gulvbelegg og annen innredning og i store innretninger som heiser. Disse materialene markedsføres som å kunne drepe eller hindre vekst av mikroorganismer. Slik effekt er lite dokumentert, spesielt i vitenskaplig sammenheng. Tidligere forsøk har i stor grad gått ut på å undersøke de antimikrobielle virkestoffenes effekt på bakterier ved blant annet å teste minste inhiberende konsentrasjon, men svært få forsøk er blitt gjort på materialer som inneholder disse stoffene.

Formålet med oppgaven var

- å undersøke matrelaterte bakteriers evne til å overleve og vokse på skjærebrett med inkorporert triklosan eller nanosølv.

2 TEORI

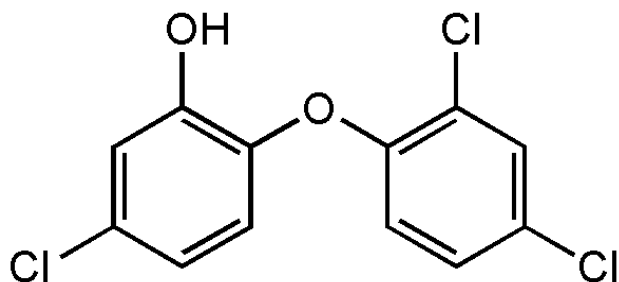
2.1 Antimikrobielle virkestoffer

På grunn av økende antibiotikaresistens leter forskere etter nye antibakterielle virkestoffer (Rai et al., 2009). Sølv og sølvioner har lenge vært kjent for sin inhiberende effekt på bakterier og ny teknologi er under utvikling for å utnytte dette (Cho et al., 2005). Andre stoffer, som triklosan har vært i bruk i hudpleieprodukter i over 30 år, men produsenter av ulike produkter verden over har fått øynene opp for dette stoffet og dets påståtte antimikrobielle effekt (Jones et al., 2000).

Produsentene finner stadig nye produkter disse antimikrobielle virkestoffene kan inkorporeres i. Produkter med nanosølv er blant annet ulike polyetylen produkter (Bioguard®) og tekstiler (Dubas et al., 2006) Triklosan finnes i produkter som såpe, tannkrem og en rekke andre produkter for personlig hygiene (Bhargava et al., 1996, DeSalva et al., 1989) i tillegg til blant annet polyetylenprodukter og kjøkken- og baderomsinnredning (Microban International, Ltd. C & K products division).

2.1.1 Triklosan

Triklosan (2,4,4'-trikloro-2'-hydroksydifenyleter) er en kjemisk forbindelse med et bredt spekter for antimikrobiell aktivitet. Forbindelsen er et ikke-ionisk, hvitt, odørløst og smakløst krystalinsk pulver (Jones et al., 2000). Triklosan er tungtløselig i vann, men løser seg lettere i upolare organiske løsninger (Bhargava et al., 1996).



Figur 1.1 Triklosan (2,4,4'-trikloro-2'-hydroksydifenyleter) (Schweiser, 2001).

Triklosan ble utviklet av Ciba-Geigy Company (Basel, Sveits) tidlig på 1960-tallet. Kjemikaliet distribueres i dag som Irgasan DP300 for hud produkter og Irgacare MP for munnhygiene produkter av Ciba Specialty Chemicals Corporation i Nord Carolina, USA(<http://cibasc.com>) (Bhargava et al., 1996).

Virkningsmekanismen til triklosan ble tidligere antatt å være uspesifikk ved at forbindelsen diffunderte gjennom celleveggen og påvirket membranstrukturer og funksjoner (Regos et al., 1974, Meincke et al., 1980). Det har i senere tid imidlertid vist seg at triklosan påvirker bakteriens fettsyresyntese. Dette ble vist ved forsøk der *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* og *St. aureus* ble benyttet. Resultatene viste at NADH-avhengige enoyl-[acyl carrier protein] reductase (FabI) ble inhibert ved at triklosan imiterte det naturlige substratet (Heath et al., 1998, Heath et al., 2000, Hoang et al., 1999) eller dens homologe InhA i *Mycobacterium smegmatis* og *Mycobacterium tuberculosis* (McMurry et al., 1999, Parikh et al., 2000, Slayden et al., 2000). Den opprinnelige antatte virkningsmekanismen kan derfor forklares som sekundæreffekter av den spesifikke inhiberingen av fettsyresyntesen (Schweiser, 2001).

Microban International, Ltd. er en av verdens ledende produsenter av produkter inkorporert med antimikrobielle virkestoffer, blant annet triklosan. De lager produkter for privatkunder og industrien i tillegg til medisinske produkter. Ved fremstilling av sine produkter tilsettes det antimikrobielle virkestoffet slik at det blir jevnt fordelt gjennom hele materialet. Microban markedsfører sine produkter som svært effektive overfor en rekke mikroorganismer, deriblant bakterier, men de understreker at produktene må vaskes på normalt vis. De sier også at den antimikrobielle effekten ikke vil bli svekket av vask og slitasje(www.microban.com).

Noen undersøkelser er gjort på Microban inkorporert i ulike produkter. DeVere et al. (2007) har undersøkt den antibakterielle effekten til skjærebrett inkorporert med Microban i forhold til overflater av tre, plast, og glass. De fant at plast inkorporert med Mikroban hadde signifikant lavere bakterietall enn plast og glass etter eksponering. Undersøkelse av tannbørster med Microban har vist lignende resultater i forhold til tannbørster uten tilsatt antimikrobielt virkestoff (Goldschmidt et al., 2004). Lefebvre et al. undersøkte foringsmateriale benyttet til gebiss inkorporert med Microban. De fant derimot ingen signifikant forskjell i bakterietall på produktet med Mikroban sammenlignet med produkter uten.

2.1.2 Nanosølv

Sølv og sølvioner har lenge vært kjent for sine inhiberende og antibakterielle effekt samt for sitt brede spekter som antimikrobielt virkestoff (da Silva Paula et al., 2008). Med nanoteknologien har sølv nanopartikler (Ag-NP) blitt utviklet. Disse har en stor spesifikk overflate og en høy andel overflateatomer (Duran et al., 2005). Nanopartiklene foreligger som klaser med atomer som måler 1-100 nm (Gong et al. 2007).

Nanosølv har vist seg å ha god antimikrobiell effekt mot bakterier, men også virus og andre eukariote mikroorganismer (Gong et al. 2007). Den eksakte antimikrobielle mekanismen til sølv er ikke fullt ut kjent, men det tyder på at frie sølvioner reagerer med thiol (SH-)grupper i proteiner, noe som fører til inaktivering av proteinene (Lehninger et al.) og som igjen inaktiverer bakterien (Liau et al., 1997).

Nanosølv kan inkorporeres i blant annet plast og løsninger til overflatebehandling ved at det blandes inn under fremstilling av produktet. Nanosølv er derfor å finne i en rekke produkter av plast (Bioguard), samt i tekstiler (Dubas et al., 2006), i ulike hygieneprodukter og medisinske implantater og midler for behandling av sår og brannskader (Chen et al., 2007).

2.2 Hygiene i næringsmiddelindustrien

Gode renholdsrutiner og desinfeksjon er svært viktig i næringsmiddelindustrien for å unngå kontaminering av næringsmidler med potensielt patogene bakterier. Bakteriene har en rekke av mulige smitteveier inn i næringskjeden, for eksempel via vann og luft, menneskelig håndtering og transportutstyr. Gode renholdsrutiner fjerner smuss og reduserer antall bakterier. For ytterligere å redusere antallet benyttes desinfeksjon (Sundheim, 1999).

2.2.1 Desinfeksjon

I næringsmiddelindustrien benyttes en rekke desinfeksjonsmidler som ved rett bruk vil redusere antall bakterier. Desinfeksjonsmidlene skal være effektive, men må samtidig ikke være farlige eller forårsake korrosjon. Det er også viktig å ta miljøsyn ved valg av desinfeksjonsmidler (Sundheim et al., 1995). I hovedsak benyttes kvartære ammoniumforbindelser (QAC) og hypokloritt til desinfeksjon av overflater. Hypokloritt har sterk virkning, også på sporer, men stoffet er svakt korroderende (pH 7-8) og bør ikke

benyttes for ofte. Til daglig desinfeksjon benyttes derfor QAC (Granum, 2008).

2.2.2 Biofilm

Ved utilstrekkelig rengjøring vil bakterier ha stor tilgang på næringsstoffer. Dette favoriserer biofilmdannelse. Biofilmdannelse er en dynamisk prosess som går over flere trinn (Jeong et al., 1994, Kumar et al., 1998). Bakteriene har flere komplekse egenskaper som gjør det mulig for dem å adherere til overflater. Innledningsvis er det Van der Waal's krefter som gjør at bakterien nærmer seg overflaten, men når bakterien er 10-20 nm fra overflaten oppstår det tiltrekning mellom bakterien og overflaten. Adhesjonen er på dette punktet reversibelt da det ikke er noen bindinger mellom bakterien og overflaten. Hydrofobe interaksjoner fjerner vannet mellom bakterien og overflaten slik at bakterien kan feste seg. For at bakteriens binding til overflaten skal være sterk kreves flere typer interaksjoner, noe som resulterer i at bakterien blir irreversibelt bundet (Busscher et al., 1987). Bakterier som er bundet til overflaten kan så vokse og danne mikrokolonier. Disse vil i tur vokse sammen og danne et celledag som dekker overflaten (Allison et al., 1987). En etablert biofilm er et lag med bakterier i flere sjikt omgitt av ekstracellulær polymerisk substans som kan bestå av polysakkarider, proteiner og DNA (Otto, 2004). Tykkelsen på biofilmen avhenger av mengde tilført substrat, tid fra dannelse og mekanisk påvirkning. For enkelt kulturer er biofilmstrukturen artsspesifikk, men ofte er biofilmen bestående av en rekke kulturer, noe som gjør biofilmen substratspesifikk. I slike biofilmer er strukturen uregelmessig på grunn av ulikt vekst- og adhesjonsmønster hos bakteriene (Costerton et al., 1995).

Bakterier i biofilm har økt resistens mot blant annet desinfeksjonsmidler og antimikrobielle substanser som antibiotika enn frittlevende bakterier (Dewanti et al., 1995). Resultater har vist at bakterier i biofilm kan overleve 100 ganger høyere konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler sammenlignet med bakterier i suspensjon, og er derfor vanskelig å fjerne (Gilbert et al., 2002).

2.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli tilhører slekten *Escherichia* og familien *Enterobacteriaceae* og er en Gram-negativ, katalase-positiv, oksidase-negativ, fermentativ, ikke-sporedannende fakultativ anaerob stavbakterie (Adams et al., 2000), og har peritrike flageller som gjør den bevegelig (Granum, 2008).

E. coli er en mesofil bakterie og kan vokse mellom 7 og 50 °C, med et vekstoptimum på 37 °C. Bakterien er ikke spesielt varmeresistent (Adams et al., 2000) og ingen stammer vil kunne overleve pasteurisering og koking (Granum, 2008). *E.coli* vil kunne overleve i nedkjølt og frossen tilstand over lengre tid. Optimal pH for vekst er nær nøytral, men bakterien kan vokse ned til pH 4,4 hvis andre vekstvilkår er optimale. Minimum a_w for vekst er 0,95 (Adams et al., 2000).

E. coli har sitt naturlige reservoar i tarmen hos varmblodige dyr og mennesker. Noen stammer er imidlertid sykdomsfremkallende og vil forårsake gastroenteritt (Granum, 2008).

Sykdomsfremkallende *E. coli* deles inn i undergrupper basert på virulens faktorer, kliniske symptomer og serotyper (Sekse, 2009).

E. coli differensieres serologisk basert på antigenene på bakterien overflate.

- O (somatisk)
- H (flageller)
- K (kapsel)
- F (fimriae)

Flere hundre serotyper er identifisert, men de fleste av disse tilhører den naturlige tarmfloraen og er derfor ikke sykdomsfremkallende. Serotyping kan sammen med andre metoder benyttes til å skille apatogene og sykdomsfremkallende stammer (Sekse, 2009).

2.3.1 Shigatoksinproduserende *E. coli*, STEC/Enterohemorragisk *E. coli*, EHEC

Shigatoksinproduserende *E. coli* er patogene stammer som produserer ett eller flere Shigatoksiner (Stx). STEC som forårsaker alvorlig sykdom hos mennesker, som hemorragisk kolitt og hemolytisk uremisk syndrom (HUS) kalles enterohemorragisk *E.*

coli, EHEC (Levine, 1987). De viktigste serogruppene klassifisert som EHEC er O157, O26, O103, O111 og O145 (Granum, 2008).

2.3.2 Shigatoksin

Shigatoksinene er en av de viktigste virulensfaktorene til STEC. Stx tilhører en familie av AB₅ toksiner. Disse består av en A subenhet og fem B subenheter. A-enheten er non-kovalent bundet til en ringstruktur av B-enhetene. Toksinet kan inhibere proteinsyntesen ved at Stx bindes til glykolipid-reseptorer på vertscellens cellemembran. Her endocytteres toksinet og transporteres til golgiapparatet og endoplasmisk reticulum. Deretter blir det translokert til cellecytosol. Her inaktiveres ribosomene ved at det enzymatisk aktive A1-fragmentet fra A-enheten frigjøres (Granum, 2008). Inhibering av proteinsyntesen er viktig i patogenesen til HUS. I tillegg kan Stx indusere syntesen av cytokiner og celledød. Skadene på endotelcellene fører til hemorrhagisk kolitt (Paton et al., 1998).

Shigatoksinene er delt i to undergrupper, Stx1 og Stx2. Stx1 er en homolog gruppe toksiner som er tilnærmet idenstiske med shigatoksinet til *Shigella dysenteriae*. Stx2 er en gruppe bestående av flere varianter shigatoksiner. STEC kan produsere Stx1 eller Stx2, eller begge typer og flere varianter av samme type. Stammer som koder for Stx2 er assosiert med HUS (Granum, 2008).

2.3.3 *E. coli* relatert til næringsmidler

I sykdomsutbrudd forårsaket av EHEC serotype O157:H7 er ofte malte kjøttprodukter som ikke er gjennomstekt involvert. Storfe er et viktig reservoar for bakterien og har blitt isolert fra 0,9-8,2 % av friskt storfe i Storbritannia. Utbrudd fra produkter med lav pH forekommer også, blant annet fra juice og spekepølse. Dette viser bakteriens evne til overlevelse ved lav pH over lengre tid, spesielt når produktet kjølelagres (Adams et al., 2000).

2.4 *Salmonella*

Bakterieslekten *Salmonella* tilhører familien *Enterobacteriaceae*. *Salmonella*-bakteriene deles inn i to arts grupper; *Salmonella bongori* og *Salmonella enterica*. Gruppen *S. bongori* består kun av noen få serovarianter isolert fra kaldblodige dyr. *S. enterica* består av ca 2500 serovarianter. Disse er fordelt på seks biokjemisk definerte underarter:

- Subspecies I: *enterica*
- Subspecies II: *salamae*
- Subspecies IIIa: *arizonae*
- Subspecies IIIb: *diarizonae*
- Subspecies IV: *houtenae*
- Subspecies V: *indica*

De fleste serovariantene tilhører subspecies I: *enterica*. De fleste sykdomsfremkallende serovariantene tilhører denne underarten (Granum, 2008).

Salmonella er en Gram-negativ, fakulativt anaerob, katalase-positiv, oksidase-negativ ikke-sporedannende stavbakterie som blant annet finnes i tarmen hos mennesker og de fleste dyr, på planter og i jord. Bakterien er vanligvis bevegelig da den har peritrike flageller (Bell, 2002).

Salmonella kan vokse mellom 5 og 47 °C, med vekstoptimum ved 37 °C. Bakterien er relativt varmesensitiv og drepes ved pasteurisering, men varmeresistensen vil variere avhengig av næringsmiddelet. Varmeresistensen øker ved høyt innhold av sukker og fett, og avtar med økende vanninnhold. Bakterien har også vist økt varmeresistens ved inntørking. Minimum a_w for vekst er 0,93. *Salmonella* kan vokse mellom pH 4,5 og 9,0, med pH optimum mellom 6,5 og 7,5 (Granum, 2008).

Salmonella sp. har generelt sett et bredt vertspektrum, dette omfatter mennesker og de fleste dyrearter. Bakteriene kan kolonisere tarmen og tilsøtende organer hos både ville og husdyr. Dyr kan være friske bærere og vil gjennom avføring skille ut store mengder av bakterien. Disse dyrene er en viktig faktor i spredningen av bakterien til næringskjeden (Granum, 2008).

2.4.1 Virulensfaktorer

Salmonella har en rekke kromosomale og plasmidbetingede virulensfaktorer, blant annet adheransefaktorer som fimbrier, invasivitetsfaktorer, enterotoksin og cytotoxin. De ulike serovariantene har forskjellige virulensfaktorer som forklarer serovariantenes varierende virulens, vertsspesifisitet og preferanse og symptomer ved utbrudd (Granum, 2008).

2.4.2 *Salmonella* relatert til næringsmidler

På verdensbasis er fjørfekjøtt, egg og svinekjøtt de viktigste smitekildene (Granum, 2008). Andre næringsmidler som også ofte knyttes til *Salmonella* utbrudd er melk. Næringsmidlene kan være utilstrekkelig varmebehandlet slik at bakteriene overlever, eller de kan krysskontaminere annen mat som spises uten å varmebehandles (Adams et al, 2000).

2.5 *Serratia*

Serratia sp. er en Gram-negativ, oksidase-negativ, fakultativt anaerobe stavbakterie. Bakterien tilhører familien *Enterobacteriaceae* (Grimont et al. 1984). *S.marcescens* er den viktigste sykdomsfremkallende arten av *Serratia*. Den er opportunistisk og er blant bakterieartene som forårsaker infeksjons utbrudd på sykehus (Anía, 2009).

S. marcescens kan nyttegjøre seg av en rekke næringsmidler, noe som tillater den å vokse under ekstreme forhold som desinfisering (Marrie et al., 1981, Parment et al., 1986).

Bakterien har blitt isolert fra matvarer, spesielt i varianter med høyt innhold av karbohydrater i form av stivelse (Sleigh, 1983).

Serratia har blitt isolert fra flere økologiske nisjer som jord, vann, luft, planter og dyr (Grimont et al., 1984). Siden bakterien kan vokse i ulike habitater kan den produsere ulike former for flageller, som gjør den i stand til å bevege seg i ulike vekstmedier (Alberti et al., 1990).

S. marcescens produserer en rekke ekstracellulære produkter som kitinase, flere proteaser, en nuklease og en lipase (Hines et al., 1988). Den produserer også en wetting agent, som er en forbindelse som senker overflatespenning og hjelper bakterien å kolonisere overflater (Matasuyama et al., 1985, Matasuyama et al., 1992, Matasuyama et al., 1986).

2.6 *Staphylococcus* sp.

Arten *Staphylococcus* tilhører familien *Micrococcaceae*. Bakteriene er Gram-positive kokker (Granum, 2008). Man kan dele arten i to grupper; koagulase negative og koagulase positive stafylokokker. *Staphylococcus aureus* stammer er generelt sett koagulase positive (Taponen et al., 2009).

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

St. aureus er i tillegg til å være Gram-positiv, fakultativ anaerob, oksidase negativ, katalase og koagulase-positiv (Adams et al., 2000).

St. aureus er mesofil med veksttemperatur mellom 7 og 48 °C, optimal veksttemperatur er 37 °C. Bakterien produserer enterotoksin, men dette forekommer kun mellom 35 og 40 °C. *St. aureus* kan vokse mellom pH 4,0 - 9,8, med optimal vekst pH mellom 6,0 - 7,0.

Enterotoksinproduksjon forekommer mellom pH 4,8 - 9,0, men toksinproduksjonen under pH 6,0 er liten. *St. aureus* kan vokse ved svært høye saltkonsentrasjoner, < 20 % NaCl, med optimum ved 0,5 - 4,0 %. Bakterien kan vokse ned mot a_w 0,83, og produsere enterotoksin ned til a_w 0,86 (Adams et al., 2000).

Hovedreservoaret for *St. aureus* er varmblodige dyr og mennesker. 20-50 % av mennesker er friske bærere av bakterien. Den er hovedsakelig lokalisert i nese og svelg, men er også blitt isolert fra hår og hud. *St. aureus* kan overleve og vokse i næringsmidler og miljø. Smitte skjer ofte fra menneske til næringsmiddel ved håndtering. Denne typen kontaminering er den vanligste årsaken til stafylokokkintoksikasjon, men næringsmidler kan også kontamineres fra uhygienisk produksjonsmiljø. For at næringsmidler skal forårsake stafylokokkintoksikasjon må vekstforholdene ligge til rette for oppformering av bakterien og toksinproduksjon (Granum, 2008).

2.6.1.1 Virulensfaktorer

Stafylokokkintoksikasjon skyldes preformert enterotoksin i næringsmidler. Enterotoksinene er proteiner med molekylvekt på 25-28 kDa. *St. aureus* produserer disse serologisk distinkte proteinene. SEA, B, C1, C2, C3, D og E er mest undersøkt. I ettertid har flere proteiner blitt oppdaget, men ikke alle disse har emetisk aktivitet (Granum, 2008).

Genetikken bak enterotoksinproduksjonen er ikke fullstendig kjent, men SEA-genet er båret av en bakteriofag integrert i kromosomet, SEB- og SEC1-genet er kromosombåret regulert av et plasmidgen, SED-genet er plasmidbåret og SEE er kromosombåret. Toksinene stimulerer brekningscenteret via nervesentra i tarmen, men mekanismen for årsaken til diaré er ikke kjent (Granum, 2008).

50-70 % av *St. aureus* produserer ett eller flere enterotoksiner. Disse skiller ut i mindre doser under eksponensiell vekst, men øker mot slutten av fasen og i stasjonærfasen. Det varierer når produksjonen av de ulike enterotoksinene starter, og mellom typer enterotoksiner og stammer på mengden som produseres (Granum, 2008).

2.6.1.2 *St. aureus* relatert til næringsmidler

Det er ikke uvanlig at *St. aureus* er tilstedet på næringsmidler i små mengder. Bakterien forekommer naturlig på fjørkre og annet rått kjøtt da det er en vanlig bakterie i den normale bakteriefloraen på skinnen. Den kan også isoleres fra melk, noen ganger i større mengder grunnet mastitt. Vanligvis utgjør bakterien ingen fare da den konkurrerer dårlig med andre bakterier og drepes av varmebehandling (Adams et al., 2000).

2.6.2 Koagulase Negative stafylokokker

Koagulase negative stafylokokker (KNS) er naturlig tilstede på menneskets hud og slimhinner og gir vanligvis ikke sykdom hos friske personer. De siste 20 årene har det vært en sterk økning i forekomsten av infeksjoner knyttet til KNS. Dette skyldes i hovedsak økt bruk av implanterte fremmedlegemer og økning i antall immunsuprimerte pasienter. KNS er i dag den hyppigste årsaken til sykehusinfeksjoner (Otto, 2004, von Eiff et al, 2002, Ziebuhr et al., 2006). Koagulase negative stafylokokker er også blant den dominerende bakteriefloraen på overflater i næringsmiddelindustrien (Møretrø et al. 2006).

For raskt å kunne skille *St. aureus* fra koagulase negative stafylokokker benyttes tester basert på koagulase produksjon og thermonuclease reaksjon (Huebner et al., 1999). For å identifisere KNS stammer benyttes fenotypiske og genotypiske metoder. De genotypiske metodene har vist seg å gi de mest nøyaktige resultatene, men fenotypiske metoder har vist seg å gi et akseptabelt nivå av identifisering når det benyttes i rutinearbeid (Heikens et al., 2005).

Koagulase negative stafylokokker produserer få virulensfaktorer (Otto,2004), men den viktigste virulensfaktoren for KNS er biofilmproduksjon (Costerton et al., 1999).

2.7 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes er en Gram-positiv, fakultativt anaerob, katalase-positiv, oksidase-negativ, ikke-sporedannende, kokkoid stavbakterie (Adams et al., 2000). Bakterien tilhører slekten *Listeria*. Denne slekten inneholder seks arter, hvorav to er sykdomsfremkallende; *L. monocytogenes* og *L. ivanovii*. *L. ivanovii* sees stort sett hos småfe, men det er rapportert om tilfeller hos mennesker. *L. monocytogenes* er sykdomsfremkallende hos både mennesker og dyr (Granum, 2008).

L. monocytogenes kan vokse fra 0 til 42 °C, med vekstoptimum mellom 30-35 °C. Under 5 °C vokser bakterien derimot svært sakte, med en generasjonstid opptil 130 timer (Adams et al. 2000). Bakterien overlever ikke pasteurisering og blir inaktivert i kjøttprodukter som varmebehandles til 70 °C i to minutter. Vekst forekommer mellom pH 6 og 9. Siden bakterien er fakultativt anaerob og mikroaerofil kan den vokse i vakuumpakninger og modifisert atmosfære (Granum, 2008). *L. monocytogenes* er svært salttolerant og kan vokse ved 10 % NaCl og overleve opptil et år ved 16 % NaCl (Adams et al. 2000).

L. monocytogenes er en ubikvitær bakterie og har blitt isolert fra blant annet jord, vann og kloakk. Mennesker og dyr kan være friske bærere og kan bringe bakterien inn i næringsmiddelbedrifter hvor den lett etablerer reservoarer ved å adherere til flater av rustfritt stål, glass og ulike plastmaterialer og danne biofilm. For å fjerne *L. monocytogenes* fra utstyr og miljø i en næringsmiddelbedrift kreves grundig rengjøringsrutiner med mekanisk rengjøring (Granum, 2008).

For inndeling i subtyper kan ulike typingsmetoder benyttes, serotyping og fagtyping. Serotyping begrenses av at det kun forekommer tre serotyper (1/2a, 1/2b og 4b) hos mennesker, dyr og i næringsmidler. Fagtyping lar seg ikke gjøre med alle isolater og virker også begrensende for å avklare eventuelle smitteveier. Det har derimot blitt utviklet molekylærbiologiske metoder som egner seg bedre til dette. Mest brukt er PFGE (puls felt gel elektroforese). Denne metoden benyttes på kromosomale DNA-fragmenter, noe som gir god

differensiering av isolater. Andre molekylærbiologiske metoder som kan benyttes er automatisert ribotyping og ulike metoder basert på PCA og sekvensering (Granum, 2008).

2.7.1 Virulensfaktorer

L. monocytogenes kan forårsake to former for listeriose; invasiv listeriose og febril gastroenteritt. Ved invasiv listeriose passerer bakterien den intestinale barrieren og fraktes med blod eller lymfe til lever, milt og mesenteriale lymfeknuter. Her vil de elimineres eller reduseres i antall av makrofager. Eventuelt overlevende bakterier vil kunne seg mellom hepatocytene og komme over i blodbanen. Dette kan føre til sepsis og spredning til sentralnervesystemet, placenta og foster. Ved febril gastroenteritt invaderer bakterien tarmens epitelceller, for så å formere seg og spre seg fra celle til celle. Det er ikke klarlagt hvorfor man i ulike tilfeller utvikler disse to forskjellige formene for listeriose, men ulike virulensstrekk hos stammene kan være årsaken (Granum, 2008).

Overflateproteinet internalin (A og B) gjør det mulig for *L. monocytogenes* å trenge inn i ikke-fagosyterende celler, for eksempel epitelceller.

Listeriolysin O gjør det mulig for bakterien å frigjøre seg fra fagosomet når den er fagosyttert av makrofager. *L. monocytogenes* vil da formere seg i cellens cytoplasma (Granum, 2008).

2.7.2 *L. monocytogenes* relatert til næringsmidler

L. monocytogenes brede forekomst i miljøet og dens evne til å vokse på de fleste næringsmidler gir bakterien god mulighet til å komme inn i næringskjeden og formere seg. Stor sykdomsutbrudd på grunn av *L. monocytogenes* har forekommet på kålsalat i Canada, serotype 4b og på rå grønnsaker brukt som garnityr på sykehus i Boston, USA. Generelt har serotype 1 dominert på kjøtt og kjøttprodukter og har forårsaket en rekke utbrudd verden over. Bakteriens høye toleranse for salt gjør at den har blitt isolert fra en rekke behandlede kjøttprodukter som salami og paté. I tillegg har meieriprodukter som upasteurisert melk, pasteurisert melk og myke oster forårsaket en rekke sykdomsutbrudd. Smitten kommer ofte med melken fra kuer med storfe listeriose (Adams, 2000).

3. Materialer og metoder

3.1 Medier og løsninger

3.1.1 Medier

Følgende medier ble benyttet i oppgaven:

- Tryptone soya agar, TSA (Oxoid, Hampshire, England)
- Tryptone soya broth, TSB (Oxoid)
- Standard plate count agar, PCA (Oxoid)
- Agar bacteriological (Oxoid)

Mediene ble sterilisert ved autoklaving ved 121 °C i 15 minutter. Flasker med buljong og softagar ble lagret på flaske ved romtemperatur. Agarskåler ble lagret ved 4 °C.

Tilberedning av medier som ble benyttet i oppgaven er beskrevet i vedlegg 1.

3.1.2 Løsninger

Løsning benyttet til mikroskopering

- 0,02 % Acridine orange

Saltløsning benyttet til å skape atmosfære med 70 % relativ luftfuktighet

Det ble benyttet mettet løsning av

- Litium acetat 99,99 % (LiAc, Aldrich)

Løsninger benyttet til sterilisering

- 80 % etanol

Løsninger benyttet til svabring og fortynning

- 0,1 % Peptonvann(Bacteriological peptone, Oxoid)

Løsninger benyttet til hemmetester

- 200 ppm Triclosan USP(Ciba Specialty Chemicals, Ludwigshafen, Tyskland)
- 500 ppm sølvnitrat(VWR international, Poole, England)

Tilberedning av løsninger som ble benyttet i oppgaven er beskrevet i vedlegg 1.

3.2 Bakteriestammer

Stammer av fire arter sykdomsfremkallende bakterier ble benyttet i forsøkene; *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* og *L. monocytogenes*. I tillegg ble fem stammer av koagulase negative *Staphylococcus* sp. og av *Serratia* valgt da disse har vist seg å være blant den dominerende mikrofloraen på overflater i næringsmiddelindustrien (Møretrø et al., 2006). Stammene er beskrevet i tabell 3.1.

Tabell 3.1 Bakteriestammer som ble benyttet i forsøkene

<i>Bakterie stamme</i>	<i>Stammenummer (Nofima)</i>	<i>Stammekarakteristikk/ opprinnelse</i>	<i>Annen betegnelse</i>	<i>Referanse</i>
<i>E. coli</i>	MF2494	O103:H25 <i>stx</i> 2, utbrudd fra spekepølse I Norge, 2006	734	(Schimmer, Nygard et al. 2008)
<i>E. coli</i>	MF2496	O157:H7	EDL933	ATCC*
<i>E. coli</i>	MF2892	O157:H7 <i>stx</i> 1+2, hamburger	ATCC43895	ATCC
<i>E. coli</i>	MF2411	O111:H-, mettwurst/salami	374-02	(Ross and Shadbolt 2001; Nesse, Nordby et al. 2003)
<i>E. coli</i>	MF3582	O157:H-, menneske. Utbruddsstamme januar-mars 2009	1109-0621-1	Mottatt fra professor Georg Kapperud, nasjonalt folkehelseinstitutt
<i>Salmonella agona</i>	MF2409	Fra dyrefôr fabrikk	71-4	Vestby et al., 2009
<i>Salmonella senftenberg</i>	MF2098	Fra fiskefôr fabrikk	1702-1	Nesse, Nordby et al., 2003
<i>Salmonella montevideo</i>	MF2096	Fra fiskefôr fabrikk	1900	(Nesse, Nordby et al. 2003)
<i>Salmonella typhimurium</i>	MF2113	Laboratoriums stamme	ATCC14028	ATCC*
<i>Salmonella enteritidis</i>	MF3534	Laboratoriums stamme	ATCC13076	ATCC*
<i>Listeria monocytogenes</i>	MF3132	Serotype 1/2b, eltemaskin	1/2S	Mottatt fra Dr. Michel Hebraud, INRA, Clermont-Ferrand, Frankrike
<i>Listeria monocytogenes</i>	MF3131	Serotype 1/2a, spekepølse	1/2aV2	
<i>Listeria monocytogenes</i>	MF3134	Serotype 1/2c, transportbånd	1/2cS	
<i>Listeria monocytogenes</i>	MF1509	Serotype 4b, pasteurisert melk	Scott A, ILSI 1, CCUG32843	ILSI**
<i>Listeria monocytogenes</i>	MF 3643	Utbrudd, Camembert ost	1107-3031	Mottatt fra Folkehelseinstituttet, okt-09
<i>Staphylococcus aureus</i>	MF3675	Sjømat	50076	

<i>Staphylococcus aureus</i>	MF3674	Sjømat	585	
<i>Staphylococcus aureus</i>	MF1981		ATCC12600	ATCC*
<i>Staphylococcus aureus</i>	50583	Isolert fra pizza		Rode et al., 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	50089	Isolert fra geitost		Rode et al., 2007
<i>Staphylococcus</i> sp. (KNS)	0812_15-8	Fiskefôr fabrikk		Habimana, ikke publisert
<i>Staphylococcus</i> sp. (KNS)	0812_9-10	Fiskefôr fabrikk		Habimana, ikke publisert
<i>St. simulans</i>	MF3625	Storfe slakteri	15.1	Heir, unpublished
<i>St. epidermidis</i>	MF1892	ATCC	ATCC35894	ATCC*
<i>St. cohnii</i>	MF3624	Storfe slakteri	8.9sp/cohnii	Heir, unpublished
<i>Serratia</i> sp.	MF3324	Gulv inneholdende Triclosan, fjørfebedrift	34B	(Møretrø, Sonerud et al. 2006)
<i>Serratia proteamaculans</i>	MF3626	Småfe slakteri	108.1	Heir, unpublished
<i>Serratia</i> sp.	MF3309	Hygiene prøve, desinfiserende fotbad		(Langsrud, Møretrø et al. 2003)
<i>Serratia</i> sp.	MF2602	ATCC stamme		ATCC*
<i>S. marcescens</i>	MF2336	Hygiene prøve, desifiserende fotbad	N9	(Langsrud, Møretrø et al. 2003)

*ATCC = American Type Culture Collection

**ILSI = L. monocytogenes strain collection, International Life Sciences Institute

(<http://www.foodscience.cornell.edu/wiedmann/listeriadb.htm>)

3.2.1 Oppbevaring og dyrking av bakterier

De ulike stammene ble oppbevart i eppendorfrør med vekstmedium og 20 % glyserol ved -80 °C. De fryste stammene ble med podeøse strøket ut på petriskåler med TSA og inkubert ved 30 °C i 24 timer ± 2. Enkeltkolonier på skålene ble deretter podet over til rør med TSB, og inkubert over natt ved 30 °C. Dette vil omtales som overnattkultur. Agarskåler med oppdyrkede kolonier ble oppbevart på 4 °C. I tillegg ble 1ml av overnattkulturene overført til eppendorfrør og tilsatt 20 % glyserol for deretter å bli oppbevart ved -20 °C.

3.3 Antimikrobielt materiale

I det innledende forsøket av overlevelse av patogene bakterier på antimikrobielle overflater ble det benyttet fem skjærebrett i plast med antatt antimikrobiell effekt, to skjærebrett ikke tilsatt antimikrobiell forbindelse (kontroller) og to skjærebrett i ulike typer tre. Skjærebrettene er beskrevet i tabell 3.2.

Tabell 3.2 Skjærebrettene som ble benyttet i forsøkene

<i>Produsent/leverandør</i>	<i>Produkt navn</i>	<i>Materiale</i>	<i>Antimikrobielt virkestoff</i>	<i>Farge</i>	<i>Kode</i>
TVL international, LLC (Charlotte, USA)	Antimicrobial BBQ cutting board	Plast	Sølv	Gul	S1
Bio Guard (Chanhassen, Minnesota, USA)	Bio Guard	Plast	Sølv	Grå	S2
Küchenprofi (Solingen, Tyskland)	Schneidbrett »Nano Silver«	Plast	Sølv	Hvit	S3
gave-tips.no	Skjærebrett av antibakterielt materiale	Plast	Ukjent	Grønn	S4
C & K manufacturing & sales co., LLC (Westlake, Ohio, USA)	Chef's edge cutting board, Microban	Plast	Triklosan	Rød	M1
Daloplast (Gnosjö, Sverige)	Johanna 2-pack skärbräda	Plast	-	Hvit	K1
Zyliss – Swiss innovation (Irvine, Canada)	Cutting board	Plast	-	Grønn	K2
Clas Olsson (Polen)	Capere cuttingboard	Bøk	-	Tre	T1
Søstrene Grene (Danmark)	Skjærebrett	Bambus	-	Tre	T2

I forsøkene hvor overlevelse og vekst av sykdomsfremkallende bakterier på antimikrobielle overflater ble undersøkt, samt ved testing agardiffusjonsforsøk ble samtlige kuponger av plast benyttet, mens kupongene av tre ble ekskludert.

I innledende forsøk og ved testing av overlevelse av sykdomsfremkallende bakterier på antimikrobielle overflater ble skjærebrettene kuttet opp til kuponger som målte 4 x 6 cm. Kupongene ble rutet opp i seks ruter som målte 2 x 2 cm. Størrelse samt ruteinndeling og plassering av de ulike bakteriesuspensjonene er angitt i figur 3.3.

Ved agardiffusjonsforsøk ble kuponger på ca 2 x 2 cm benyttet.

3.4 Sterilisering av kuponger

Alle kupongene som ble benyttet i forsøkene ble sterilisert i 80 % etanol i 15 minutter. Deretter ble kupongene skylt i sterilt destillert vann og tørket i sterilbenk.

3.5 Innledende forsøk

For å finne det beste oppsettet for forsøket ble det gjennomført forforsøk. Effekten av svabring ble testet ved å pipettere fire dråper à 20µl på en rute og la dette tørke en time. Deretter ble ruten svabret med tre vattpinner dyppet i peptonvann. Ruten ble farget med 0,02 % Acridine orange og mikroskopert for å kontrollere tilstedeværelsen av organisk materiale etter svabring.

De fem stammene av hver bakterie ble blandet sammen ved å overføre 1 ml av hver overnattkultur til et tomt, sterilt rør. Bakteriesuspensjonene ble blandet godt og deretter fortynnet 10 ganger i nytt dyrkingsmedium, TSB. Fire dråper à 20µl av hver bakteriesuspensjon ble pipettert ut på tre sterile kuponger av hver type. Kupongene med bakteriesuspensjon sto deretter til tørking i sterilbenk i 1 time. To kuponger av hver type ble så overført til lufttette bokser inneholdende en åpen petriskål med henholdsvis 20ml destillert vann eller 20ml mett litiumacetatløsning. Boksene ble påsatt lokk og inkubert ved 25 °C i ett døgn. Den tredje kupongen ble svabret med tre vattpinner dyppet i peptonvann. Røret med de tre vattpinnene ble vortexet, deretter ble det laget fortynningsrekker og utplating ble gjort med Whitley Automatic Spiral Plater (WASP, Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, England). Skålene ble inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer og deretter avlest. Samme prosedyre ble fulgt for kupongene etter å ha vært inkubert i boksene i et døgn.

3.6 Overlevelse av matrelaterte bakterier på antimikrobielle overflater

I dette forsøket ble vekst/overlevelsessevnen til bakteriesuspensjoner av *E. coli*, *Salmonella*, *Serratia*, koagulase negative stafylokokker, *St. aureus* og *L. monocytogenes* på antimikrobielle overflater og ved ulik relativ fuktighet undersøkt. Kuponger av alle de antimikrobielle materialene og de to typene kontroll kuponger av plast ble benyttet i dette forsøket. Forsøket ble utført to ganger, i tillegg ble det gjort et tredje gjentak for enkelte bakteriesuspensjoner og kupongtyper, der variasjon mellom gjentakene var store.

3.6.1 Antall bakterier før påføring på antimikrobielt materiale

For å kunne beregne i hvilken grad bakteriene overlevde på de antimikrobielle materialene ble det undersøkt hvor mange bakterier det var i bakteriesuspensjonene av overnattekulturene. Det ble laget fortynningsrekker i peptonvann av hver bakteriesuspensjon. Hver bakteriesuspensjon ble platet ut ved hjelp av WASP på petriskåler med TSA. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer og ble deretter avlest.

3.6.2 Påføring av bakteriesuspensjon på kuponger

De fem stammene av hver bakterie ble blandet sammen ved å overføre 1ml av hver overnattekultur til et tomt, sterilt rør. Bakteriesuspensjonen ble blandet godt og fortynnet 10 ganger i nytt dyrkingsmedium, TSB. Hver rute ble tilført fire dråper à 20µl fortynnet bakteriesuspensjon. Det ble benyttet fire kuponger av hver type i hvert forsøk.

3.6.3 Inkubering av kuponger

Etter påføring av bakteriesuspensjon ble kupongene lagt i lufttette bokser uten først å tørke. To bokser inneholdt en åpen petriskål med 20 ml destillert vann og to bokser inneholdt en åpen petriskål med 20 ml mettet litiumacetatløsning. En kupong av hver type materiale ble plassert i hver av de fire boksene. Boksene ble lukket og inkubert ved 25 °C. En boks med destillert vann og en boks med mettet litiumacetatløsning ble inkubert i 24 timer, mens de to andre boksene ble inkubert i 72 timer.

3.6.4 Beregning av antall overlevende bakterier

Etter endt inkubering ble kupongene tatt ut av boksene og hver rute ble svabret med tre vattpinner dyppet i peptonvann. Vattpinnene ble overført til rør med 4,5 ml peptonvann. Røret ble vortexet og det ble laget fortynningsrekker og gjort utsæd ved bruk av WASP på skåler med TSA. Skålene ble inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer og ble deretter telt.

3.7 Hemmetest – Minste Inhiberende Konsentrasjon

Testen ble utført i et mikrotitrerbrett med 96 brønner. Alle brønnene i brettet ble fylt med 100 µl vekstmedium. Til kolonne 1 ble det tilsatt 100 µl ekstra vekstmedium. Denne kolonnen var kontroll på ikke vekst. Til kolonne 3 ble det tilsatt 100 µl av forbindelsen det skulle testes MIC for, henholdsvis triclosan i de fire øverste brønnene og sølvnitrat i de fire nederste brønnene. Deretter ble 100 µl av innholdet i kolonne 3 overført til kolonne 4. Løsningene ble blandet før 100 µl ble overført til kolonne 5. Dette ble gjentatt for alle kolonnene på brettet. Til slutt ble 100 µl tatt ut av kolonne 12 og kastet.

To overnattekulturer ble benyttet per mikrotitrerbrett. Overnattekulturene ble fortynnet 1000 ganger i nytt vekstmedium, TSB. Deretter ble det tilsatt 100 µl bakteriesuspensjon i alle brønnene fra kolonne 2 til 12. I kolonne 2 ble det kun tilsatt bakteriesuspensjon til vekstmediet. Denne kolonnen var kontroll på full vekst. En bakteriesuspensjon ble tilsatt i radene A, B, E og F, mens den andre bakteriesuspensjonen ble tilsatt i radene C, D, G og H.

Da bakteriesuspensjon var tilsatt alle brønnene ble brettet målt i en mikrotitrerbrettleser ved 340 nm og deretter inkubert ved 30 °C i 18 timer. Deretter ble brettet på nytt avlest. Minste inhiberende konsentrasjon (MIC) ble beregnet som den laveste konsentrasjonen der det ikke var vekst.

3.8 Hemmetest – agardiffusjonsforsøk

3.8.1 Innledende forsøk

Kuponger på 2x2 cm av alle typer ble sterilisert i 80 % etanol i 15 minutter og festet i petriskåler med dobbeltsidig tape.

Blandinger av overnattekulturer av alle stammene ble benyttet. De fem stammene av samme bakterietype ble tilsatt en flaske 0,7 % softagar. Totalt ble 20 ml bakteriesuspensjon tilsatt 400 ml softagar. Deretter ble suspensjonen av softagar iblandet bakterier helt over kupongene til de var helt dekket. Da agaren hadde stivnet ble skålene inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer. Etter endt inkubasjon ble eventuelle hemmingssoner målt.

3.8.2 Agardiffusjonsforsøk med Microbankuponger (M1)

Kuponger på 2x2 cm av typen Microban ble sterilisert i 80 % etanol i 15 minutter og festet i petriskåler med dobbeltsidig tape. For microbankupongene ble stammene testet enkeltvis i agardiffusjonsforsøk.

40 ml softagar ble helt over på 50 ml sentrifugerør og tilsatt med 2 ml av en stammes overnattekultur. Deretter ble softagaren helt over en Microbankupong til den var helt dekket. Da agaren hadde stivnet ble skålene inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer. Etter endt inkubasjon ble eventuelle hemmingssoner målt.

3.8.3 Agardiffusjon med vaskede Microbankuponger

Tre kuponger på 2x2 cm av typen Microban ble vasket i en oppvaskmaskin (Elektrolux) i en vanlig husholdning sammen med annen vask. Kupongene ble vasket 6 til 7 ganger per uke over en periode på 2 måneder. Det ble benyttet et vaskeprogram av ca 1 times varighet der vasketemperaturen var 50 °C. Det ble benyttet vasketabletter (Sun, Lilleborg AS, Oslo) inneholdende 5-15 % oksygenbasert blekemiddel, <5 % ikke-ioniske overflateaktive stoffer, <5 % polykarboksylat, <5 % enzymer, <5 % linalool, <5 % benzylsalicat og <5 % citronellol.

Deretter ble kupongene behandlet som beskrevet i avsnitt 3.7.2. Tre kuponger som ikke hadde gått igjennom vaskeregimet ble benyttet som kontroller. Bakterien *St. aureus* (MF 3674) ble benyttet på alle kupongene.

3.9 Antimikrobiell effekt på kyllingfilets naturlige bakterieflora

I forsøket ble kuponger av Microban (M1), kuponger med sølv (S2) og de to kontrollene benyttet. Tre kuponger av hver type materiale ble sterilisert som beskrevet i avsnitt 3.4.

3.9.1 Kyllingfilet kontroller

To pakker à 650g kyllingfilet fra Prior ble benyttet. Kyllingfiletene ble overført til en steril stomacherpose og blandet godt. To kyllingfileter ble benyttet som kontroller for bakterietallet på ubehandlet kyllingfilet. Et stykke av overflaten på 4 x 6 cm ble skåret av hver filet og fortynnet 100 ganger med peptonvann før dette ble homogenisert. Av de homogeniserte løsningene ble det laget fortynningsrekker og utplating ble gjort på skåler med PCA ved hjelp av WASP. Skålene ble inkubert ved 25 °C i 48 ± 2 timer.

3.9.2 Eksponering av kyllingfilet på kuponger

En kyllingfilet ble deretter lagt over to sterile kuponger av samme type materiale slik at kupongene var fullstendig dekket. Kupongene ble eksponert for kyllingfilet i én time i sterilbenk.

3.9.3 Beregning av antall bakterier på kuponger og kyllingfilter

Kyllingfiletene ble etter én time tatt av kupongene. Hver kupong ble svabret med tre vattpinner dyppet i peptonvann. Vattpinnene ble deretter overført til et rør med peptonvann. Røret ble vortexet og det ble laget fortynningsrekke. Dette ble pløtet ut på skåler med PCA ved hjelp av WASP. Skålene ble inkubert ved 25 °C i 48 ± 2 timer.

De to eksponerte områdene på hver kyllingfilet ble skåret av og fortynnet 100 ganger med peptonvann. Deretter ble dette homogenisert. Av de homogeniserte løsningene ble det laget fortynningsrekker og utplating på PCA skåler ble foretatt med WASP. Skålene ble inkubert ved 25 °C i 48 ± 2 timer.

Etter endt inkubering ble alle skålene telt og resultatene sammenlignet.

Forsøket ble gjennomført to ganger.

3.10 Statistiske metoder

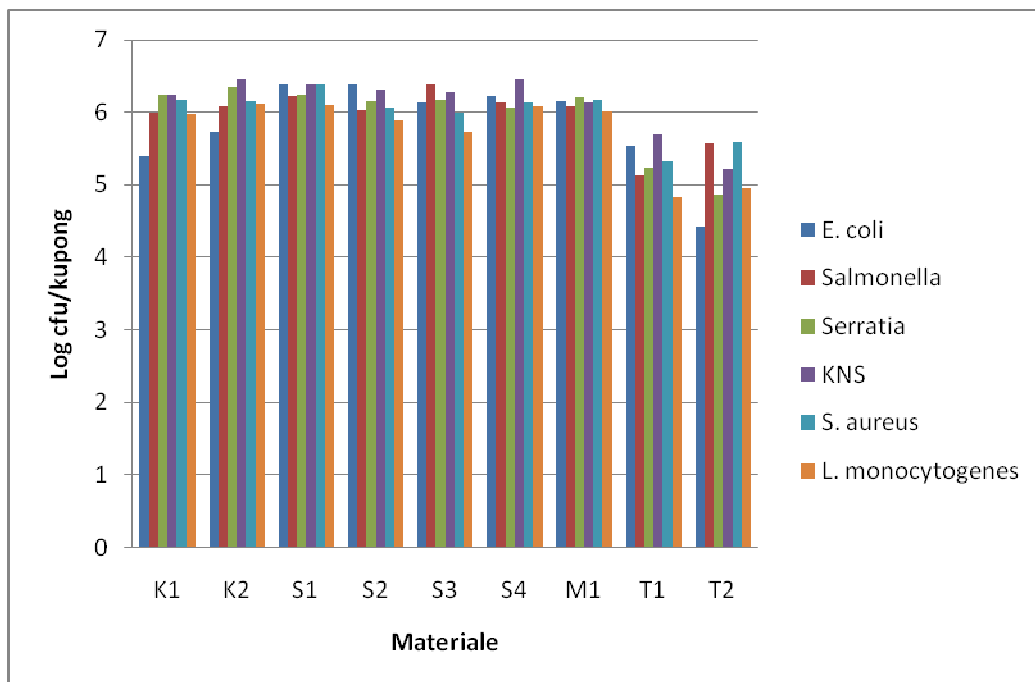
MINITAB™ ble benyttet til statistiske beregninger av datamaterialet. Det ble brukt et signifikansnivå på 5 % ($p < 0,05$). Resultatene av de statistiske beregningene er lagt ved i vedlegg 3.

4 Resultater

Rådata brukt til fremstilling av grafer og tabeller er vedlagt i vedlegg 2.

4.1 Innledende forsøk

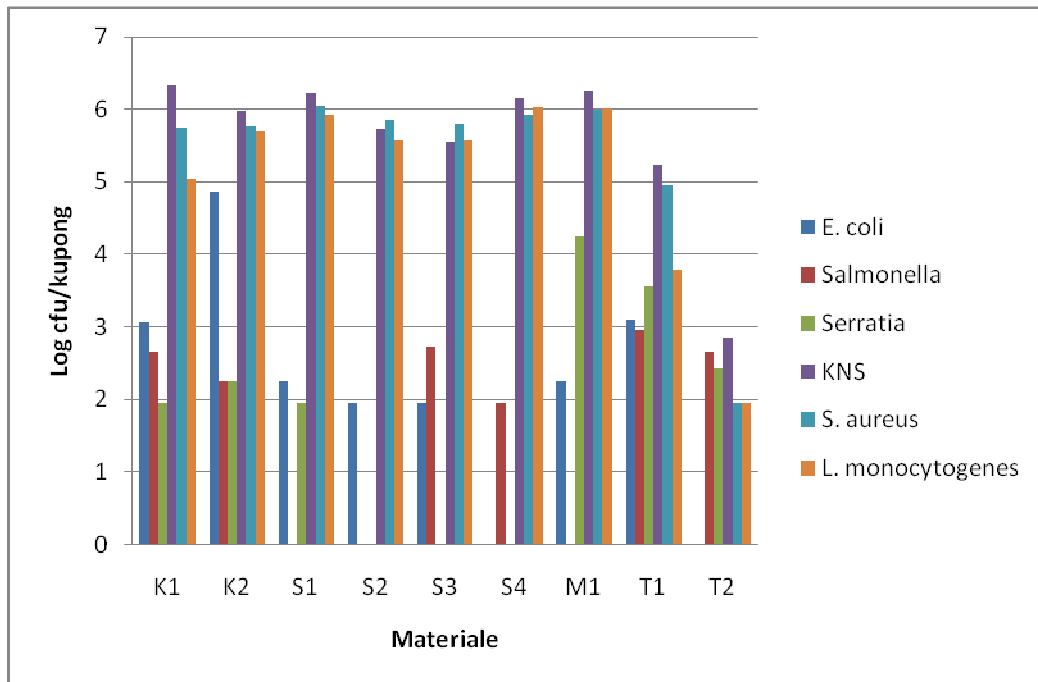
Ved det innledende forsøket ble det ikke observert en tydelig antimikrobiell effekt.



Figur 4.1 Overlevelse av bakterier etter tørking i én time i sterilbenk.

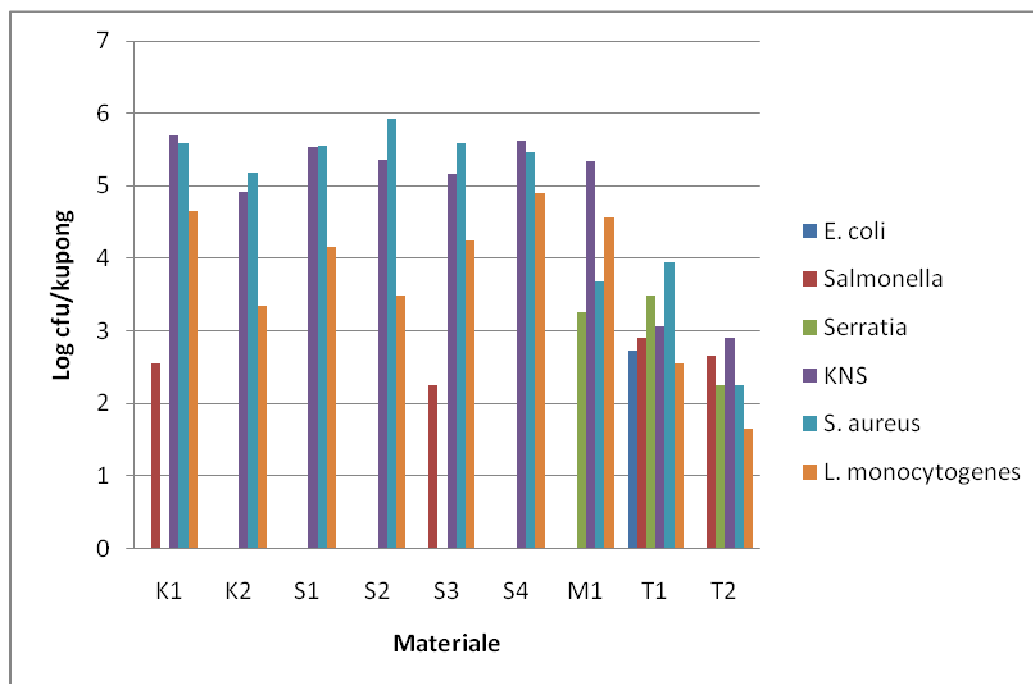
Det ble gjennomført et forsøk der bakteriesuspensjonene lå til tørking i én time etter å ha blitt pipettert ut på kupongene. Log CFU/kupong før tørking var ca 7 for de ulike bakteriesuspensjonene. Det ble observert en nedgang på ca 1 Log₁₀ for de fleste bakteriesuspensjonene på kupongmaterialer av plast etter en times inntørking, det vil si en reduksjon på 90 %. Figur 4.1 viser at kupongene av tre hadde den største nedgangen etter én time.

Figur 4.2 og 4.3 viser at bakterietallet for enkelte suspensjoner er svært lavt. Deteksjonsgrensen var 20, det vil si at bakterietallet i disse prøvene var <20.



Figur 4.2 Overlevelse av bakterier etter 24 timer ved 25 °C i 100 % relativ fuktighet.

Figur 4.2 viser at drapseffekten etter 24 timer ved 100 % relativ fuktighet har vært stor for enkelte bakterier. Gram-negative bakterier hadde generelt sett den største nedgangen, med unntak av på bambuskupongen. Antall Gram-positive bakterier var i de fleste tilfeller nokså lik resultatet etter én times tørking. Bakterietallet på bøk (T1) ble redusert med 2-4 log₁₀, mens det på bambus var redusert med 4-5 log₁₀.



Figur 4.3 Overlevelse av bakterier inkubert i 24 timer ved 25 °C i 70 % relativ fuktighet.

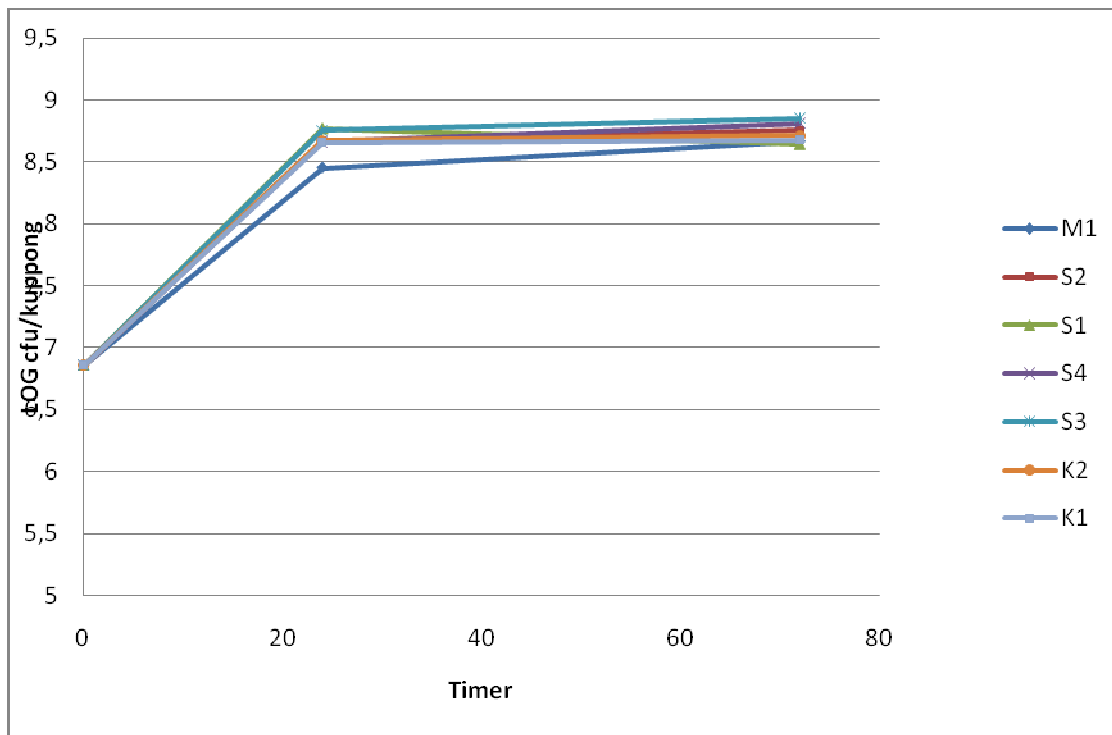
Figur 4.3 viser at de Gram-negative bakteriene hadde den største nedgangen etter 24 timers inkubering ved 70 % relativ fuktighet. De Gram-positive bakteriene hadde en større nedgang i antall enn ved 100 % relativ fuktighet, dette gjaldt spesielt for *L. monocytogenes*. Alle bakteriene hadde blitt redusert kraftig i antall på de to trekupongene, 3-4 log₁₀ på bøk og 4-5 log₁₀ på bambus.

Det ble observert at for trekupongene trakk fuktigheten inn i treverket. Dette gjorde at det var vanskelig å beregne antall bakterier etter svabring. Derfor ble de to kupongtypene av tre eliminert fra videre forsøk.

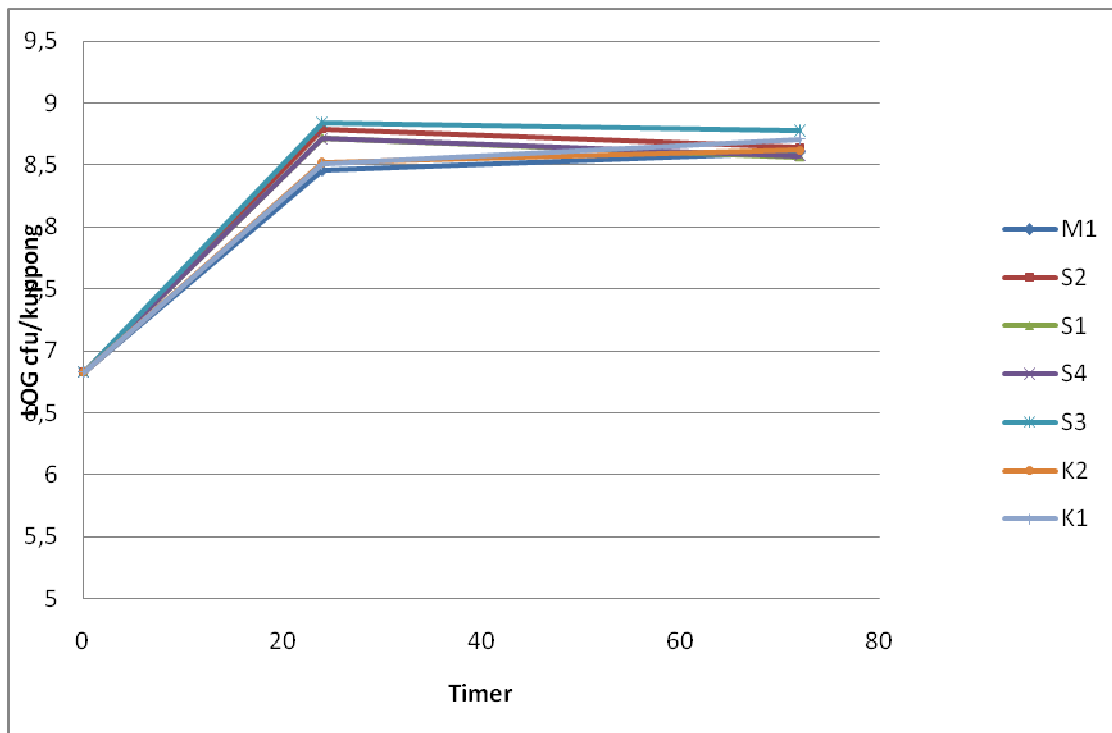
4.2 Vekst og overlevelse av matrelaterte bakterier på antimikrobielle overflater

I motsetning til forsøket beskrevet over, ble i dette tilfellet kupongene lagt rett i boksene etter applisering av bakteriesuspensjon, uten forutgående tørke-trinn. Grunnen til dette var at det ved innledende tørke-trinn var så stort drap på kontroll at det var vanskelig å kunne evaluere eventuell antimikrobiell effekt. I dette forsøket ble kupongenes antimikrobielle effekt testet ved 100 % og 70 % relativ fuktighet i 24 og 72 timer ved 25 °C. Prosedyren for forsøket er beskrevet i avsnitt 3.6.

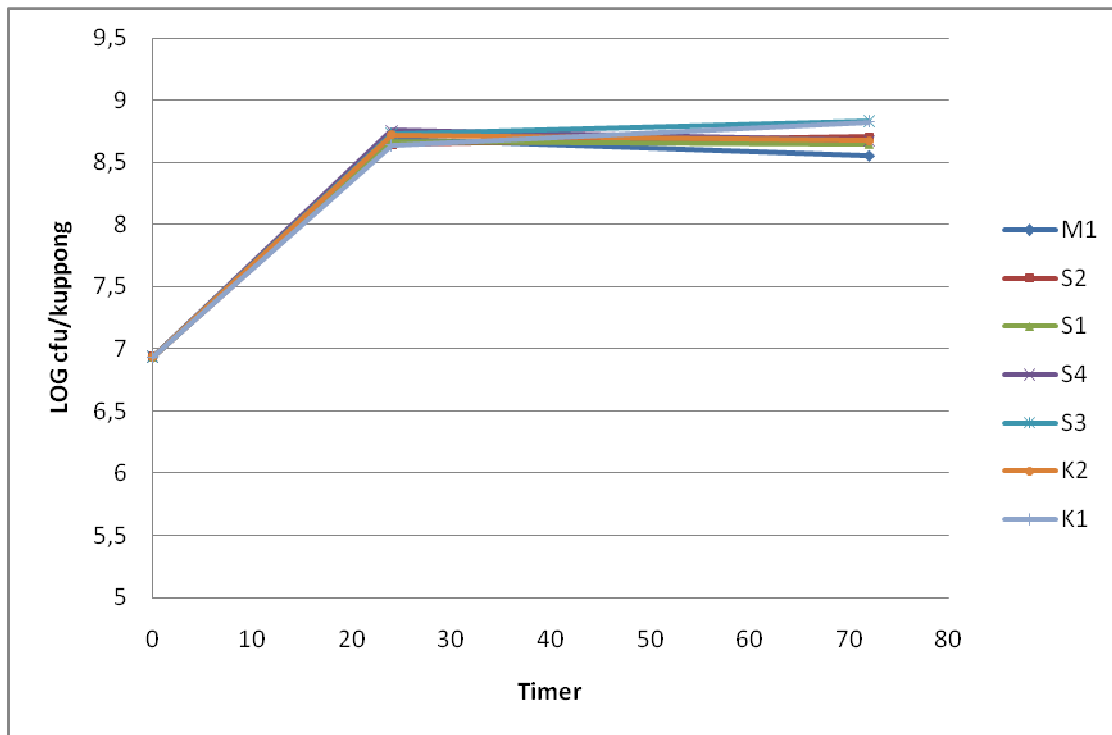
A



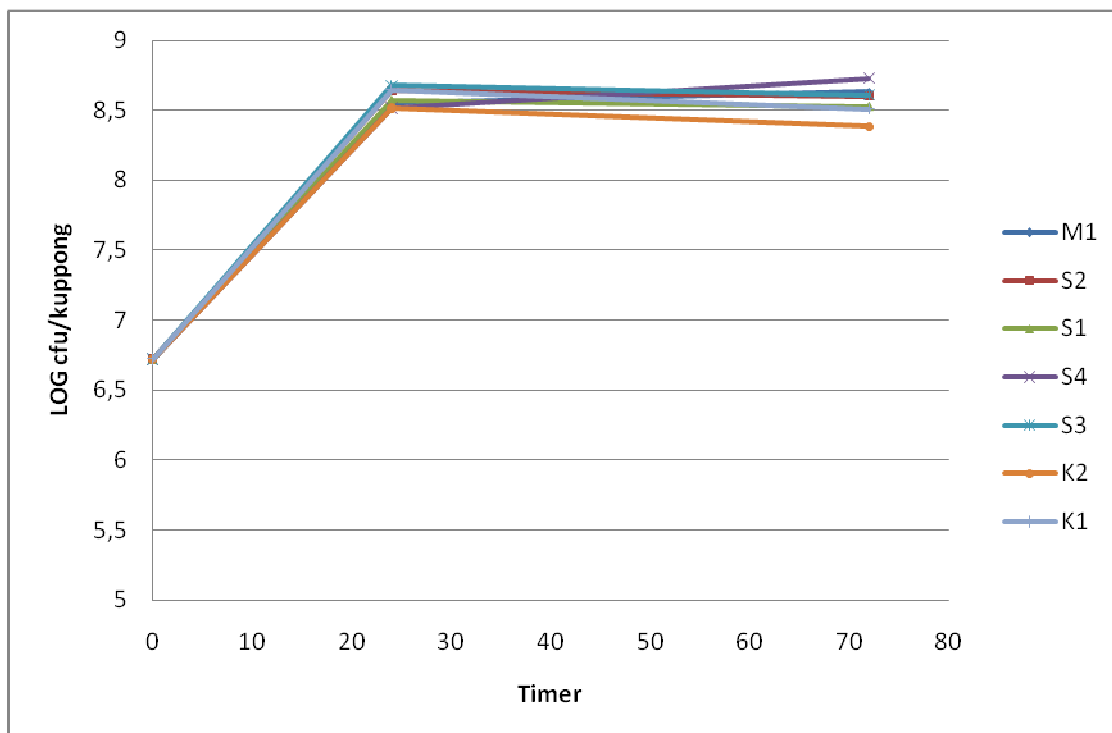
B



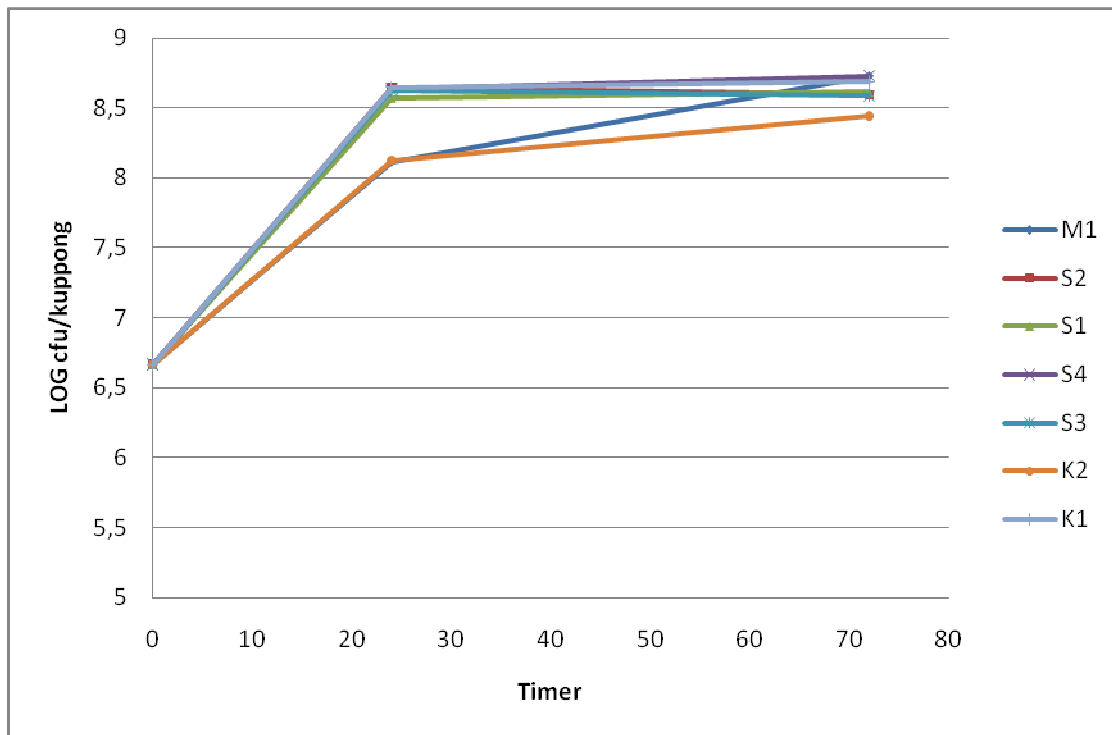
C



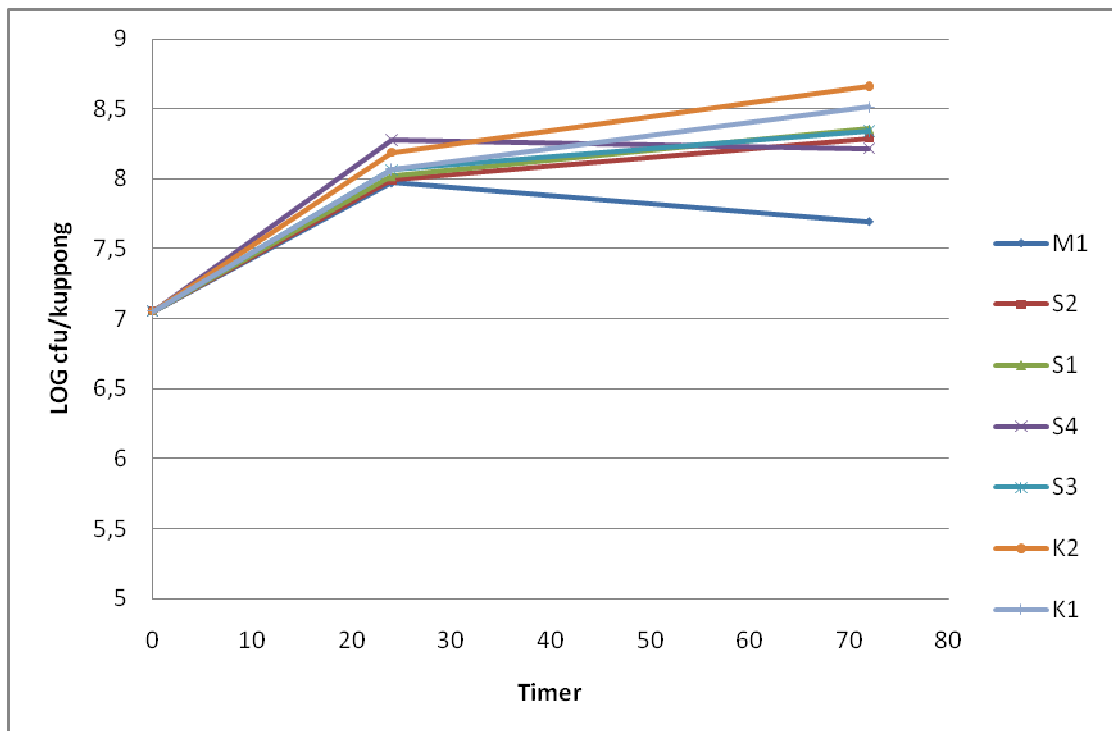
D



E



F

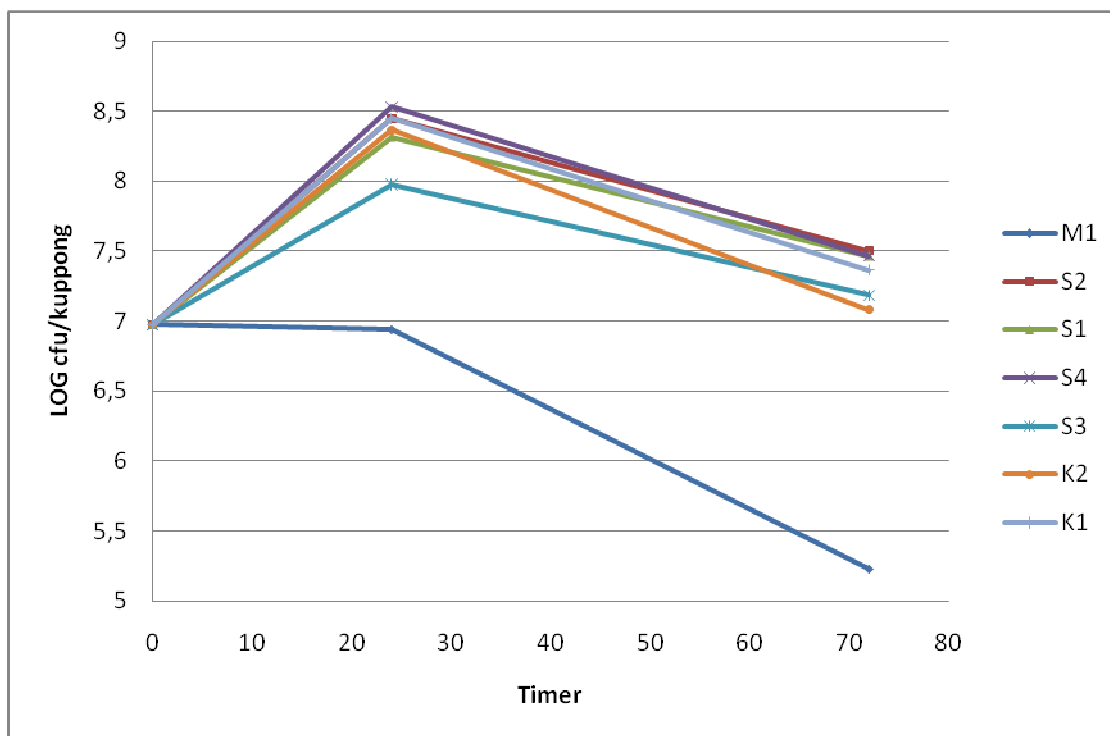


Figur 4.4 Forløp etter inkubasjon i 24 og 72 timer ved 25 °C i 100 % relativ fuktighet for A; *E. coli*, B; *Salmonella*, C; *Serratia*, D; koagulase negative *Staphylococcus* sp. E; *St. aureus*, F; *L. monocytogenes*. Log cfu/kuppong er angitt. Data er gjennomsnitt av utførte gjentak for

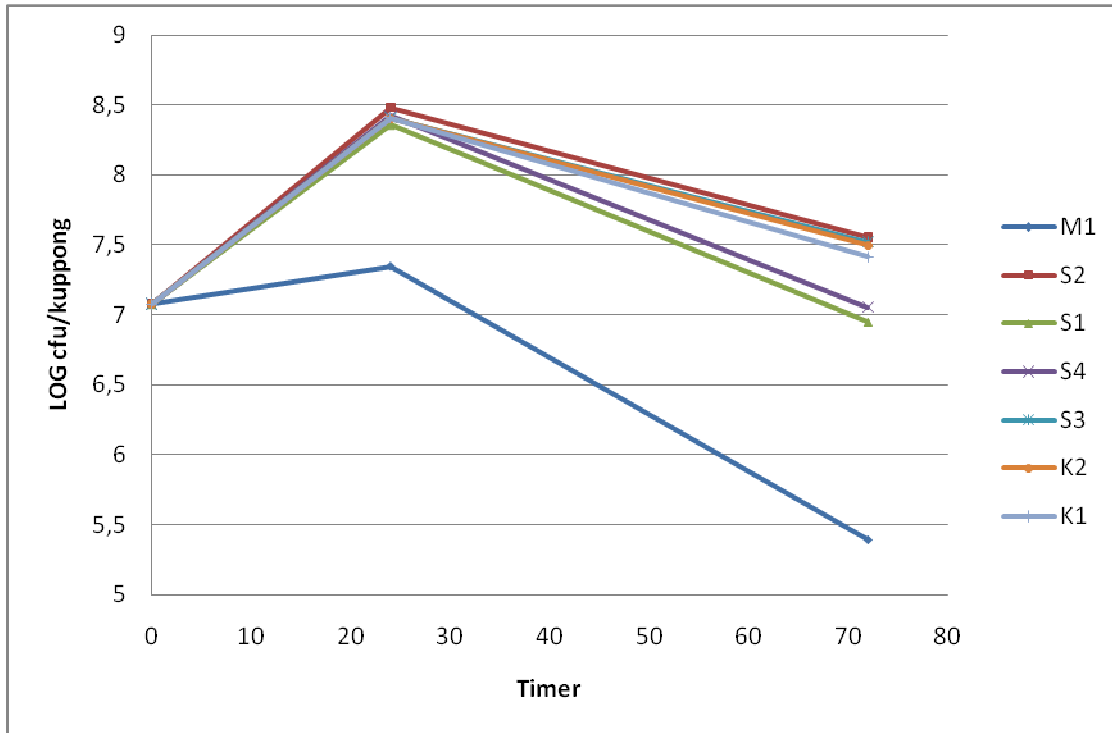
samtligte stammer og materialer i plast.

Figur 4.4 viser at det generelt var lite forskjell mellom de antimikrobielle materialene og kontrollene. For *L. monocytogenes* ble det etter 72 timer observert lavere bakterietall på Microbankupongen (M1) enn på kontrollkupong K2 ($P = 0,011$). Dette var den eneste signifikante forskjellen som ble påvist, men det var en trend at Microbankupongen (M1) var blant kupongene med det laveste bakterietallet for de fleste bakterier og uttakstidspunkt. M1 hadde ikke signifikant lavere bakterietall enn kontrollkupong K1. *E. coli* var den eneste bakterien det ble observert nedgang i bakterietall fra 24 timer til 72 timer. *Serratia* og koagulase negative stafylokokker hadde liten forskjell i vekst mellom ulike typer kuponger fra 0 til 24 timer. Deretter ble det observert større variasjon i vekstmønsteret, men disse endte likevel likt de fleste andre bakterier etter 72 timer.

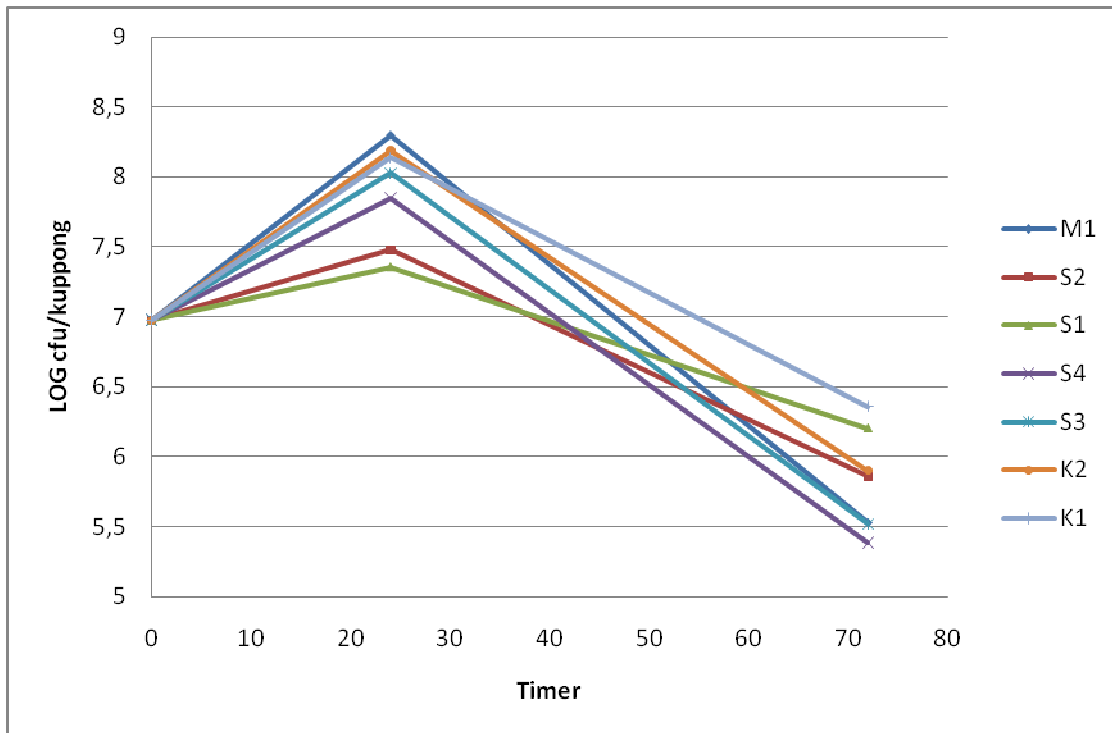
A



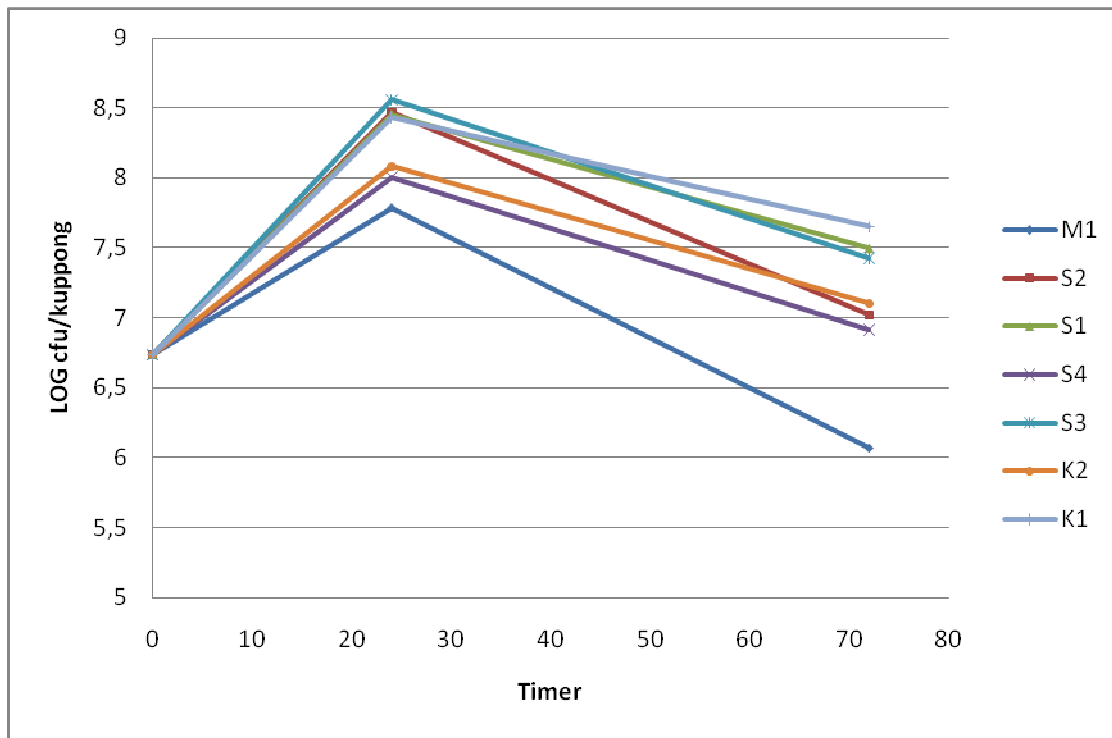
B



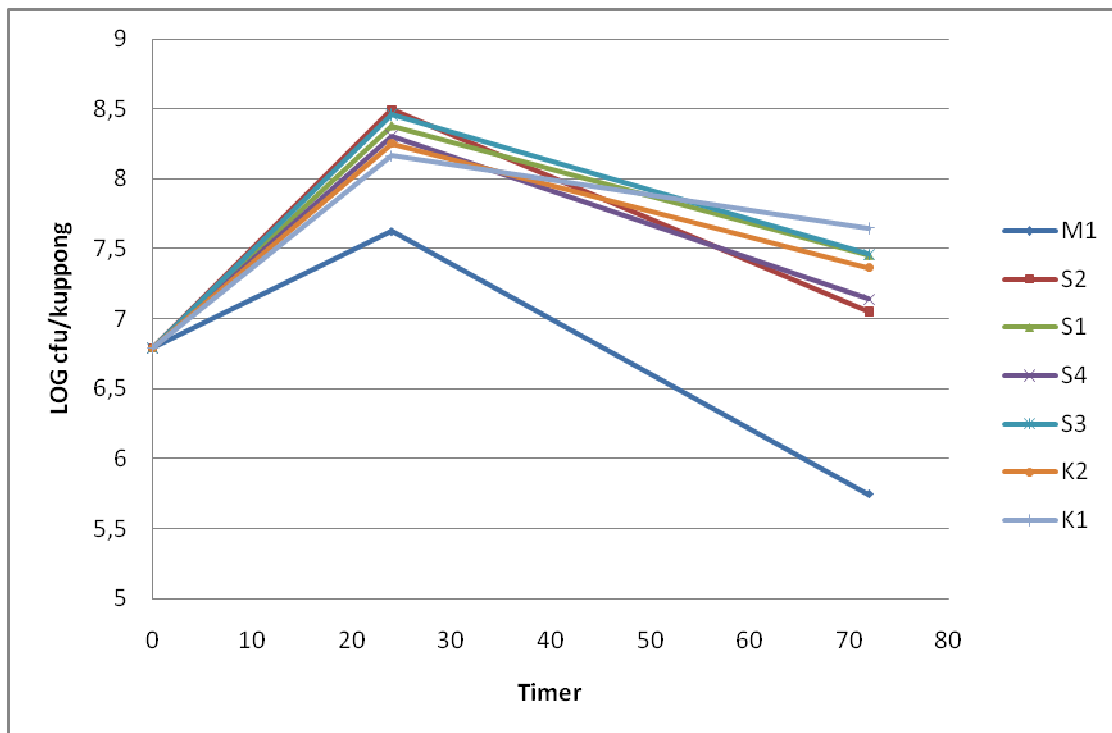
C



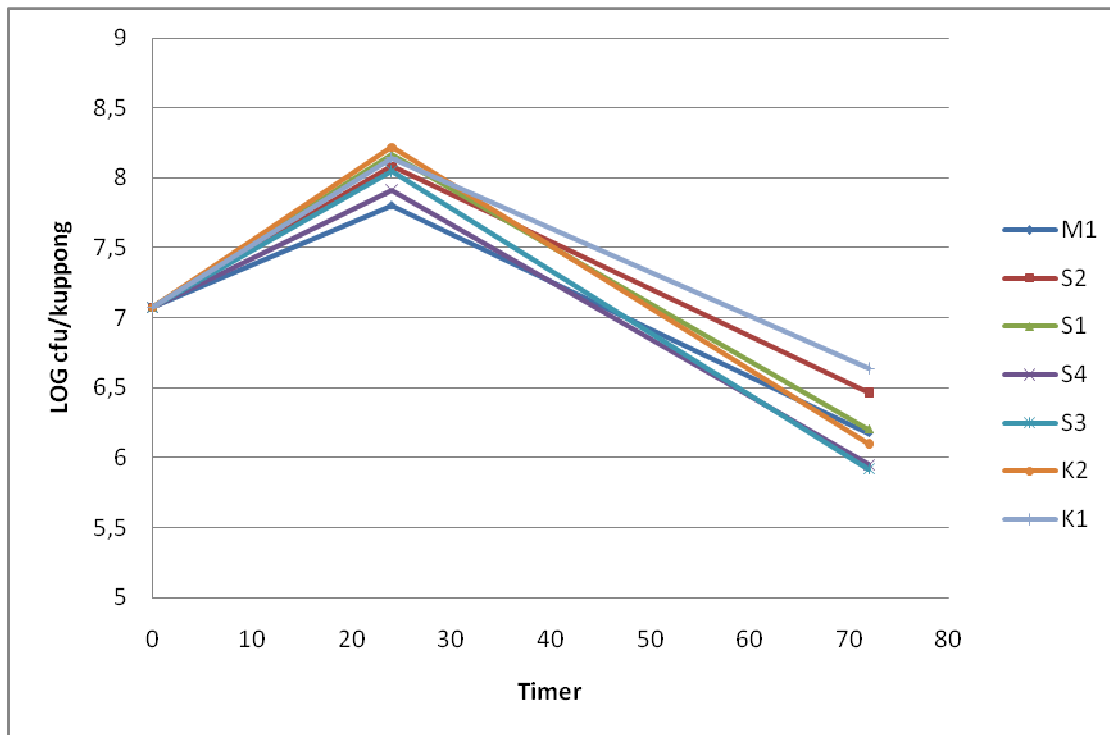
D



E



F



Figur 4.5. Forløp etter inkubasjon i 24 og 72 timer ved 25 °C i 70 % relativ fuktighet for A; *E. coli*, B; *Salmonella*, C; *Serratia*, D; koagulase negative stafylokokker, E; *St. aureus*, F; *L. monocytogenes*. Log cfu/kuppong er angitt. Data er gjennomsnitt av utførte gjentak for samtlige stammer og materialer i plast.

Kun vekt hos koagulase negative stafylokokker på Microbankuponger var signifikant lavere enn kontroll (K1) ved 24 timer. *E. coli* (figur 4.5 A) på Microbankupongen hadde høyere drap i forhold til kontrollkupongen K1 ($P = 0,046$) ved 72 timer. Dette gjaldt også *Salmonella* ($P = 0,015$), koagulase negative stafylokokker ($P = 0,032$) og *St.aureus* ($P = 0,011$). *Salmonella* og *St. aureus* hadde i tillegg en signifikant forskjell til kontrollkupongen K2 ($P = 0,008$, $P = 0,018$). For *Serratia* og *L. monocytogenes* var det ingen signifikant forskjell i bakterietall mellom Microban og kontrollkupongene.

Det var ingen signifikant forskjell mellom de andre kupongene med antimikrobielle forbindelser og kontrollkupongene.

4.3 Hemmingstest – Minste inhiberende konsentrasjon

Det ble undersøkt ved hvilken konsentrasjon triklosan og sølvnitrat hemmet veksten til de ulike stammene. Prosedyre for forsøket er beskrevet i avsnitt 3.6.

Tabell 4.1 viser MIC av triklosan for samtlige stammer. *Serratia* var den mest motstandsdyktige og kun én stamme hadde målbar inhibering i det testede konsentrasjonsområde. *L. monocytogenes* var nokså motstandsdyktig med MIC mellom 12,5 og 25ppm. De andre bakteriestammene hadde en lavere toleranse for triklosan hvor MIC lå mellom 0,20 og 3,13ppm. Den mest sensitive stammen var *St. aureus* MF 3674, med en MIC på 0,04ppm.

For sølv nitrat var MIC for samtlige stammer 15,63 ppm, med unntak av *Serratia* MF 2336, *L. monocytogenes* MF 3131, MF 3134 og MF 3132, som hadde en MIC på 31,25 ppm sølvnitrat.

Tabell 4.1: Oversikt over minste inhiberende konsentrasjon av triklosan og hemmesone oppnådd ved agardiffusjon på Microban for samtlige stammer benyttet i forsøkene.

<i>Bakterie</i>	<i>Nofima stammenummer</i>	<i>Minste inhiberende konsentrasjon Triklosan(ppm)</i>	<i>Hemmesone oppnådd ved agardiffusjon på Microban</i>
<i>E. coli</i>	MF 2494	0,20	1
<i>E. coli</i>	MF 2496	1,56	2
<i>E. coli</i>	MF 2892	0,39	1
<i>E. coli</i>	MF 2411	0,20	2
<i>E. coli</i>	MF 3582	0,39	1
<i>Salmonella</i>	MF 2409	0,78	1
<i>Salmonella</i>	MF 2098	0,39	2
<i>Salmonella</i>	MF 2096	0,39	4
<i>Salmonella</i>	MF 2113	3,13	3
<i>Salmonella</i>	MF 3534	0,39	4
<i>L. monocytogenes</i>	MF 3132	12,5	6
<i>L. monocytogenes</i>	MF 3131	25,0	4

<i>L. monocytogenes</i>	MF 3134	25,0	5
<i>L. monocytogenes</i>	MF 1509	12,5	6
<i>L. monocytogenes</i>	MF 3643	6,25	4
<i>St. aureus</i>	MF 3675	1,56	2
<i>St. aureus</i>	MF 3674	0,04	12
<i>St. aureus</i>	MF 1981	3,13	6
<i>St. aureus</i>	50583	0,39	3
<i>St. aureus</i>	50089	3,13	4
KNS	0812_15-18	1,56	4
KNS	0812_9-10	0,31	7
KNS	MF 3625	0,63	8
KNS	MF 1892	1,56	4
KNS	MF 3624	1,25	4
<i>Serratia</i>	MF 3324	>50	0
<i>Serratia</i>	MF 3626	>50	0
<i>Serratia</i>	MF 3309	50	0
<i>Serratia</i>	MF 2602	>50	0
<i>Serratia</i>	MF 2336	>50	0

4.4 Agardiffusjonsforsøk

4.4.1 Innledende forsøk

Den antimikrobielle effekten til de ulike materialene ble undersøkt ved agardiffusjon der kuponger på 2x2 cm ble støpt inn i softagar.

Prosedyre for forsøket er beskrevet i Materialer og metoder avsnitt 3.7.1.

Tabell 4.2 Hemmingssone rundt Microbankuponger oppnådd ved agardiffusjonstest med bakteriesuspensjoner inneholdende fem stammer av samme bakterietype.

<i>Bakteriesuspensjon</i>	Hemmingssone oppnådd på Microban (mm)
<i>E. coli</i>	2
<i>Salmonella</i>	4
<i>Serratia</i>	0
KNS	5
<i>St. aureus</i>	5
<i>L. monocytogenes</i>	4

Hver bakteriesuspensjon ble testet på samtlige materialer, men kun Microban ga hemmingssone og kun disse resultatene er derfor fremstilt i tabell 4.2.

Tabell 4.2 viser at agardiffusjonen med *Serratia* bakteriesuspensjon ikke ga sone ved innstøpning av Microban. Bakteriesuspensjonen av koagulase negative stafylokokker og av *St. aureus* ga de største sonene ved agardiffusjonstesten.

4.4.2 Agardiffusjon av Microban

Hver enkelt stamme ble testet mot Microban ved agardiffusjonstest. Resultater fra agardiffusjon med Microbankuponger er vist i tabell 4.1.

Microban ga ingen hemmesone på noen av *Serratia* stammene. De største sonene kunne observeres blant de koagulase negative stafylokokk stammene og *St. aureus* stammene. Her kunne man i tillegg se den største variasjonen mellom stammer av samme art.

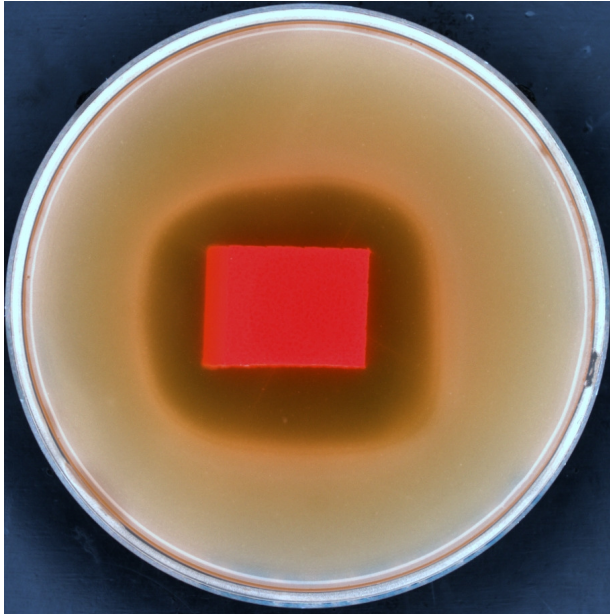
4.4.3 Agardiffusjon av vaskede Microbankuponger

St.aureus, MF 3674, ble benyttet for å undersøke Microbans antimikrobielle effekt etter at kupongene hadde vært igjennom et vaskeregime. Effekten ble testet ved agardiffusjon. Prosedyre for forsøket er beskrevet i avsnitt 3.7.3.

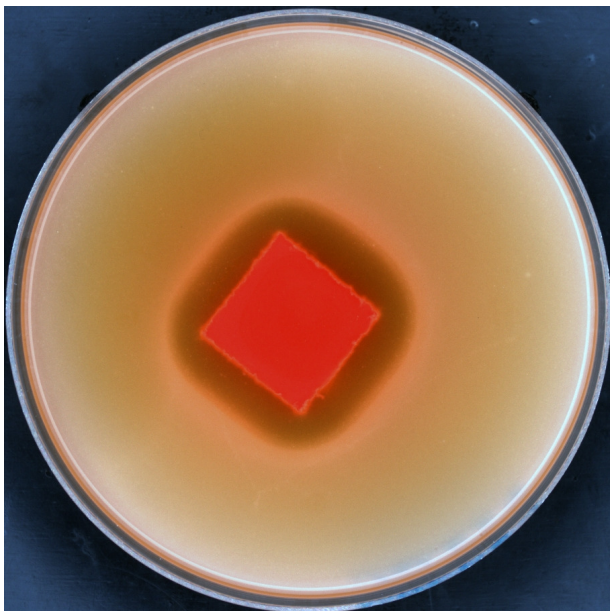
Hemmesonen rundt de tre kupongene som var vasket i oppvaskmaskin var 6, 6 og 7 mm

sammenlignet med 10, 11 og 12 mm for ubehandlede kuponger (Figur 4.6). Målingene viser at hemmesonen rundt ubehandlede Microbankuponger i snitt er 4,67 cm større enn sonen rundt Microbankuponger vasket i oppvaskmaskin ($P = 0,003$).

A



B



Figur 4.6 A. Ubehandlet Microbankupong støpt inn i softagar inokulert med *St. aureus*, MF 3674, B. Microbankupong som har gjennomgått vaskeregime støpt inn i softagar inokulert med *St. aureus*, MF 3674.

4.5 Antimikrobiell effekt av skjærebrett på kyllingfilets naturlige bakterieflora

Resultatet av forsøket ble analysert ved 2-sample t analyser i Minitab. Resultatene er lagt ved i vedlegg 3.

Analysene viste at det ikke var signifikant forskjell i totalt bakterietall på kontroll filetene sammenlignet med kyllingfiletene som hadde vært inkubert på de ulike kupongene. Det var heller ingen signifikant forskjell i bakterietallet som var blitt overført til de ulike kupongene under inkubasjon.

5 Diskusjon

Ved det innledende forsøket ble bakteriesuspensjonen først tørket på kupongene før videre inkubering ved valgt fuktighet. Det viste seg at tørkeprosessen i seg selv drepte mesteparten av bakteriene, spesielt de Gram-negative. Gram-negative bakterier er generelt sett mer ømfintlige for inntørking enn Gram-positive. Dette skyldes blant annet oppbygningen bakterienes cellevegg. Gram-positive bakterier har et ytre polyglykan lag med en indre cytoplasmamembran som gjør bakterien mer motstandsdyktig mot inntørking, mens Gram-negative bakterier har en yttermembran og en indre cytoplasmamembran med et polyglykanlag mellom membranene (Granum, 2008). For å unngå drap ved inntørking før inkubering ble kupongene inkubert direkte ved 70 og 100 % relativ fuktighet etter påføring av bakteriesuspensjon ved gjennomføring av hovedforsøket.

I det innledende forsøket ble det i tillegg til kuponger i plast benyttet to typer kuponger av tre, bambus og bøk. Det ble observert at dråpene med bakteriesuspensjon tørket inn mye raskere på tre enn plast, noe som sannsynligvis skyldes at fuktigheten blir absorbert i trematerialet. Det ble derfor vanskelig å beregne antall overlevende bakterier på tre ved svabring som ble benyttet i dette forsøket. Lignende forsøk er gjort av Abrishami et al. (1994) og Ak et al. (1994) på tre kontaminert med bakteriesuspensjoner. Resultatene viste en reduksjon av *E. coli* inokulert på nytt treverk på 98 % (Abrishami et al., 1994) og en reduksjon av *L. monocytogenes* på 99,9 % (Ak et al., 1994) etter 2 timer.

Resultatene stemmer overens med tidligere rapporterte resultater. Men Abrishami et al. (1994) og Ak et al. (1994) benyttet nedsenkning i henholdsvis fosfat buffer med risting i 2-3 minutter og i flytende vekstmedium som prøvetakings metode, mens det ble benyttet svabring med vattpinner dyppet i peptonvann som prøvetakings metode. Abrishami et al. (1994) hevder at deres metode er mer effektiv enn den som ble benyttet her. Trefibre har kapillære egenskaper og stor vannbindingsevne. Avhengig av hvilken vei fibrene er orientert på overflaten av skjærebrettet vil bakterier kunne penetrere opptil flere centimeter ned i treverket. Det er derfor hevdet at den beste måten å innhente bakterieprøver fra skjærebrett i tre er ved destruktive metoder som skraping (Kamelmacher et al. 1971, Ruosh et al. 1981). Det kan bety at man ved å benytte en av de andre metodene hadde klart å oppnå et høyere bakterietall fra trekupongene. Kupongene i tre ble ekskludert fra videre forsøk da det var

vanskelig å sammenligne med antall overlevende bakterier på plast, når man benytter svabring som prøvetakingsmetode.

Ved etterfølgende forsøk ble ikke bakteriesuspensjonen tørket inn på kupongene før inkubering, men inkubert i boks direkte etter påføring av suspensjonene. Kupongene med bakteriesuspensjon ble inkubert ved 70 % relativ fuktighet, og det ble gjort uttak etter 24 og 72 timer. Alle bakteriesuspensjoner på alle kupongtyper hadde vokst fram til 24 timer med unntak av *E. coli* på Microban (Figur 4.5 A). Det var likevel ingen signifikant forskjell mellom *E. coli* på dette materialet og på de to kontrollene. *Salmonella*, koagulase negative stafylokokker og *St. aureus* på Microban hadde noe lavere vekst enn kontroll fram til 24 timer, kun KNS hadde signifikant forskjell i vekst sammenlignet med kontrollen K1. Ved 24 timer kunne man tydelig se at dråpene med bakteriesuspensjon hadde tørket, men de var ikke fullstendig inntørket utfra synlig observasjon. Fra 24 til 72 timer var det tydelig nedgang i antall bakterier i samtlige suspensjoner på alle materialer. Ved 72 timer var dråpene med bakteriesuspensjon fullstendig inntørket. Siden det etter 72 timer også var stort drap på kontrollkupongene kan det antas at drapeseffekten i stor grad skyldtes inntørkingen. Dette samsvarer med det som ble observert i det innledende forsøket. Observasjonene som ble gjort stemmer med lignende forsøk gjort på gulv inneholdende triklosan (Møretrø et al., 2006). Her ble det generelt sett observert lite nedgang i bakterietall etter inkubering i 24 timer på kuponger av gulvet og på kontroller av rustfritt stål. Det ble imidlertid observert en signifikant reduksjon av Gram-negative bakterier etter seks dagers eksponering på kuponger av gulvet i forhold til på rustfritt stål. Det oppgis imidlertid ikke ved hvilken relativ fuktighet kupongene var inkubert, men nedgangen i bakterietall kan tyde på at forholdene var lignende de i dette forsøket.

Da den relative fuktigheten var 100 % gjennom eksponeringsperioden tørket ikke suspensjonene ut på kupongene. Det svært fuktige miljøet gjorde at bakteriene vokste. Kupongene inkubert ved 100 % relativ fuktighet viste ingen hemming av vekst sammenlignet med kontroll. Kun veksten av *L. monocytogenes* på Microbankupong var signifikant lavere sammenlignet med kontroll (K2) ($P = 0,011$).

Samtlige bakteriestammer ble undersøkt for minste hemmende konsentrasjon av stoffene triklosan og sølvnitrat. *Serratia* var blant de Gram-negative bakteriene som ble testet og viste

seg å være svært motstandsdyktig for triklosan ved at fire av fem stammer vokste i løsning med konsentrasjon av triklosan på 50 ppm, noe som gir MIC >50. Den siste stammen vokste i løsning med 25 ppm triclosan, men det er nødvendig med forsøk med tettere sprang mellom konsentrasjonene for å finne en mer eksakt minste hemmekonsentrasjon. Funnene stemmer overens med tidligere MIC resultater (Vischer et al., 1974) der det rapporteres at *Serratia marcescens* har MIC>100 ppm.

E. coli var mer sensitive for triklosan, og forsøket ga MIC mellom 0,20 og 0,39 ppm triklosan for de ulike stammene. Dette viste at variasjonen i toleranse er stor blant de Gram-negative bakteriene. Vischer et al. (1974) rapporterer MIC for triklosan for to stammer av *E. coli* til 0,1 og 0,3 ppm, noe som stemmer overens med de oppnådde resultater for bakterien i dette forsøket.

For fire av fem *Salmonella* stammer testet i forsøket ble MIC for triklosan 0,39 ppm, for den femte stammen ble MIC 0,78 ppm. *Salmonella* viste seg også å være nokså sensitiv for triklosan i forhold til *Serratia*. To serotyper, *S. enteritidis* og *S. typhimurium*, som ble testet i forsøket var også blitt testet av Vischer et al. (1974). De rapporterte resultatene for *S. enteritidis* av Vischer et al. var 0,1 ppm og 0,3 ppm, for *S. typhimurium* var MIC 0,3 ppm. I dette forsøket var MIC for begge disse stammene 0,39 ppm.

Ved et tidligere utført forsøk (Vischer et al, 1974) var kun MIC for en koagulase negativ stafylokokk, *St. albus*, blitt undersøkt. Denne var ikke blant de KNS stammene benyttet i dette forsøket. For stammene testet i forsøket ble MIC for triklosan mellom 0,31 ppm og 1,25 ppm. Dette er 10 til 40 ganger høyere konsentrasjon enn tidligere rapportert resultat (Vischer et al., 1974). Andre rapporterte resultater viser at to ulike stammer av *St. cohnii* fikk MIC på henholdsvis 1,0 og <0,07 ppm (Møretrø et al., 2006). En stamme *St. cohnii* ble testet og MIC for triklosan ble 1,25 ppm. Denne stammen var ikke blant de som ble testet av Møretrø, men resultatene i dette forsøket stemmer overens med det ene MIC resultatet rapportert av Møretrø et al. (2006). Sammenligning kan være vanskelig mellom de ulike stammene da det forekommer varierende toleranse for triklosan hos ulike stammer av samme bakterieart. Dette ble også observert da MIC for de ulike *St. aureus* stammene ble testet. MIC for disse stammene ble mellom 0,04 ppm og 3,13 ppm triklosan. Rapporterte MIC resultater for *St. aureus* stammene Vischer et al. (1974) undersøkte var mellom 0,01 ppm og 0,1 ppm triklosan,

med andre ord langt mindre variasjon enn det som ble oppnådde i dette forsøket. Forskjellene i toleranse mellom de ulike bakterier for triklosan kan skyldes ulikheter i celleveggen eller cellemembranpermeabiliteten (McDonnell et al., 1999).

MIC for undersøkte *L. monocytogenes* stammer var mellom 6,25 og 25 ppm triklosan. Sammenlignet med tidligere rapporterte resultater, MIC for *L. monocytogenes* 1 ppm triklosan (Visher et al. 1974), var dette svært høyt. Et så stort sprang mellom registrerte MIC resultater kan muligens tyde på at bakterien har utviklet økt toleranse for triklosan, noe forskere er svært redde for at skal skje nå som triklosan blir benyttet i kommersiell produksjon, dette kan øke det selektive presset på stammene (McMurry et al., 1998).

I kupongene som inneholdt sølv forelå forbindelsen som nanopartikler. Ved testing av MIC var det som tidligere nevnt ikke tilgang på nanosølv og det ble derfor benyttet sølvnitrat. Samtlige bakterier med noen få unntak fikk samme MIC for sølvnitrat, MIC 15,63 ppm AgNO₃. Tre av *L. monocytogenes* stammene og en *Serratia* stamme oppnådde en høyere MIC på 31,25 ppm AgNO₃. Dette sammenfaller ikke med teorien om at Gram-negative bakterier er mer sensitive for sølv enn Gram-positive (Cho et al. 2005), men kan forklares med at dette forsøket ble gjort med sølvnitrat som ikke innehar de samme antimikrobielle egenskapene og effektene som nanosølv (Rai et al., 2009).

Samtlige kupongers antimikrobielle effekt ble testet ved agardiffusjons-assay. Ingen av kupongene inneholdende sølv inhiberte veksten av noen typer bakterier, og det ble ikke observert noen hemmesone. Microbankupongen med triklosan inhiberte veksten til flere av bakteriestammene slik at hemmesone ble observert. Resultatene av agardiffusjonsforsøket med Microban viste at det generelt sett er samsvar mellom bakterienes MIC for triklosan og hemmesonen oppnådd ved innstøpning i softagar inokulert med de enkelte stammene. Men det forekom også avvik der ulike bakterier med samme MIC fikk ulik størrelse på hemmesonene. Resultatene av agardiffusjonsforsøket viste i større grad enn ved undersøkelse av stammenes MIC at Gram-positive bakterier er mer sensitive for triklosan enn Gram-negative bakterier. Generelt sett er Gram-positive bakterier mer sensitive for desinfeksjonsmidler enn Gram-negative bakterier (Russel, 1995). Dette er også gjeldende for triklosan (Visher et al., 1974)

Serratias toleranse for triklosan ble ytterligere demonstrert ved agardiffusjons-assay med Microbankuponger. Ingen av stammene vokst ble inhibert av Microbankupongen, og det kunne derfor ikke sees noen hemmesone rundt denne. Resultatene stemmer overens med lignende forsøk gjort på antibakterielt gulv med inkorporert triklosan (Møretrø et al. 2006).

Salmonella og *E. coli* ble inhibert av triklosan fra kupongen. Microbankupongen ga 1-2 mm hemmesoner for *E. coli* stammene, mens kupongen ga hemmesoner på mellom 1 og 4 mm for *Salmonella* stammene. Stammene oppnådde også nokså like MIC resultater for triklosan, noe som tydeliggjør sammenhengen mellom MIC og størrelse på hemmesone.

Microbankupongen ga hemmesone på 4mm ved agardiffusjons-test med *St. cohnii*. Agardiffusjons-assay med gulvbelegg inneholdende triklosan rapporterte å ha gitt en like stor hemmesone med *St. cohnii* (Møretrø et al., 2006). De andre koagulase negative stafylokokkene ble også inhibert av Microbankupongen og hemmesonene ble 4-8 mm. Stafylokokker er rapportert å være svært sensitive for triklosan (Møretrø et al., 2006), det var derfor ikke overraskende at hemmesonene ble størst med KNS stammene og *St. aureus* stammene. *St. aureus*, MF 3674, ble sterkest inhibert av Microbankupongen med en hemmingssone på 12 mm, denne stammen var også den mest sensitive i MIC testen. Oppnådde hemmingssoner ved agardiffusjonsforsøk med Microban viser at triklosan har evnen til å migrere ut av kupongen og inhibere omkringliggende mikroorganismer.

Tre Microbankuponger hadde gjennomgått et vaskeregime hvor de nesten daglig i 2 måneder ble vasket i en vaskemaskin i en normal husholdning. Disse kupongene ble deretter støpt inn i softagar inokulert med *St. aureus* MF 3674 og etter endt inkubasjon ble de sammenlignet med ubehandlede kuponger. Det viste seg at hemmesonene var signifikant mindre for de vaskede kupongene enn de ubehandlede ($P = 0,003$). Sett i sammenheng med resultat som viser at triklosan migrerer ut av kupong i agarforsøk kan man anta at triklosan i vaskeforsøket har lekket ut av kupongene over tid slik at tilgjengelig triklosan for hemming av bakterier er blitt redusert. Resultatene fra agarforsøk og vaskeforsøk tyder på at Microbanbrettet kan tape sin aktivitet ved lengre tids bruk under fuktige forhold. Microbanpatentet går ut på at triklosan blandes sammen med plastforbindelsen før polymeriseringen, slik at resultatet etter polymerisering skal bli at triklosan er jevnt fordelt gjennom hele platen. Det reklameres med

at eventuelt tap av triklosan fra overflaten vil erstattes av nye triklosanmolekyler som diffunderer opp fra dypere lag (Microban International, Ltd. C & K products division). Siden effekten avtok over tid kan det spekuleres i om mengden triklosan i brettet var begrenset eller om brettets relative høye tetthet vanskeliggjorde diffusjonen av triklosan fra dypere lag til overflaten.

I oppgaven ble det funnet motstridende resultat på om skjærebrett med triklosan hemmet vekst av bakterier. I hemmesone forsøk ble hemming observert mens det ved forsøk med kuponger i bokser med 100 % relativ fuktighet ikke ble observert noen slik hemming. Det er ikke avklart hva denne forskjellen skyldes.

Forsøket der enkelte kupongers antimikrobielle effekt ble testet mot bakteriefloraen på kyllingfilet ga ingen signifikante forskjeller mellom de ulike kupongene. Det ble brukt kort inkuberingstid i forsøket slik at man bare fikk undersøkt eventuell drapeseffekt. Et eventuelt oppfølgingsforsøk kunne være å bruke lengre inkuberingstid slik at man kunne undersøkt om materialene hadde hatt en effekt på vekst av kyllingfiletens bakterieflora.

Kupongene av skjærebrett med nanosølv som antimikrobielt virkestoff viste ingen virkning i forsøkene som ble utført. Cho et al.(2005) undersøkte sølv nanopartiklers antimikrobielle effekt ved brønn diffusjon. De benyttet en konsentrasjon på 5,4 ppm Ag-NP stabilisert med poly-(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) og fikk hemmesone på 9 mm rundt brønnen i skål inokulert med *St. aureus* og hemmesone på 4 mm rundt brønnen i skål inokulert med *E. coli*. Informasjon mottatt av Bioguard viser at bakteriene må komme i kontakt med sølvionene under fuktige forhold for å inaktiveres. Dette kan forklare hvorfor det ikke ble observert hemmesone rundt kupongene med nanosølv ved agardiffusjonsforsøket, da disse ionene ikke vil migrere ut fra kupongen. Ved brønndiffusjon vil nanosølvløsningen kanskje ha mulighet til å diffundere ut i agar og derfor gi hemmesone.

Bakteriene var imidlertid i direkte kontakt med kupongen da bakteriesuspensjoner ble inkubert på disse ved 70 og 100 % relativ fuktighet. Hvis sølvionene i disse kupongene hadde antimikrobiell effekt burde man ha sett det her. Grunnen til at effekten uteble kan være for lav konsentrasjon av sølv nanopartikler i skjærebrettene. Tilsvarende forsøk har blitt gjort med overnattekulturer som ble fortynnet 1000 ganger. Heller ikke med færre bakterier ble det

observert noen nedgang i bakterietall på kuponger med nanosølv etter endt eksponeringstid (Møretrø, upublisert)

Kupong S2 ble testet etter japansk standard mot samtlige bakteriesuspensjoner. I denne testen ble det etter påføring av bakteriesuspensjon på kupong lagt over et tynt sterilt lag polyetylen. Dette skulle sikre jevn fordeling av suspensjonen over hele overflaten. Resultatene var entydige med tidligere oppnådde resultater; nanosølv i skjærebrett viste ingen antimikrobiell effekt i denne testen heller (data ikke vist).

6 Konklusjon

Av dette arbeidet kan det konkluderes med at skjærebrett med triclosan hadde en viss økt drapeseffekt under tørre forhold sammenlignet med kontroll. Imidlertid var det også for kontroll raskt drap ved tørre forhold, så det er usikkert om effekten av skjærebrettet med triclosan har noen praktisk betydning ved bruk. Drapeseffekten av skjærebrett med triclosan skyldes at triclosan migrerer ut fra kupongene og det ble vist at langvarig bruk/vask kan redusere effekten. Skjærebrett med sølv hadde ingen antibakteriell effekt i noen tester. Samlet sett virker ikke slike skjærebrett å ha noen stor hygienisk effekt ved praktisk bruk. Resultatene viser ellers at det å la utstyr tørke opp mellom bruk kan redusere antall bakterier på overflater. I tillegg kan det antas at tradisjonelle rutiner som god håndhygiene, vask av skjærebrett og separat håndtering av råvarer og ferdigprodukt fremdeles er viktige for trygg tilberedning av mat.

7. FORSLAG TIL VIDERE ARBEID

- Videreutvikle forsøket der den antimikrobielle effekten til skjærebrettene ble testet mot den naturlige bakteriefloraen til kyllingfilet.
- Utføre brønn diffusjonsforsøk med sølvnitrat for å se om man kan oppnå hemmesone for sølv.
- Skaffe til veie nanosølv for å sammenligne effekt med sølvnitrat.

REFERANSER

Abrishami, S. H., Tall, B. D., Bruursma, T. J., Epstein, P. S. & Shah, D. B. (1994). *Bacterial adherence and viability on cutting board surfaces*, J. Food Safety 14: 153-172.

Adams, M. R. & Moss, M. O. (2000). *Bacterial Agents of Foodborne Illness* 2utg. Food Microbiology: The Royal Society of Chemistry.

Ak, N. O., Cliver, D. O. & Kaspar, C. W. (1994). *Decontamination of plastic and wooden cutting boards for kitchen use*, J. Food Protect. 57: 23-30.

Alberti, L. & Harshey, R. M. (1990). *Differentiation of Serratia marcescens 274 into swimmer and swarmer cells*, J Bacteriol 172: 4322-4328.

Allison, D. G. & Sutherland, I. W. (1987) *The role of exopolysaccharides in adhesion of fresh-water bacteria*, Journal of General Microbiology, 133: 1319-1327.

Anía, B. J. (2009) *Serratia*, Hospital Negrín & Universidad de Las Palmas de Gran Canaria <http://emedicine.medscape.com/article/228495-print> (lest 10.05.2010)

Bell, C. & Kyriakides, A. (2002). *Salmonella – A practical approach to the organism and its control in foods*, Blackwell Science Ltd.

Bhargava, H. N. & Leonard, H. N. (1996). *Triclosan: applications and safety*, American Journal of Infection Control 24: 209-218.

Bioguard: <http://www.bioguardcuttingboards.com/uploads/overview.pdf> (lest 10.05.2010)

Busscher, H. J. & Weerkamp, A. H. (1987) *Specific and nonspecific interactions in bacterial adhesion to solid substrata*, FEMS Microbiology Reviews, 46: 165-173.

Chen, X. & Schluesener, H. J. (2007) *Nanosilver: A nanoproduct in medical application*, Toxicology Letters, 176(4): 1-12.

Cho, K-H., Park, J-E., Osaka, T & Park, S-G. (2005) *The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient*, *Electrochimica Acta*, 51: 956-960.

Costerton, J. W. & Lewandowski, Z. (1995) *Microbial biofilms*, *Annual Reviews of Microbiology*, 49: 711-745.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. (1999) *Bacterial biofilm: A common cause of persistent infections*, *Science*, 284: 1318-1322.

da Silva Paula., M. M., Franco, C. V., Baldin, M. C., Rodrigues, L., Barichello, T., Savi, G. D., Bellato, L. F., Fiori, M. A. & da Silva, L. (2009) *Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles*, *Materials Science and Engineering, C* 29: 647-650.

DeSalva, S. J., Kong, B. M. & Lin, Y. J. (1989) *Triclosan: a safety profile*, *Am J Dentistry*, 2: 185-196.

DeVere, E. & Purchase, D. (2007) *Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces*, *Food microbiol.* 24(4): 425-430.

Dewanti, R. & Wong, A. C. (1995) *Influence of culture conditions on biofilm formation by Escherichia coli O157:H7*, *International Journal of Food Microbiology*, 26: 147-164.

Dubas, S. T., Kumlangdudsana, P. & Potiyaraj, P. (2006). *Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers*, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 289: 105-109.

Duran, N., Marcato, P. D., De Souza, G. I. H., Alves, O. L. & Esposito, E. (2007). *Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment*, *J Biomed Nanotechnol* 3: 203-208.

Gilbert, P., Allison, D. G. et al. (2002) *Biofilm in vitro and in vivo: do singular mechanisms*

imply cross-resistance? Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 92:98-110.

Goldschmidt, M. C., Warren, D. P., Keene, H. J., Tate, W. H. & Gowda, C. (2004). *Effects of an antimicrobial additive to toothbrushes on residual periodontal pathogens*, J Clin Dent. 15(3): 66-70.

Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W. et al. (2007) *Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles*, Nanotechnology 18: 604-611.

Granum, P. E. (2008) *Matforgiftning – Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, 3. utgave, Høyskoleforlaget AS, Kristiansand.

Grimont, P. A. D. & Grimont, F. (1984) *Genus VIII. Serratia*. I: Krieg, N. R. & Holt, J. G. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*, vol 1. Baltimore, Williams and Wilkins: 477-484.

Heath, R. J., Li, J., Roland, G. E. & Rock, C. O. (2000) *Inhibition of the Staphylococcus aureus NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene*, The Journal of biological chemistry 275: 4654-4659.

Heath, R. J., Yu, Y. T., Shapiro, M. A., Olson, E. & Rock, C. O. (1998) *Broad spectrum antimicrobial biocides target the FabI component of fatty acid synthesis*, Journal of biological chemistry 273: 30316-30320.

Heikens, E., Fler, A., Paauw, A., Florijn, A. C. & Fluit, A. (2005) *Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negativ staphylococci*, J. Clin. Microbiol. 43: 2286-2290.

Hines, D. A., Saurugger, P. N., Ihler, G. M. & Benedik, M. J. (1988) *Genetic analysis of extracellular proteins of Serratia marcescens*, J Bacteriol 170: 4141-4146.

Hoang, T. T. & Schweiser, H. P. (1999) *Characterization of Pseudomonas aeruginosa enoyl-*

acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis, Journal of bacteriology 181: 5489-5497.

Huebner, J. & Goldmann, D. A. (1999) *Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens*, Annu. Rev. Med. 50: 223-236.

Jeong, D. K. & Frank, J. F. (1994) *A study of coagulase-negative staphylococci with reference to slime production, adherence, antibiotic-resistance patterns and clinical significance*, Journal of Hospital Infection, 22: 217-227.

Jones, R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L. & Lee, A. S. (2000) *Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings*, American Journal of Infection Control 28(2): 184-196.

Kampelmacher, E. H., Mossel, D. A. A., Van Schothorst, M. & Van Noorle Jansen, L. M. (1971). *Quantitative Untersuchungen über die Dekontamination von Holzflächen in der Fleischverarbeitung*, Alimenta Sondernummer 70-76.

Kumar, C. G. & Anand, S. K. (1998) *Significance of microbial biofilms in food industry: a review*, International journal of food microbiology 42: 9-27-

Langsrud, S., Møretrø, T., Sundheim, G. (2003). *Characterization of Serratia marcescens surviving in disinfecting footbaths*, Journal of Applied Microbiology 95: 186-195.

Lefebvre, C. A., Wataha, J. C, Cibirka, R. M., Schuster, G. S. & Parr, G. R. (2001). *Effects of triclosan on the cytotoxicity and fungal growth on a soft denture liner*, J Prosthet Dent. 85(4): 352-356.

Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. (1997). Principles of Biochemistry, second ed., Worth, New York.

Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent*, J. Infect. Dis. 155:

377-389.

Liau, S., Read, D., Pugh, W, Furr, J. & Russel, A. (1997). *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 279.

Marrie, T. J. & Costertom, J. W. (1981). *Prolonged survival of Serratia marcescens in chlorhexidine*, *Appl Environ Microbiol* 42: 1093-1102.

Matsuyama, T., Fujita, M. & Yano, I. (1985). *Wetting agent producing by Serratia marcescens*, *FEMS Microbiol Lett* 28: 125-129.

Matsuyama, T., Kaneda, K., Nakagawa Y., Isa, K., Hara-Hotta, H. & Yano, I. (1992). *A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and –independent spreading growth of Serratia marcescens*, *J Bacteriol* 174: 1769-1776.

Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S. & Yano, I. (1986). *Extracellular vesicle formation and bio-surfactant production by Serratia marcescens*, *J Gen Microbiol* 132: 865-875.

McMurry, L. M., Oethinger, M. & Levy, S. B. (1998). *Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of Escherichia coli*, *FEMS Micro Lett* 166: 305-309.

Meincke, B. E., Kranz, R. G. & Lynch, D. L. (1980). *Effect of Irgasan on bacterial growth and its adsorption into the cell wall*, *Micribios* 28: 133-147.

Microban International, Ltd. : www.microban.com (lest 12.05.2010).

Microban International, Ltd. C & K products division:

<http://www.microban.com/americas/english/products/commercial-foodservice/food-preparation/ck-manufacturing> (lest 10.05.2010).

McDonnell, G & Russell, A. D. (1999) *Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance*, *Clinical microbiology reviews*, 12: 147-179.

Møretrø, T., Sonerud, T., Mangelrød, E., S., L. (2006) *Evaluation of the antimicrobial effect of a triclosan-containing industrial floor used in the food industry*, Journal of Food Protection 69: 627-633.

Nesse, L. L., K. Nordby, et al. (2003) *Molecular analyses of Salmonella enterica isolates from fish feed factories and fish feed ingredients*, Applied and Environmental Microbiology 69: 1075-1081.

Otto, M. (2004) *Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci*, Front Biosci 9: 841-863.

Parikh, S. L., Xiao, G. & Tonge, P. J. (2000) *Inhibition of InhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis, by triclosan and isoniazid*, Biochemistry 39: 7645-7650.

Parment, P. A., Ronnerstam, R. & Walder M. (1986) *Persistence of Serratia marcescens, Serratia liquefaciens and E. coli in solutions for contact lenses*, Acta Ophthalmol 64: 456-462.

Paton, J. C., Paton, A. W. (1998) *Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*, Clin. Microbiol. Rev. 11:450-479.

Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. (2009) *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*, Biotechnology Advances 27(1): 76-83.

Regos, J. & Hitz, H. R. (1974) *Investigations on the mode of action of Triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent*, Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie 226: 390-401.

Rode, T. M., Langsrud, S., Holck, A. & Møretrø, T. (2007) *Different patterns of biofilm formation in Staphylococcus aureus under food-related stress conditions*, International Journal of Food Microbiology 116: 372-383.

- Ross, T. and C. Shadbolt (2001) *Predicting Escherichia coli inactivation in uncooked comminuted fermented meat products*, Meat and Livestock Australia.
- Ruosh, W. (1981) *Der quantitative Keimnachweis aus Oberflächen von Holz oder Kunststoff*, Scweis. Arch. Tierheilk 123: 97-103.
- Russel, A. D. (1995) *Mechanisms of bacterial resistance to biocides*, International biodeterioration & biodegradation 36: 247-265.
- Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H., Lassen, J., Lindstedt, B., Brandal, L., Kapperud, G., Aavitsland, P. (2008) *Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive Escherichia coli O103:H25 traced to cured mutton sausages*. BMC Infectious Diseases 8, 41.
- Schweiser, H. P. (2001) *Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics*, FEMS Microbiology Letters 202: 1-7.
- Sekse, C. (2009) *Escherichia coli and their Shiga toxin-encoding bacteriophages – a complex interplay*, Thesis for the degree of *Philosophiae Doctor*, Norwegian School of Veterinary Science: 1-7.
- Slayden, R. A., Lee, R. E. & Barry, C. E., 3rd (2000) *Isoniazid affects multiple components of the type II fatty acid synthase system of Mycobacterium tuberculosis*, Molecular microbiology 38: 514-525.
- Sleigh, J. D. (1983). *Antibiotic resistance in Serratia marcescens*, BMJ 287: 1651-1653.
- Sundheim, G. (1999). *Renhold I næringsmiddelindustrien. Bok.*, Nofima Mat AS, Ås.
- Sundheim, G. & Langsrud, S. (1995). *Natural and acquired resistance of bacteria associated with food processing environment to disinfectant containing an extract from grapefruit seeds*, International biodeterioration & biodegradation, 36: 441-448.

Taponen, S. & Pyörälä, S. (2009) *Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from Staphylococcus aureus?* Veterinary Microbiology, 134: 29-36.

Vestby, L. K., Lönn-Stensrud, J., Møretrø, T., Aamdal-Scheie, A., Benneche, T. & Nesse, L. L. (2009) *A synthetic furanone potentiates the effect of disinfectants on Salmonella in biofilm*, Journal of Applied Microbiology, 108(3): 771-778.

Vischer, W. A. & Regos, J. (1974) *Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum agent for topical application*, Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1 Orig. A 226:376-389.

von Eiff, C., Peters, G. & Heilmann, C. (2002) *Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci*, Lancet Infect Dis, 2: 677-85.

Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., et al. (2006) *Nosocomial infections by Staphylococcus epidermidis: how a commensal bacterium turns into a pathogen*, Int J Antimicrob Agents, 28: 14-20.

VEDLEGG

Vedlegg 1: Medier og løsninger

Vedlegg 2: Rådata

Vedlegg 3: Statistiske beregninger

Vedlegg 1

Medier og løsninger

Tryptone Soya Agar, TSA

40 g pulver ble løst i 1 liter destillert vann. Deretter ble løsningen sterilisert ved 121 °C i 15 minutter. Etter sterilisering ble flaskene avkjølt til ca 50 °C før agaren ble overført til petriskåler.

Tryptone Soya Broth, TSB

30 g pulver ble løst i 1 liter destillert vann. Deretter ble løsningen sterilisert ved 121 °C i 15 minutter.

Standard Plate Count Agar, PCA

23,5 g pulver ble løst i 1 liter destillert vann. Deretter ble løsningen sterilisert ved 121 °C i 15 minutter. Etter sterilisering ble flaskene avkjølt til ca 50 °C før agaren ble overført til petriskåler.

Agar bacteriological ble benyttet for å lage 7 % softagar. 2,1 g pulver ble blandet med 30 g Tryptone Soya Broth pulver og løst i 1 liter vann. Deretter ble løsningen sterilisert ved 121 °C i 15 minutter.

Destillert vann

ELGA Purelab option – R 7/15 (ELGA LabWater, Bucks, UK)

Peptonvann

1 g Bacteriological peptone(Oxoid) og 8,5 g NaCl(Merck KGaA, Tyskland) ble løst i 1 liter destillert vann. pH ble justert til 7,2 og løsningen ble deretter sterilisert ved 121 °C i 15 minutter.

Litiumacetat, LiAc, 99,99 %

Litiumacetatsalt ble løst i destillert vann under oppvarming og med omrøring til løsningen var mettet.

0,02 % Acridine orange

0,02g Acridine orange pulver ble løst i 100 ml destillert vann.

Sterilt destillert vann

Destillert vann ble tappet på flaske og sterilisert ved 121 °C i 15 minutter.

200 ppm Triclosanløsning

50mg triclosan ble løst i 10ml 70 % etanol(5000mg/liter). Det ble benyttet etanol som ikke var denaturert. Deretter ble løsningen fortynnet med sterilt destillert vann slik at konsentrasjonen av triclosan ble 200mg/liter.

500 ppm Sølvnitratløsning

12,5mg salt av sølvnitrat ble løst i 25ml sterilt destillert vann slik at løsningen fikk en konsentrasjon på 500mg/liter.

Vedlegg 2

Innledende forsøk: Overlevelse/vekst etter inkubering ved 100 % relative fuktighet ved 25 °C

Tabell 1-6 viser log cfu/kupong for de ulike bakteriesuspensjonene ved påføringstidspunktet, etter en time tørking og etter inkubering i 24 timer.

Tabell 1: *E. coli*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,93247376	6,39119984	2,25527251
S2	6,93247376	6,38960902	1,95424251
S3	6,93247376	6,14457421	1,95424251
S4	6,93247376	6,22840036	<1
M1	6,93247376	6,15014216	2,25527251
K1	6,93247376	5,39119984	3,06818586
K2	6,93247376	5,72509452	4,8573325
T1	6,93247376	5,53402611	3,10037055
T2	6,93247376	4,43136376	<1

Tabell 2: *Salmonella*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	7,04921802	6,22141424	<1
S2	7,04921802	6,02612452	<1
S3	7,04921802	6,37993972	2,73239376
S4	7,04921802	6,13033377	1,95424251
M1	7,04921802	6,07809415	<1
K1	7,04921802	5,99956549	2,65321251
K2	7,04921802	6,07809415	2,25527251
T1	7,04921802	5,13033377	2,95424251
T2	7,04921802	5,5774918	2,65321251

Tabell 3: *Serratia*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,98227123	6,24649858	1,95424251
S2	6,98227123	6,1528996	<1
S3	6,98227123	6,16908636	<1
S4	6,98227123	6,06145248	<1
M1	6,98227123	6,20951501	4,25527251
K1	6,98227123	6,23754374	1,95424251
K2	6,98227123	6,34163234	2,25527251
T1	6,98227123	5,23299611	3,5563025
T2	6,98227123	4,8573325	2,43136376

Tabell 4: koagulase negative stafylokokker

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,71800317	6,39119984	6,22840036
S2	6,71800317	6,31973049	5,72875948
S3	6,71800317	6,28057837	5,55412558
S4	6,71800317	6,45048005	6,14736711
M1	6,71800317	6,14176323	6,26387268
K1	6,71800317	6,2509077	6,32252939
K2	6,71800317	6,45939249	5,97543181
T1	6,71800317	5,6946052	5,23299611
T2	6,71800317	5,20951501	2,8573325

Tabell 5: *S. aureus*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,91169016	6,37993972	6,04766419
S2	6,91169016	6,05804623	5,8573325
S3	6,91169016	6,00346053	5,80550086
S4	6,91169016	6,14176323	5,92737036
M1	6,91169016	6,16908636	5,98766626
K1	6,91169016	6,16643011	5,75358306
K2	6,91169016	6,15836249	5,76715587
T1	6,91169016	5,31597035	4,95424251
T2	6,91169016	5,59769519	1,95424251

Tabell 6: *L. monocytogenes*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	7,05537833	6,10346162	5,93196611
S2	7,05537833	5,89376176	5,5774918
S3	7,05537833	5,73239376	5,56437012
S4	7,05537833	6,08778142	6,03342376
M1	7,05537833	6,00732095	6,01114736
K1	7,05537833	5,97543181	5,04060234
K2	7,05537833	6,12450422	5,68663627
T1	7,05537833	4,83218946	3,7930916
T2	7,05537833	4,95424251	1,95424251

Innledende forsøk: Overlevelse/vekst etter inkubering ved 70 % relative fuktighet ved 25 °C

Tabell 7-12 viser log cfu/kupong for de ulike bakteriesuspensjonene ved påføringstidspunktet, etter en time tørking og etter inkubering i 24 timer.

Tabell 7: *E. coli*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,93247376	6,39119984	<1
S2	6,93247376	6,38960902	<1
S3	6,93247376	6,14457421	<1
S4	6,93247376	6,22840036	<1
M1	6,93247376	6,15014216	<1
K1	6,93247376	5,39119984	<1
K2	6,93247376	5,72509452	<1
T1	6,93247376	5,53402611	2,73239376
T2	6,93247376	4,43136376	<1

Tabell 8: *Salmonella*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	7,04921802	6,22141424	<1
S2	7,04921802	6,02612452	<1
S3	7,04921802	6,37993972	2,25527251
S4	7,04921802	6,13033377	<1
M1	7,04921802	6,07809415	<1
K1	7,04921802	5,99956549	2,5563025
K2	7,04921802	6,07809415	<1
T1	7,04921802	5,13033377	2,90848502
T2	7,04921802	5,5774918	2,65321251

Tabell 9: *Serratia*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,98227123	6,24649858	<1
S2	6,98227123	6,1528996	<1
S3	6,98227123	6,16908636	<1
S4	6,98227123	6,06145248	<1
M1	6,98227123	6,20951501	3,25527251
K1	6,98227123	6,23754374	<1
K2	6,98227123	6,34163234	<1
T1	6,98227123	5,23299611	3,48572143
T2	6,98227123	4,8573325	2,25527251

Tabell 10: koagulase negative stafylokokker

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,71800317	6,39119984	5,53402611
S2	6,71800317	6,31973049	5,35218252
S3	6,71800317	6,28057837	5,15971755
S4	6,71800317	6,45048005	5,61700034
M1	6,71800317	6,14176323	5,33445375
K1	6,71800317	6,2509077	5,68663627
K2	6,71800317	6,45939249	4,92272546
T1	6,71800317	5,6946052	3,06818586
T2	6,71800317	5,20951501	2,90848502

Tabell 11: *S. aureus*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	6,91169016	6,37993972	5,54530712
S2	6,91169016	6,05804623	5,92737036
S3	6,91169016	6,00346053	5,59769519
S4	6,91169016	6,14176323	5,45939249
M1	6,91169016	6,16908636	3,67851838
K1	6,91169016	6,16643011	5,59769519
K2	6,91169016	6,15836249	5,17955179
T1	6,91169016	5,31597035	3,95424251
T2	6,91169016	5,59769519	2,25527251

Tabell 12: *L. monocytogenes*

	T_0	T_1	T_{24}
Skjærebrett			
S1	7,05537833	6,10346162	4,16643011
S2	7,05537833	5,89376176	3,48572143
S3	7,05537833	5,73239376	4,25527251
S4	7,05537833	6,08778142	4,90848502
M1	7,05537833	6,00732095	4,5563025
K1	7,05537833	5,97543181	4,65321251
K2	7,05537833	6,12450422	3,35218252
T1	7,05537833	4,83218946	2,5563025
T2	7,05537833	4,95424251	1,65321251

Overlevelse/vekst av bakteriesuspensjoner på kuponger etter inkubering ved 100 % relative fuktighet ved 25 °C i 24 og 72 timer.

Tabell 13 – 18 viser log cfu/kupong for bakteriesuspensjonene ved dag 0 – 3.

Tabell 13: *E.coli*

Skjære- brett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,8062	8,7466	8,5775	6,9117	8,7868	8,7024	6,8590	8,7667	8,6400
S2	6,8062	8,6866	8,7024	6,9117	8,6444	8,8055	6,8590	8,6655	8,7540
S3	6,8062	8,6445	8,7803	6,9117	8,8627	8,9274	6,8590	8,7536	8,8539
S4	6,8062	8,5453	8,7536	6,9117	8,7737	8,8733	6,8590	8,6595	8,8135
M1	6,8062	8,6075	8,9410	6,9117	8,2966	8,3856	6,8590	8,4521	8,6633
K1	6,8062	8,4983	8,4983	6,9117	8,8175	8,8573	6,8590	8,6579	8,6778
K2	6,8062	8,4983	8,6263	6,9117	8,8407	8,7993	6,8590	8,6695	8,7128

Tabell 14: *Salmonella*

Skjære- brett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,7723	8,7466	8,5976	6,8854	8,6946	8,5340	6,8289	8,7206	8,5658
S2	6,7723	8,7024	8,5340	6,8854	8,8785	8,7466	6,8289	8,7905	8,6403
S3	6,7723	8,7395	8,7931	6,8854	8,9498	8,7671	6,8289	8,8447	8,7801
S4	6,7723	8,6354	8,4456	6,8854	8,7930	8,7024	6,8289	8,7142	8,6193
M1	6,7723	8,6532	8,7466	6,8854	8,2552	8,4607	6,8289	8,4542	8,6037
K1	6,7723	8,2966	8,7101	6,8854	8,7176	8,7101	6,8289	8,5071	8,7101
K2	6,7723	8,3856	8,4313	6,8854	8,6532	8,8115	6,8289	8,5194	8,6214

Tabell 15: *Serratia*

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,8762	8,7466	8,8234	6,9965	8,5877	8,4607	6,9364	8,6672	8,6421
S2	6,8762	8,5976	8,6263	6,9965	8,6866	8,7803	6,9364	8,6421	8,7033
S3	6,8762	8,7604	8,8115	6,9965	8,7024	8,8518	6,9364	8,7314	8,8317
S4	6,8762	8,7323	8,6532	6,9965	8,7803	8,6946	6,9364	8,7563	8,6739
M1	6,8762	8,7803	8,7101	6,9965	8,5877	8,4014	6,9364	8,6840	8,5558
K1	6,8762	8,4857	8,8573	6,9965	8,7867	8,7930	6,9364	8,6362	8,8252
K2	6,8762	8,7737	8,7501	6,9965	8,6702	8,5976	6,9364	8,7220	8,6739

Tabell 16: koagulase negative stafylokokker

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,7355	8,6354	8,5340	6,7092	8,5105	8,5224	6,7224	8,5730	8,5282
S2	6,7355	8,5340	8,5563	6,7092	8,7466	8,6444	6,7224	8,6403	8,6004
S3	6,7355	8,7101	8,5774	6,7092	8,6443	8,6445	6,7224	8,6772	8,6110
S4	6,7355	8,5877	8,7803	6,7092	8,4456	8,6785	6,7224	8,5167	8,7294
M1	6,7355	8,4857	8,5563	6,7092	8,6263	8,7101	6,7224	8,5560	8,6332
K1	6,7355	8,5976	8,5340	6,7092	8,6946	8,4857	6,7224	8,6461	8,5099
K2	6,7355	8,4166	8,2420	6,7092	8,6170	8,5282	6,7224	8,5168	8,3851

Tabell 17: *S. aureus*

Skjære- brett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,6512	8,4456	8,5563	6,6812	8,7024	8,6702	6,6662	8,5740	8,6133
S2	6,6512	8,5340	8,4456	6,6812	8,7604	8,7466	6,6662	8,6472	8,5961
S3	6,6512	8,5774	8,7737	6,6812	8,6702	8,4014	6,6662	8,6238	8,5876
S4	6,6512	8,5453	8,8175	6,6812	8,7323	8,6444	6,6662	8,6388	8,7310
M1	6,6512	8,1003	8,8055	6,6812	8,1303	8,6532	6,6662	8,1153	8,7294
K1	6,6512	8,5224	8,6443	6,6812	8,7671	8,7323	6,6662	8,6448	8,6883
K2	6,6512	8,3856	8,4857	6,6812	7,8627	8,4014	6,6662	8,1242	8,4436

Tabell 18: *L. monocytogenes*

Skjære - brett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjentak 3			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,9599	7,9084	7,8937	7,0429	8,1303	8,8234				7,0014	8,0194	8,3586
S2	6,9599	7,7993	7,8706	7,0429	8,1846	8,7101				7,0014	7,9920	8,2904
S3	6,9599	8,1303	8,1846	7,0429	7,9956	8,4983				7,0014	8,0630	8,3415
S4	6,9599	8,2764	8,1003	7,0429	8,2764	8,3344				7,0014	8,2764	8,2174
M1	6,9599	7,9084	7,6618	7,0429	7,9084	7,7737	7,1631	8,1003	7,6532	7,0553	7,9724	7,6962
K1	6,9599	8,1303	8,2966	7,0429	7,7993	8,7993	7,1631	8,2764	8,4456	7,0553	8,0687	8,5138
K2	6,9599	8,1003	8,7993	7,0429	8,0681	8,8055	7,1631	8,4014	8,3856	7,0553	8,1899	8,6635

Overlevelse/vekst av bakteriesuspensjoner på kuponger etter inkubering ved 70 % relative fuktighet ved 25 °C i 24 og 72 timer.

Tabell 19 – 14 viser log cfu/kupong for bakteriesuspensjonene ved dag 0 – 3.

Tabell 19: *E. coli*

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjentak 3			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,9365	8,1065	7,3741	6,9599	8,5253	7,5541				6,9482	8,3159	7,4641
S2	6,9365	8,4083	7,3799	6,9599	8,4895	7,6272				6,9482	8,4489	7,5046
S3	6,9365	7,4356	6,7671	6,9599	8,5165	7,6030				6,9482	7,9761	7,1851
S4	6,9365	8,4753	7,4406	6,9599	8,5846	7,4939				6,9482	8,5300	7,4673
M1	6,9365	6,8987	4,5563	6,9599	7,9712	6,7770	7,0236	5,9498	4,3521	6,9733	6,9399	5,2285
K1	6,9365	8,5032	6,5810	6,9599	8,5836	7,5733	7,0236	8,2552	7,9454	6,9733	8,4473	7,4929
K2	6,9365	8,4511	7,6030	6,9599	8,4406	6,3911	7,0236	8,2095	7,2464	6,9733	8,0460	7,0801

Tabell 20: *Salmonella*

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjentak 3			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	7,0492	8,2723	6,3799	7,1283	8,4456	7,5206				7,0888	8,3590	6,9503
S2	7,0492	8,5123	7,5497	7,1283	8,4511	7,5616				7,0888	8,4817	7,5557
S3	7,0492	8,3616	7,4511	7,1283	8,4559	7,5882				7,0888	8,4088	7,5197
S4	7,0492	8,4196	6,5075	7,1283	8,4247	7,5991				7,0888	8,4222	7,0533
M1	7,0492	8,3799	5,8293	7,1283	6,8627	5,3856	7,0553	6,7993	4,9542	7,0776	7,3473	5,3897
K1	7,0492	8,5334	6,5374	7,1283	8,5075	7,6202	7,0553	8,1846	8,0877	7,0776	8,4085	7,4151
K2	7,0492	8,5334	7,5579	7,1283	8,5419	7,5696	7,0553	8,1303	7,3582	7,0776	8,4019	7,4952

Tabell 21: *Serratia*

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjentak 3			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	7,1386	7,3425	6,5774	6,7355	7,3675	5,8293				6,9371	7,3550	6,2034
S2	7,1386	7,9795	6,2907	6,7355	6,9795	5,4313				6,9371	7,4795	5,8610
S3	7,1386	7,9387	6,0845	6,7355	8,1185	4,9542				6,9371	8,0286	5,5194
S4	7,1386	8,3856	5,9132	6,7355	7,3121	4,8573				6,9371	7,8489	5,3853
M1	7,1386	8,4989	5,4166	6,7355	8,3093	4,9956	7,0553	8,0780	6,1690	6,9765	8,2954	5,5271
K1	7,1386	8,5334	6,2886	6,7355	7,3911	5,2329	7,0553	8,4857	7,5563	6,9765	8,1367	6,3593
K2	7,1386	8,4083	6,4075	6,7355	8,2046	5,1303	7,0553	7,9542	6,1664	6,9765	8,1890	5,9014

Tabell 22: koagulase negative stafylokokker

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjentak 3			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,6512	8,3425	7,4247	6,5843	8,5659	7,5659				6,6178	8,4542	7,4953
S2	6,6512	8,5123	6,4753	6,5843	8,4247	7,5659				6,6178	8,4685	7,0206
S3	6,6512	8,6021	7,3425	6,5843	8,5123	7,5123				6,6178	8,5572	7,4274
S4	6,6512	8,4456	7,3425	6,5843	7,5643	6,4850				6,6178	8,0050	6,9138
M1	6,6512	8,0580	5,8937	6,5843	7,5659	5,4983	6,9749	7,7323	6,8115	6,7368	7,7854	6,0678
K1	6,6512	8,5123	7,5419	6,5843	8,5075	7,4306	6,9749	8,2764	7,9876	6,7368	8,4321	7,6534
K2	6,6512	8,4456	7,4661	6,5843	7,6448	6,3975	6,9749	8,1583	7,4456	6,7368	8,0829	7,1031

Tabell 23: *St. aureus*

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjentak 3			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	6,7226	8,3425	7,4029	6,8273	8,4143	7,5032				6,7750	8,3784	7,4531
S2	6,7226	8,5616	6,5206	6,8273	8,4306	7,5810				6,7750	8,4961	7,0508
S3	6,7226	8,3911	7,3912	6,8273	8,5294	7,5293				6,7750	8,4603	7,4603
S4	6,7226	8,3975	7,2946	6,8273	8,2155	6,9856				6,7750	8,3065	7,1401
M1	6,7226	7,5497	5,9836	6,8273	7,5419	5,1846	6,8273	7,7867	6,0681	6,7924	7,6261	5,7454
K1	6,7226	7,5458	7,5419	6,8273	8,4895	7,6532	6,8273	8,4593	7,7466	6,7924	8,1649	7,6472
K2	6,7226	8,3486	5,8987	6,8273	8,2155	5,7993	6,8273	7,7993	7,4371	6,7924	8,1211	6,3784

Tabell 24: *L. monocytogenes*

Skjærebrett	Gjentak 1			Gjentak 2			Gjentak 3			Gjennomsnitt		
	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂	T ₀	T ₂₄	T ₇₂
S1	7,0553	8,2487	6,6444	7,0102	8,0829	5,7604				7,0328	8,1658	6,2024
S2	7,0553	8,4196	6,7101	7,0102	7,7431	6,2190				7,0328	8,0814	6,4646
S3	7,0553	8,0893	5,7466	7,0102	8,0092	6,0909				7,0328	8,0493	5,9188
S4	7,0553	7,9564	5,7993	7,0102	7,8680	6,1003				7,0328	7,9122	5,9498
M1	7,0553	8,2237	5,9712	7,0102	7,1445	5,7466	7,1631	8,0370	6,8115	7,0762	7,8017	6,1764
K1	7,0553	8,1556	6,0334	7,0102	8,1003	5,7867	7,1631	8,1717	8,0956	7,0762	8,1425	6,6386
K2	7,0553	8,3486	5,8987	7,0102	8,2155	5,7993	7,1631	8,1003	6,5957	7,0762	8,2215	6,0979

Antimikrobiell effekt av skjærebrett på kyllingfilets naturlige bakterieflora

Tabell 25 viser \log_{10} for totalt bakterietall på ubehandlet kyllingfilet (kontroll), kupongene eksponert for kyllingfilet i en time og de eksponerte overflatene av kyllingfilet.

Tabell 25: Log bakterietall på kyllingfilet, kuponger eksponert for kylling og den eksponerte overflaten av kyllingfileten.

Parallell	Gjentak 1		Gjentak 2		Gjennomsnitt
	1	2	1	2	
Kylling kontroll	3,2186	3,2327	4,3188	4,6654	3,8589
K1	3,2867	3,5580	4,3364	4,0782	3,8148
Kylling (K1)	3,3629	3,7451	4,3713	3,8590	3,8346
K2	3,5289	3,4110	3,9977	3,4726	3,6026
Kylling (K2)	3,5142	3,4078	4,1594	3,9744	3,7640
M1	3,1417	3,0396	4,2313	4,2746	3,6718
Kylling (M1)	3,1416	3,0396	4,1335	4,5039	3,7047
S2	2,9163	2,9287	4,8341	3,8801	3,6398
Kylling (S2)	3,0359	3,3905	4,1882	3,8652	3,6200

Vedlegg 3

Analyse: T test, Overlevelse/vekst etter 72 timers inkubering ved 100 % relative fuktighet ved 25 °C

L. monocytogenes M1 vs. K2

Two-Sample T-Test and CI: M1; K2

Two-sample T for M1 vs K2

	N	Mean	StDev	SE Mean
M1	3	7,6963	0,0673	0,039
K2	3	8,663	0,241	0,14

Difference = mu (M1) - mu (K2)
Estimate for difference: -0,967
95% upper bound for difference: -0,546
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -6,70 P-Value = 0,011 DF = 2

Analyse: T test, Overlevelse/vekst etter 24 og 72 timers inkubering ved 70 % relative fuktighet ved 25 °C

E. coli M1 vs. K1 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: R; H1

Two-sample T for R vs H1

	N	Mean	StDev	SE Mean
R	3	6,94	1,01	0,58
H1	3	8,447	0,171	0,099

Difference = mu (R) - mu (H1)
Estimate for difference: -1,507
95% upper bound for difference: 0,222
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -2,55 P-Value = 0,063 DF = 2

E.coli M1 vs. K2 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R); GK

Two-sample T for (R) vs GK

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R)	3	6,94	1,01	0,58
GK	3	8,367	0,137	0,079

Difference = mu ((R)) - mu (GK)
Estimate for difference: -1,427
95% upper bound for difference: 0,293
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -2,42 P-Value = 0,068 DF = 2

E. coli M1 vs K1 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: R-72; H1-72

Two-sample T for R-72 vs H1-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
R-72	3	5,23	1,34	0,78
H1-72	3	7,367	0,705	0,41

Difference = mu (R-72) - mu (H1-72)

Estimate for difference: -2,138

95% upper bound for difference: -0,075

T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -2,44 P-Value = 0,046 DF = 3

E. coli M1 vs. K2 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R-72); GK-72

Two-sample T for (R-72) vs GK-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R-72)	3	5,23	1,34	0,78
GK-72	3	7,080	0,623	0,36

Difference = mu ((R-72)) - mu (GK-72)

Estimate for difference: -1,852

95% upper bound for difference: 0,647

T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -2,16 P-Value = 0,081 DF = 2

Salmonella M1 vs. K1 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: R; H1

Two-sample T for R vs H1

	N	Mean	StDev	SE Mean
R	3	7,347	0,895	0,52
H1	3	8,409	0,194	0,11

Difference = mu (R) - mu (H1)

Estimate for difference: -1,061

95% upper bound for difference: 0,482

T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -2,01 P-Value = 0,091 DF = 2

Salmonella M1 vs. K2 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R); GK

Two-sample T for (R) vs GK

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R)	3	7,347	0,895	0,52
GK	3	8,402	0,235	0,14

Difference = mu ((R)) - mu (GK)
 Estimate for difference: -1,055
 95% upper bound for difference: 0,505
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -1,97 P-Value = 0,094 DF = 2

Salmonella M1 vs. K1 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: R-72; H1-72

Two-sample T for R-72 vs H1-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
R-72	3	5,390	0,438	0,25
H1-72	3	7,415	0,795	0,46

Difference = mu (R-72) - mu (H1-72)
 Estimate for difference: -2,025
 95% upper bound for difference: -0,792
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -3,86 P-Value = 0,015 DF = 3

Salmonella M1 vs K2 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R-72); GK-72

Two-sample T for (R-72) vs GK-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R-72)	3	5,390	0,438	0,25
GK-72	3	7,495	0,119	0,069

Difference = mu ((R-72)) - mu (GK-72)
 Estimate for difference: -2,106
 95% upper bound for difference: -1,341
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -8,04 P-Value = 0,008 DF = 2

Serratia M1 vs. K1 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: R; H1

Two-sample T for R vs H1

	N	Mean	StDev	SE Mean
R	3	8,295	0,211	0,12
H1	3	8,137	0,646	0,37

Difference = mu (R) - mu (H1)
 Estimate for difference: 0,159
 95% upper bound for difference: 1,304
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = 0,40 P-Value = 0,637 DF = 2

Serratia M1 vs. K2 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R); GK

Two-sample T for (R) vs GK

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R)	3	8,295	0,211	0,12
GK	3	8,189	0,227	0,13

Difference = mu ((R)) - mu (GK)
Estimate for difference: 0,106
95% upper bound for difference: 0,528
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = 0,59 P-Value = 0,703 DF = 3

Serratia M1 vs. K1 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: R-72; H1-72

Two-sample T for R-72 vs H1-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
R-72	3	5,527	0,594	0,34
H1-72	3	6,36	1,16	0,67

Difference = mu (R-72) - mu (H1-72)
Estimate for difference: -0,832
95% upper bound for difference: 1,370
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -1,10 P-Value = 0,192 DF = 2

Serratia M1 vs. K2 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R-72); GK-72

Two-sample T for (R-72) vs GK-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R-72)	3	5,527	0,594	0,34
GK-72	3	5,901	0,679	0,39

Difference = mu ((R-72)) - mu (GK-72)
Estimate for difference: -0,374
95% upper bound for difference: 0,851
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -0,72 P-Value = 0,262 DF = 3

KNS M1 vs. K1 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: R; H1

Two-sample T for R vs H1

	N	Mean	StDev	SE Mean
R	3	7,785	0,250	0,14
H1	3	8,432	0,135	0,078

Difference = mu (R) - mu (H1)
 Estimate for difference: -0,647
 95% upper bound for difference: -0,260
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -3,94 P-Value = 0,015 DF = 3

KNS M1 vs. K2 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R); GK

Two-sample T for (R) vs GK

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R)	3	7,785	0,250	0,14
GK	3	8,083	0,406	0,23

Difference = mu ((R)) - mu (GK)
 Estimate for difference: -0,297
 95% upper bound for difference: 0,350
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -1,08 P-Value = 0,179 DF = 3

KNS M1 vs K1 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: R-72; H1-72

Two-sample T for R-72 vs H1-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
R-72	3	6,068	0,674	0,39
H1-72	3	7,653	0,295	0,17

Difference = mu (R-72) - mu (H1-72)
 Estimate for difference: -1,586
 95% upper bound for difference: -0,346
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -3,73 P-Value = 0,032 DF = 2

KNS M1 vs. K2 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R-72); GK-72

Two-sample T for (R-72) vs GK-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R-72)	3	6,068	0,674	0,39
GK-72	3	7,103	0,611	0,35

Difference = mu ((R-72)) - mu (GK-72)
 Estimate for difference: -1,035
 95% upper bound for difference: 0,201
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -1,97 P-Value = 0,072 DF = 3

S. aureus M1 vs. K1 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: R; H1

Two-sample T for R vs H1

	N	Mean	StDev	SE Mean
R	3	7,626	0,139	0,080
H1	3	8,165	0,536	0,31

Difference = mu (R) - mu (H1)
Estimate for difference: -0,539
95% upper bound for difference: 0,395
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -1,68 P-Value = 0,117 DF = 2

S. aureus M1 vs. K2 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R); GK

Two-sample T for (R) vs GK

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R)	3	7,626	0,139	0,080
GK	3	8,254	0,398	0,23

Difference = mu ((R)) - mu (GK)
Estimate for difference: -0,627
95% upper bound for difference: 0,084
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -2,58 P-Value = 0,062 DF = 2

S. aureus M1 vs. K1 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: R-72; H1-72

Two-sample T for R-72 vs H1-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
R-72	3	5,746	0,488	0,28
H1-72	3	7,647	0,102	0,059

Difference = mu (R-72) - mu (H1-72)
Estimate for difference: -1,902
95% upper bound for difference: -1,062
T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -6,61 P-Value = 0,011 DF = 2

S. aureus M1 vs. K2 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R-72); GK-72

Two-sample T for (R-72) vs GK-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R-72)	3	5,746	0,488	0,28
GK-72	3	7,366	0,243	0,14

Difference = mu ((R-72)) - mu (GK-72)
 Estimate for difference: -1,621
 95% upper bound for difference: -0,702
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -5,15 P-Value = 0,018 DF = 2

L. monocytogenes M1 vs. K1 ved 24timer

Two-Sample T-Test and CI: R; H1

Two-sample T for R vs H1

	N	Mean	StDev	SE Mean
R	3	7,802	0,577	0,33
H1	3	8,1426	0,0374	0,022

Difference = mu (R) - mu (H1)
 Estimate for difference: -0,341
 95% upper bound for difference: 0,634
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -1,02 P-Value = 0,207 DF = 2

L. monocytogenes M1 vs. K2 ved 24 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R); GK

Two-sample T for (R) vs GK

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R)	3	7,802	0,577	0,33
GK	3	8,222	0,124	0,072

Difference = mu ((R)) - mu (GK)
 Estimate for difference: -0,420
 95% upper bound for difference: 0,575
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -1,23 P-Value = 0,172 DF = 2

L. monocytogenes M1 vs K1 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: R-72; H1-72

Two-sample T for R-72 vs H1-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
R-72	3	6,176	0,561	0,32
H1-72	3	6,64	1,27	0,73

Difference = mu (R-72) - mu (H1-72)
 Estimate for difference: -0,462
 95% upper bound for difference: 1,875
 T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -0,58 P-Value = 0,311 DF = 2

L. monocytogenes M1 vs. K2 ved 72 timer

Two-Sample T-Test and CI: (R-72); GK-72

Two-sample T for (R-72) vs GK-72

	N	Mean	StDev	SE Mean
(R-72)	3	6,176	0,561	0,32
GK-72	3	6,098	0,434	0,25

Difference = mu ((R-72)) - mu (GK-72)

Estimate for difference: 0,079

95% upper bound for difference: 1,043

T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = 0,19 P-Value = 0,570 DF = 3

Analyse: Størrelse på hemmesone for vaskede kuponger sammenlignet med ubehandlede kuponger

Two-Sample T-Test and CI: Vasket; Ubehandlet

Two-sample T for Vasket vs Ubehandlet

	N	Mean	StDev	SE Mean
Vasket	3	6,333	0,577	0,33
Ubehandlet	3	11,00	1,00	0,58

Difference = mu (Vasket) - mu (Ubehandlet)

Estimate for difference: -4,667

95% upper bound for difference: -3,098

T-Test of difference = 0 (vs <): T-Value = -7,00 P-Value = 0,003 DF = 3

Antimikrobiell effekt av skjærebrett på kyllingfilets naturlige bakterieflora

Analyse av innhentet data er gjort med two-sample T test.

Tabell 1: P-verdier ved signifikansmåling av de antimikrobiellekupongene M1 og S2 mot kontroller(K1 og K2) etter en times eksponering for kyllingfilet

Kuponger testet	P-verdi
M1 vs. K1	0,577
M1 vs. K2	0,752
S2 vs. K1	0,425
S2 vs. K2	0,516

Tabell 2: P-verdier ved signifikansmåling av kyllingfilet overflatene eksponert for antimikrobielt materiale(M1 kylling og S2 kylling) mot kyllingfilet overflatene eksponert for kontroller(K1 kylling og K2 kylling)

Kyllingfilet overflater testet	P-verdi
M1 kylling vs. K1 kylling	0,334
M1 kylling vs. K2 kylling	0,430
S2 kylling vs. K1 kylling	0,211
S2 kylling vs. K2 kylling	0,305

Tabell 3: P-verdier ved signifikansmåling av kyllingfilet overflater eksponert for kuponger(M1, S2, K1 og K2 kylling) mot ubehandlet kyllingfilet (kontroll)

Kyllingfilet testet	P-verdi
M1 kylling vs. Kontroll	0,341
S2 kylling vs. Kontroll	0,259
K1 kylling vs. Kontroll	0,462
K2 kylling vs. Kontroll	0,366