

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP



FORORD

Denne oppgaven markerer min avslutning på mastergradsstudiet i matvitenskap – matvaretrygghet, kvalitet og hygiene ved Universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB). Arbeidet med oppgaven ble utført ved Nofima, Ås, som også dekket alle utgifter i forbindelse med oppgaven.

Proessen med å skrive oppgaven har vært både utfordrende og lærerik. Jeg vil spesielt takke mine veiledere ved Nofima, forsker Even Heir og forsker Solveig Langsrud, for god veiledning og oppfølging ved det praktiske arbeidet og under skriveprosessen. Jeg vil takke laboratorieleder Tove Maugesten for god opplæring og hjelp ved gjennomføring av forsøkene.

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

Ås, mai 2013

Sabine Fossmo

SAMMENDRAG

Kontroll med bakterier som *Listeria* utgjør en stor utfordring for mange matprodusenter. *Listeria monocytogenes* er hovedsakelig et produksjonshygienisk problem, forbedret hygiene kan derfor være tiltak for å redusere overlevelse og smitteoverføring av bakterien i produksjonsmiljø. Hensikten med forsøkene i oppgaven var å undersøke effekten av ulike desinfeksjonsstrategier på drap av *L. monocytogenes*, både når bakteriene var i biofilm og i suspensjon. Dette inkluderte bruk av tradisjonelle desinfeksjonsmidler etterfulgt av hypokloritt og klordioksid, i tillatte konsentrasjoner i drikkevann, i skyllevannet etter desinfeksjon.

Det ble benyttet en blanding av seks *L. monocytogenes* stammer isolert fra lakse- og kjøttindustrien. Biofilm ble dannet på stålkuponger over to døgn ved 20 °C. Biofilmen ble utsatt for desinfeksjon med hypokloritt, pereddiksyre og benzalkoniumklorid etterfulgt av hypokloritt og klordioksid i skyllevannet. *L. monocytogenes* i suspensjon ble eksponert for de samme konsentrasjonene av desinfeksjonsmiddel og antimikrobielle komponenter i skyllevannet. Det ble benyttet desinfeksjonsmiddelkonsentrasjoner som ga under to log drap i første desinfeksjonstrinn for å kunne måle drapeseffekt og eventuelle samspillseffekter med de antimikrobielle komponentene i skyllevannet.

Kloridioksid i skyllevannet var effektivt mot *L. monocytogenes* i biofilm, hvor det ledet til signifikant større totaldrap, på 2 log (2 x større drap), i kombinasjon med pereddiksyre ($p=0,002$) og 1 log i kombinasjon med benzalkoniumklorid ($p=0,014$). Hypokloritt som desinfeksjon var svært effektiv mot biofilm dannet av *L. monocytogenes*, hvilket gjorde det vanskelig å detektere ytterligere drap av de antimikrobielle komponentene i skyllevannet. Klordioksid, med konsentrasjonene 0,5 og 1 ppm, i skyllevannet var effektivt mot *L. monocytogenes* i suspensjon, hvor det ledet til signifikant større totaldrap, på over 3 log, i kombinasjon med pereddiksyre ($p=0,000$), over 4 log i kombinasjon med hypokloritt ($p=0,000$) og 1 ppm klordioksid ga et signifikant større totaldrap på 3 log i kombinasjon med benzalkoniumklorid ($p=0,026$).

Hypokloritt i skyllevannet førte til et signifikant større totaldrap, på 2 log, i kombinasjon med pereddiksyre både på *L. monocytogenes* i biofilm ($p=0,002$) og i suspensjon ($p=0,050$) samt i kombinasjon med benzalkoniumklorid på bakterier i biofilm ($p=0,016$). Hypokloritt i skyllevannet ga også et større totaldrap, på 1,5 log, i kombinasjon med hypokloritt som desinfeksjon på bakterier i suspensjon, men dette var ikke signifikant.

Pereddiksyre økte drapeseffekten av klordioksid i skyllevannet både på *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon. Hypokloritt som desinfeksjon førte til signifikant økt effekt av 0,5 ppm klordioksid i skyllevannet på bakterier i suspensjon. Pereddiksyre økte drapeseffekten av hypokloritt i skyllevannet på bakterier i suspensjon.

Dette indikerer at bruk av hypokloritt og klordioksid i skyllevann etter desinfeksjon kan gi økt drap av *L. monocytogenes* både i biofilm og i suspensjon, hvor kombinasjon av desinfeksjonsmidler med samme virkningsmekanismer viste tendens til å gi størst totaldrap.

ABSTRACT

Control of bacteria, as *Listeria*, is a major challenge in the food manufacturing industry. *Listeria monocytogenes* is mainly a hygienic problem, enhanced hygiene can therefore be used to reduce survival and transmission of the bacteria in the production environment. The purpose of this study was to evaluate different disinfection strategies on *L. monocytogenes*, both bacteria in biofilms and in suspension. This included the use of traditional disinfectants followed by hypochlorite and chlorine dioxide, in concentrations that is legally in drinking water, in rinsing water after disinfection.

Six *L. monocytogenes* strains isolated from salmon- and meatindustry were used in the research. The biofilms were initially formed on stainless steel coupons for two days at 20 °C. The biofilm was subjected to disinfection with hypochlorite, peracetic acid and benzalkonium chloride followed by hypochlorite and chlorine dioxide in the rinsing water. *L. monocytogenes* in suspension were exposed to the same concentrations of disinfectant and antimicrobial components in the rinse water. The concentrations of disinfectants that gave approximately two log reduction were selected in the first disinfection step, which made it possible to measure log reduction and possible interactions with the antimicrobial component in the rinsing water.

Chlorine dioxide in the rinsing water was effective against *L. monocytogenes* in biofilm. Chlorine dioxide increased total log reduction with 2 log (2 x greater reduction), in combination with peracetic acid ($p=0,002$) and with 1 log in combination with benzalkonium chloride ($p=0,014$) as the first disinfectants. Hypochlorite as disinfectant was very effective on *L. monocytogenes* in biofilm, which made it difficult to detect further reduction from antimicrobial components in the rinsing water. Chlorine dioxide, in concentrations of 0.5 and 1 ppm, in the rinse water was effective on *L. monocytogenes* in suspension. Where it led to significant greater log reduction, over 3 log, in combinations with peracetic acid ($p=0,000$), over 4 log in combination with hypochlorite ($p=0,000$) and 1 ppm chlorine dioxide gave 3 log greater reduction in combination with benzalkonium chloride ($p=0,026$).

Hypochlorite in the rinse water increased log reduction with 2 log in combinations with peracetic acid both on *L. monocytogenes* in biofilm ($p=0,002$) and in suspension ($p=0,050$), and in combination with benzalkonium chloride on bacteria in biofilm ($p=0,016$). Hypochlorite in the rinse water also led to 1.5 log reduction in combination with hypochlorite as disinfectant on bacteria in suspension, but this was not significant.

Peracetic acid as disinfectant increased the effect of chlorine dioxide in rinsing water both on *L. monocytogenes* in biofilm and in suspension. Hypochlorite as disinfectant increased the effect of 0.5 ppm chlorine dioxide in the rinsing water on bacteria in suspension. Peracetic acid increased the effect of hypochlorite in rinsing water on bacteria in suspension.

This indicates that antimicrobial components in the rinsing water after disinfection may increase reduction of *L. monocytogenes*, both in biofilm and in suspension. Combinations of disinfectants with the same mechanism of action showed greatest total log reduction.

INNHOLDSFORTEGNELSE

1. INNLEDNING	1
2. TEORI	2
2.1 Hygienekrav til næringsmiddelbedrifter.....	2
2.2 Renhold	2
2.2.1 Vask.....	3
2.2.2 Desinfeksjon.....	4
2.3 Forekomst av <i>Listeria</i> i næringsmidler og produksjonsmiljø.....	5
2.3.1 Metoder til kontroll av <i>Listeria</i> i næringsmidler	8
2.3.2 Vekst og overlevelse i produksjonsmiljø - Persistens	9
2.4 Slekten <i>Listeria</i>	11
2.4.1 Arten <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.4.2 Listeriose	13
2.4.3 Virulens	15
2.5 Desinfeksjonsmidler	17
2.6 Oksidative desinfeksjonsmidler.....	18
2.6.1 Natriumhypokloritt.....	19
2.6.2 Pereddiksyre	21
2.6.3 Klordioksid.....	22
2.7 Overflateaktive desinfeksjonsmidler	24
2.7.1 Kvantære ammoniumforbindelser - Benzalkoniumklorid.....	24
2.8 Samspillseffekter mellom desinfeksjonsmidler	25
2.9 Metoder til test av desinfeksjonsmidler.....	26
3. MATERIALER OG METODER	28
3.1 Medium og løsninger.....	28
3.2 Bakteriestammer.....	29
3.2.1 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammene	30
3.3 Produksjon og titrering av klordioksid	30
3.4 Forsøksoppsett.....	32
3.5 Innledende forsøk	33
3.5.1 Celletall i bakteriekulturer	34
3.5.2 Test av nøytraliseringsmiddelets effekt på desinfeksjonsmidlene.....	34

3.5.3	Bestemmelse av egnede konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler.....	35
3.5.4	Effekt av antimikrobielle komponenter i skyllevann på bakterier i suspensjon	39
3.6	Hovedforsøk	40
3.6.1	Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i biofilm.....	40
3.6.2	Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i suspensjon	41
3.6.3	Statistiske analyser	43
4.	RESULTATER.....	44
4.1	Innledende forsøk	44
4.1.1	Celletall i bakteriekulturer	44
4.1.2	Test av nøytraliseringsmiddelets effekt på desinfeksjonsmidlene.....	45
4.1.3	Bestemmelse av egnede konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler.....	45
4.1.4	Effekt av antimikrobielle komponenter i skyllevann på bakterier i suspensjon	48
4.2	Hovedforsøk	50
4.2.1	Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i biofilm.....	50
4.2.2	Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i suspensjon	52
5.	DISKUSJON	56
5.1	Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i biofilm.....	57
5.2	Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i suspensjon	61
5.3	Metodene	62
5.4	Praktisk bruk i matindustrien.....	65
6.	KONKLUSJON	67
7.	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID.....	68
8.	REFERANSER.....	69
9.	VEDLEGG	75

1. INNLEDNING

Listeria monocytogenes har forårsaket flere utbrudd av listeriose, som er en alvorlig næringsmiddelbåren infeksjoner hos mennesker og dyr (Hofshagen et al. 2011). De fleste listeriose tilfellene i Norge skyldes at personer har blitt smittet i eget land (Folkehelseinstituttet MSIS).

Listeria monocytogenes er hovedsakelig et produksjonshygienisk problem, da bakterien har evne til å vokse og danne reservoar i produksjonsmiljø (Veterinærinstituttet & Nasjonalt folkehelseinstitutt 2007). På bakgrunn av bakteriens evne til å overleve og vokse under ulike vekstvilkår kan *L. monocytogenes* spres i produksjonskjeden og kontaminere næringsmidler ved alle produksjonstrinn (Sauders & Wiedmann 2007).

Viktige faktorer for å kontrollere *L. monocytogenes* i produksjonsmiljø er kjennskap til smittekilder, smitteveier og tiltak for å redusere overlevelse og smitteoverføring i produksjonsprosessen. Her vil renhold som omfatter vask og desinfeksjon være viktig tiltak. Stammer av *L. monocytogenes* blir stadig vekk isolert fra overflater i næringsmiddelindustrien, selv om disse overflatene rutinemessig blir vasket og desinfisert (Carpentier & Cerf 2011). Dette indikerer at tradisjonell desinfeksjon ikke er tilstrekkelig og at nye desinfeksjonsstrategier kan bli nødvendige tiltak i fremtiden.

Derfor var formålet med denne oppgaven å undersøke ulike desinfeksjonsstrategiers effekt på drap av *L. monocytogenes*, både når bakteriene var i biofilm og i suspensjon. Hvilket inkluderte bruk av tradisjonelle desinfeksjonsmidler etterfulgt av hypokloritt og klordioksid, i tillatte konsentrasjoner i drikkevann, i skyllevannet etter desinfeksjon.

Oppgaven ligger opp mot to forskningsprosjekter. Det ene er «Tiltak for økt kontroll med *Listeria* i laksenæringen», hvilket er et samarbeid mellom Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF), Norske sjømatbedrifters landsforening (NSL) og Nofima AS. Det andre prosjektet er «Kontroll av *Listeria monocytogenes* ved produksjon av animalske produkter», et samarbeid mellom Kjøtt- og fjørfebransjens Landsforbund, Grilstad AS, Animalia, ISS Facility Services AS, Lilleborg AS, NHO Mat og Landbruk, Veterinærinstituttet og Nofima AS.

2. TEORI

2.1 Hygienekrav til næringsmiddelbedrifter

I næringsmiddelhygieneforskriften stilles det en rekke krav til virksomheter som produserer eller på annen måte behandler næringsmidler. Hygienereglene skal sikre forbrukerne et høyt vernenivå med hensyn til mattrygghet. I forskriften slås det fast at mattrygghet er et resultat av flere faktorer. For det første bør lovgivningen fastsette minstekrav for hygiene, det bør være innført offentlig kontroll for å sikre at driftsansvarlige ved næringsmiddelvirksomhetene overholder kravene og driftsansvarlige bør opprette og gjennomføre programmer for næringsmiddeltrygghet basert på HACCP-prinsippene (Hazard Analysis and Critical Control Points). Ved forskriftens anbefalinger for retningslinjer med hensyn til god hygienepraksis slås det fast at virksomhetene bør ha gode rutiner, praksis og metoder for å sikre at næringsmidler produseres, håndteres, pakkes, lagres og transporteres under hensiktsmessige, hygieniske forhold, herunder effektiv rengjøring, som innebærer desinfisering. Det stilles også krav til at lokaler, gjenstander og utstyr som kommer i kontakt med næringsmidlene skal være utformet på en slik måte at de er lette å rengjøre og om nødvendig desinfiseres. Rengjøring og desinfeksjon skal utføres tilstrekkelig ofte, dette for å unngå risiko for kontaminering (Lovdata 2008).

2.2 Renhold

Renhold er et svært viktig tiltak for å unngå at næringsmidler blir forurenset med sykdomsfremkallende bakterier som *Listeria* eller andre mikroorganismer som reduserer kvalitet og holdbarhet. I de fleste typer industriell matproduksjon foretas et daglig renhold av lokaler og alt utstyr som er i kontakt med næringsmidler. Renholdet har til hensikt å fjerne smuss, som kan gi grobunn for bakterievekst (Forsker Langsrud, S., personlig meddelelse 2013, Sundheim 1999).

Siden *Listeria* er en utbredt bakterie som jevnlig vil kunne re-introduceres i produksjonsmiljøet er det spesielle utfordringer knyttet til renhold for å kunne kontrollere denne bakterien. Siden *Listeria* hovedsakelig er et produksjonshygienisk problem vil forbedret hygiene og hygienisk design av utstyr være viktige preventive tiltak. Andre tiltak

kan være temperaturkontroll og redusert holdbarhet på kjølelagrede produkter hvor bakterien kan vokse (Tompkin et al. 1999; Veterinærinstituttet & Nasjonalt folkehelseinstitutt 2007).

2.2.1 Vask

Hovedhensikten med vask er å fjerne smuss og biofilm fra overflater. Det er viktig å få fjernet organiske stoffer som fettsyrer, proteiner og karbohydrater, og uorganiske stoffer som tungmetaller før desinfeksjon. Da smuss kan reagere med komponenter i desinfeksjonsmidlene og dermed danne uønskede biprodukter og redusere effekten av desinfeksjonstrinnet. Vaskeprosessen kan bestå av mekanisk og kjemisk rengjøring, hvor valg av rengjøringsprosesser blant annet avhenger av type og mengde smuss på overflatene, materialpåvirkninger, miljø og kostnader. Mekanisk rengjøring kan foretas ved skubbing og bruk av vanntrykk, og kjemisk rengjøring ved å benytte vaskemidler basert på ulike kjemikalier (McDonnell 2007; Sundheim 1999).

Vaskeprosessen kan inndeles i følgende punkter:

- Forberedelse til vask, innebærer å rydde bort råvarer, emballasje, unødvendig utstyr samt oppsamling av råvarerester fra gulvet slik at sluker og siler ikke tettes igjen
- Forskylling med vann for å fjerne løst smuss og bløtlegge smuss som sitter fast. Her er det viktig å ikke bruke temperaturer over 40-50 °C da det vil kunne denaturere proteiner slik at de festet bedre til overflater
- Vask, ved bruk av mekaniske og kjemiske krefter. Vaskemidlene trenger igjennom smusset hvor fast smuss brytes ned i mindre deler Fett forsåpes og holdes i vannløsningen, proteiner brytes ned og mineraler holdes i løsningen, slik at det ikke kan festes til overflaten igjen
- Skylling, hvor vaskemiddel- og smussrester fjernes
- Fjerning av overflødig vann er viktig etter rengjøringen da mikroorganismer har mulighet til å oppformeres der det er fukt
- Ettersyn, både visuelt, kjemisk og mikrobiologisk prøvetaking av renholdet. Her kan det tas prøver for å dokumentere at spesielle problemorganismer, som *Listeria*, ikke finnes (Sundheim 1999).

Vaskemidlene inndeles i enzymatiske og ikke-enzymatiske. De enzymatiske inneholder aktive enzymer som degraderer organisk smuss, hvilket kan være lipaser, proteaser og amylaser.

Vaskemidler basert på ikke-enzymatiske komponenter klassifiseres etter pH, hvor de inndeles i sure, alkaliske og nøytrale. Til daglig renhold av lokaler og utstyr benyttes oftest alkaliske midler bestående av lut og hypokloritt. De alkaliske midlene brukes hovedsakelig til fjerning av organisk smuss, og kombinert med mekaniske krefter benyttes de til fjerning av biofilm. De nøytrale midlene brukes til håndvask og lette vaskejobber, mens de sure midlene løser eventuelt mineralbelegg. Det er viktig å være bevisst om at vaskemidler kan korrodere eller ødelegge materialer, dette skal være oppgitt på etikett og i bruksinformasjonen (McDonnell 2007; Sundheim 1999). I tillegg til alkali eller syrer kan vaskemidlene inneholde tensider, vannforbedrere, korrosjonshemmere eller andre kjemikalier som har til hensikt å stabilisere, hindrer skumdannelse eller danne gel. Tensidene består av en hydrofil (vannelskende) og en lipofil (fettelskende) del. Tensidene kan emulgere olje ved at den lipofile delen bindes til olje og den hydrofile delen til vannmolekylene. Dette vil redusere overflatespenningen og finfordele olje og flytende fett slik at det stabiliseres i vannfasen, emulgerer. Smusset vil da bli stabilisert i vannfasen slik at det kan skylles vekk (Sundheim 1999).

Effekten av vasketrinnet påvirkes av konsentrasjonen av vaskemiddel, temperaturen under vask, mekaniske krefter som skrubbing og vanntrykk, eksponeringstid, type smuss, overflatens utforming, vannkvalitet og rengjøringspersonalet. Ved rengjøring av større overflater og utstyr i næringsmiddelindustrien kan flere vaskemetoder benyttes. Dette kan være skum, hvor skumdannende vaskemiddel er tilsatt trykkluft, virketiden av skummet er oftest 15-20 minutter. Annen metode er gel, hvor geldannende vaskemiddel tilsettes vann slik at det dannes en tyktflytende gel, virketiden er 20-45 minutter. Ved trykkvask påføres vaskemiddel og skylling ved å bruke forskjellig vanntrykk. Sirkulasjonsvask, eller CIP-vask (Clean In Place), utføres ved at vaskemiddel sirkulerer i rørsystemer, denne rengjøringen egner seg ved produksjon av flytende produkter som meieriprodukter, øl, saft, juice og olje. En fordel med CIP-vask er at utstyret ikke trenger å demonteres og det kan benyttes sterkere kjemikalier (Sundheim 1999).

2.2.2 Desinfeksjon

Vaskeprosessen etterfølges ofte av desinfeksjon. Sundheim (1999) definerer, ut fra Britisk Standard (BN 5283 1986) desinfeksjon som følgende (oversatt): «*Desinfeksjon er destruksjon av mikroorganismer, men vanligvis ikke av bakteriesporer. Desinfeksjon behøver ikke drepe*

alle mikroorganismer, bare redusere antallet til et nivå som verken kan skade helse eller kvaliteten av matvarer med begrenset holdbarhet».

Desinfeksjon utføres altså for å redusere antall sykdomsfremkallende og kvalitetsforringende mikroorganismer, og dermed forhindre at bakterier som *L. monocytogenes* blir en del av husfloraen (McDonnell 2007; Sundheim 1999). Desinfeksjon kan utføres på flere ulike måter, som fysisk desinfeksjon hvilket innebærer varme, kulde og UV-stråling eller kjemisk desinfeksjon. Her er det vanligst å benytte vannløselige, ferdigformulerte midler, som inneholder en eller flere desinfiserende komponenter som i kombinasjon med kjemikalier forsterker eller stabiliserer virkningen av desinfeksjonsmiddelet (Sundheim 1999).

2.3 Forekomst av *Listeria* i næringsmidler og produksjonsmiljø

I næringsmiddelhygieneforskriften er grensen for *L. monocytogenes* i produkter ved konsum satt til 100 kolonidannende enheter per gram (cfu/g). Her er det spesielle regler for produkter som skal serveres sårbare grupper, hvilket kan være næringsmidler til medisinske formål eller til spedbarn, hvor *Listeria* ikke skal være påvist i 25 gram av produktet. Det stilles krav om at driftsansvarlige ved virksomhetene jevnlig skal ta prøver fra foredlingsområdet og utstyr for å avdekke forekomst av *L. monocytogenes*, og sikre at kriteriene oppfylles under hele holdbarhetstiden. Driftsansvarlige skal analysere utviklingstrekk i prøveresultatene og dersom det konstateres en utvikling mot utilfredsstillende resultater skal nødvendige tiltak øyeblikkelig iverksettes. Dette gjelder særlig ved produksjon av spiseklare produkter som kan være en god vekstarena for *L. monocytogenes*. Disse kravene bør følges for å sikre at *L. monocytogenes* ikke skal utgjøre noen trussel mot folkehelsen (Lovdata 2005; Lovdata 2008).

I Norge er det generelt liten forekomst av *L. monocytogenes* i råvarer, men bearbeidede konsumferdige produkter med lang holdbarhetstid ved kjøleskapstemperatur er potensielle risikoprodukter (Hofshagen et al. 2011; Huss et al. 2000). *L. monocytogenes* er blitt isolert fra mange forskjellige matvaregrupper, som kylling, ulike fiskeprodukter som rå fisk, rakfisk, røkt og gravet fisk, kjøtt, kjøttdeig, reker, ost, grønnsaker, is og varmebehandlet kjøtt pålegg som kokt skinke. Her skal det nevnes at antall *L. monocytogenes* oftest er lavt, under 100 cfu/g. Årsaken til at *L. monocytogenes* er isolert fra et såpass bredt spekter av produkter skyldes at bakterien finnes spredd over alt i miljøet, hvor den blant annet har blitt isolert fra jord, vann, vegetasjon, kloakk, dyrefôr, gårdsbruk og matproduksjonsmiljø. Det er derfor ikke

til å unngå at den befinner seg i mange ulike råvarer og kan kontaminere produkter (Beumer 1997; Rocourt & Cossart 1997; Rørvik 2008; Sauders & Wiedmann 2007). *L. monocytogenes* kan komme inn i produksjonen på ulike måter, hvilket kan være via de ansattes sko og klær, transportutstyr, råvarer, skadedyr og friske bærere av bakterien (Rocourt & Cossart 1997; Truong 2008). En bred forståelse for utbredelsen av *Listeria* spp. og *L. monocytogenes* i miljøet er nødvendig for å kunne kontrollere bakterien i produksjonsmiljø.

Rørvik og Yndestad (1991) foretok en undersøkelse angående forekomsten av *L. monocytogenes* i norske matvarer. Her ble 460 prøver samlet inn, hvor i underkant av 17 % var positive for *L. monocytogenes*. Fem av de positive prøvene hadde et innhold på over 1000 cfu/g og fire hadde et innhold på over 100 cfu/g. Størsteparten av de positive prøvene ble påvist i rå kylling, og sporadisk fra myke oster, reker, vakuumpakkede bearbejdede kjøttprodukter og røykt laks. Kontaminerte konsumferdige produkter med lang holdbarhet ved kjøleskaptemperatur er den største bekymringen, da bakterien har mulighet for oppformering under lagring, selv ved temperaturer ned mot 0 grader (Rørvik 2008).

***Listeria* i fiskeindustri**

Listeria monocytogenes finnes spredd i ferskvann og sjøvann og kan på den måten opptre i akvatiske organismer som fisk, østers, skjell, reker, krabbe, hummer og kamskjell. Disse kan derfor utgjøre potensielle kilder til infeksjon av *L. monocytogenes* hos mennesker. Mange av disse produktene gjennomgår behandlinger som vil kunne inaktivere *Listeria*, da hovedsakelig varmebehandling. Produktene blir ofte kontaminert eller rekontaminert under produksjonsprosesser. Noe som kan skyldes dårlig renhold eller dårlige produksjonsrutiner (Huss et al. 2000; Jinneman et al. 2007).

Det første tilfellet av listeriose som med sikkerhet var knyttet til inntak av fisk eller sjømat ble rapportert i 1989, dette har senere ledet til en rekke undersøkelser for å overvåke tilstedeværelsen av *Listeria* spp. i sjømat (Embarek 1994). I Norge er det generelt liten forekomst av *L. monocytogenes* i villfisk hvor det i zoonoserapporten fra 2011 fremkommer at det ble undersøkt 93 prøver av importerte fiskeprodukter og 70 prøver av norsk villfisk, blant disse prøvene var én prøve av importert fisk positiv for *L. monocytogenes* (Hofshagen et al. 2011).

Listeria monocytogenes er funnet i lett konserverte fiskeprodukter, og i løpet av de siste årene har *L. monocytogenes* jevnlig blitt isolert fra kaldrøykt laks, dette regnes som et risikoprodukt da det ikke gjennomgår videre behandlinger som vil kunne drepe bakterien. Kaldrøykt laks har derfor blitt det sjømatproduktet som har skapt størst bekymring med hensyn til *L. monocytogenes* (Huss et al. 2000). *L. monocytogenes* inaktiveres hvis fisken varmebehandles tilstrekkelig, da med en kjernetemperatur på 70 °C i 2 minutter (Rørvik 2008). Kilden til *Listeria* i varmrøykt fisk er derfor ofte kontaminering fra produksjonsmiljøet etter varmebehandling, dette indikerer at også kaldrøykt fisk kan ha blitt kontaminert fra produksjonsmiljøet, og at bakterien derfor ikke behøver å komme fra fisken som råvare (Embarek 1994).

Jorgensen og Huss (1998) foretok en undersøkelse ved ti røykerier for kaldrøykt laks, ved disse røykeriene ble det jevnlig samlet inn prøver for å undersøke tilstedeværelsen av *L. monocytogenes*. Resultatene fra røykeriene var svært varierende, hvor noen røykeri jevnlig fikk påvist bakterien, mens andre røykeri hadde fullstendig fravær av bakterien. Prøvene ble samlet inn over en periode på 15 måneder. Undersøkelsen konkluderte med at sporadiske kontamineringer av råvarene alene ikke kunne være årsaken til kontaminering av det ferdige produktet sett i noen røykeri. Det var dermed større sannsynlighet for at kontamineringen skjedde under prosessering og bearbeiding. Denne konklusjonen støttes av flere undersøkelser, blant annet av Rørvik et al. (1995), hvor det også ble konkludert med at den rå fisken ikke var hovedkilden til kontaminering av kaldrøykt laks. Undersøkelsen viste at det var færre positive prøver for *L. monocytogenes* tatt av ubearbeidet laks enn fra laks som hadde vært igjennom ulike produksjonstrinn. Det var høy forekomst av *L. monocytogenes* i røykeriet, mens det var lav forekomst i slakteriet og fullstendig fravær av bakterien i sløyet fisk. Dette indikerte at problemet var i røykeriet hvor *L. monocytogenes* hadde etablert reservoar.

***Listeria* i kjøttindustri**

Rapporten; *Kunnskapsstatus knyttet til mattrygghet og smittespredning – kjøtt og kjøttprodukter fra storfe, småfe, svin og fjørfe*, henviser til en norsk undersøkelse fra 1991. I denne undersøkelsen ble *L. monocytogenes* ikke påvist på slakteskrotter og det var lav forekomst av bakterien i bearbeidede kjøttprodukter. Rapporten henviser også til senere undersøkelser som viser til at slakteskrotter og ferskt kjøtt ikke er den viktigste smittekilden

til *L. monocytogenes* i kjøttprodukter (Veterinærinstituttet & Nasjonalt folkehelseinstitutt 2007). Zoonoserapporten fra 2011 underbygger disse undersøkelsene ved å slå fast at det generelt er liten forekomst av *L. monocytogenes* i animalske råvarer i Norge, men at bearbejdede produkter med lang holdbarhet og som ikke varmebehandles før konsum er mulige risikoprodukter. I rapporten henvises det til undersøkelser av risikoprodukter som er foretatt i løpet av de siste årene, hvor blant annet skåret kjøttpålegg inngikk. Blant disse prøvene ble *L. monocytogenes* påvist i mellom 0 og 8 % av prøvene (Hofshagen et al. 2011).

I likhet med fiskeprodukter blir kjøttprodukter ofte kontaminert fra slakte- eller produksjonsmiljøet. I miljøet er det ofte produksjonsutstyr, som kjøttskjæremaskiner, som fungerer som kilde til spredning av *L. monocytogenes*. Dette ble undersøkt av Lin et al. (2006), hvor det tydelig ble vist en sammenheng mellom antall celler *L. monocytogenes* inokulert på skjærebladene til en kjøttskjæremaskin og etterfølgende antall positive prøver tatt av kjøtt som var skjært på den aktuelle maskinen. Jo større antall bakterier inokulert på skjærebladene, jo flere positive prøver for *L. monocytogenes*. I denne undersøkelsen ble det benyttet en miks av fem *L. monocytogenes* stammer og kjøttet som ble skjært på kjøttskjæremaskinen ble vakuumpakket og lagret ved 4 °C.

2.3.1 Metoder til kontroll av *Listeria* i næringsmidler

Viktig tiltak for å hemme *L. monocytogenes* i ferdigprodukter av blant annet kjøtt og fjærkre er tilsetning av organiske syrer som laktat og acetat (Lado & Yousef 2007). De organiske syrene virker ikke ved å endre pH i produktene, men de går inn i bakteriene og endrer intern pH (Forsker Langsrud, S., personlig meddelelse 2013).

Veksten av *L. monocytogenes* vil reduseres ved å øke saltinnholdet i matvaren, da dette vil lede til senkning av vannaktiviteten. Her er det viktig å ta i betraktning at *L. monocytogenes* har evne til å overleve ekstremt høye saltkonsentrasjoner i produkter (se Tabell 2.4.1.1) (Lado & Yousef 2007).

En annen metode er biokontroll, hvilket innebærer å benytte andre mikroorganismer til å hemme eller inaktivere uønskede mikroorganismer. Biokontroll av *L. monocytogenes* kan gjøres ved å tilsette bacteriocin-produserende mikroorganismer, bacteriocinekstrakt eller rent bacteriocin. Noen antilisterale bacteriocin-produserende mikroorganismer er *Lactococcus*

lactis, *Lactococcus acidophilus*, *Leuconostoc carnosum* og *Enterococcus* spp. (Lado & Yousef 2007).

Vekstmulighetene for *L. monocytogenes* i matvarer avhenger av flere faktorer. Beumer et al. (1997) hevder at veksten i et produkt som rått kjøtt er stammeavhengig og at temperatur, pH, tilgjengelighet av mikronæringsstoffer, vannaktivitet, tilstedeværelse av hemmende stoffer og konkurrerende mikroorganismer spiller inn. Her er temperaturen den viktigste faktoren, etterfulgt av vannaktivitet og pH. Disse funnene blir understøttet av flere undersøkelser sammenfattet av Farber og Peterkin (1991), hvor det spesielt understrekes at de konkurrerende mikroorganismene påvirker veksten av *L. monocytogenes* i kjøtt. Her dras spesielt *Lactobacillus* og *Pseudomonas* frem ved at de har en hemmende effekt på vekst av *L. monocytogenes*.

Varmebehandling har til hensikt å drepe de patogene mikroorganismene og sikre at produktene er trygge å spise. Allikevel har *L. monocytogenes* blitt isolert fra slike produkter, som blant annet fra kokte kjøttprodukter. Forekomst av bakterien i disse produktene er kritisk, da de ikke varmebehandles ytterligere før konsum. Virkningen av varmebehandlingsprosessen kan bli overestimert hvis ikke skadede celler av *L. monocytogenes* tas i betraktning. Dette skyldes at varmeskadede celler kan ha muligheten til å reparere seg i rikt media eller i næringsmidler, da spesielt under kjølelagring. Her er det viktig å være bevisst om at også varmebehandlede produkter som inneholder skadede celler kan utgjøre en trussel mot folkehelsen. (Doyle et al. 2001; Rocourt & Cossart 1997).

Her skal det nevnes at ingen av disse metodene bør gå på bekostning av et tilstrekkelig renhold for å kontrollere *L. monocytogenes*.

2.3.2 Vekst og overlevelse i produksjonsmiljø - Persistens

I produksjonsmiljøet trives *L. monocytogenes* på gulv, i siler, kondensert og stillestående vann, pumper, rør, kar, skjæremaskiner, bord, skjærefjølere, tanker samt produksjonsutstyr som transportbånd med mange utforminger. Bakterien trives spesielt godt i der det er kaldt og vått, som kjølerom hvor kun psykrotrofe bakterier kan vokse (Rocourt & Cossart 1997; Sundheim 1999). Stammer av *L. monocytogenes* blir stadigvekk isolert fra overflater i næringsmiddelindustrien, da hovedsakelig i kjølige lokaler, selv om disse overflatene rutinemessig blir vasket og desinfisert (Carpentier & Cerf 2011). Gjentatte problemer med

Listeria krever ofte omhyggelig kartlegging for å avdekke tilholdsstedene hvor renholdet må intensiveres.

Listeria monocytogenes har evnen til å etablere reservoar i produksjonsmiljøet, disse stammene kalles husstammer (Rørvik 2008). Hvis reduksjonen av antall bakterieceller under rengjøring og desinfeksjon er mindre enn økningen av bakterieceller som er under vekst, vil bakteriestammen bli vedvarende i produksjonslokalet. Denne bakteriestammen sies da å være persistent. I motsatt tilfelle, hvis reduksjonen er større enn veksten av bakterieceller er stammen ikke persistent (Carpentier & Cerf 2011). Det har blitt observert at enkelte persistente *L. monocytogenes* stammer har blitt vedvarende i produksjonsmiljøet i mer enn 10 år (Pan et al. 2006). Årsaker til persistens har blitt undersøkt i en rekke studier, som blant annet innebærer resistens overfor desinfeksjonsmiddel, toleranse overfor ulike stress-faktorer som syre og varme samt evne til å adhere til overflater. I samtlige av studiene blir det konkludert med at persistens ikke kan knyttes til en enkelt faktor, men er en sum av flere medvirkende faktorer (Carpentier & Cerf 2011; Heir et al. 2004; Lunden et al. 2008).

Listeria monocytogenes kan vokse i produksjonsmiljøet på flere måter, dette kan være som planktoniske celler på overflater eller inngå i biofilm, da ofte sammen med andre bakterier (Lado & Yousef 2007). Det har blitt foreslått at *L. monocytogenes* evne til å bli vedvarende i produksjonsmiljø skyldes dens evne til å danne biofilm (Pan et al. 2006). Når bakteriene vokser i biofilm, er de mer beskyttet overfor fysiske og kjemiske påvirkninger, og de er i stand til å overleve over en lengre periode uten tilførsel av næring. Det har blitt vist av *L. monocytogenes* er mer resistent mot desinfeksjonsmidler i biofilm enn som planktoniske celler (Jefferson 2004; Mah & O'Toole 2001; Pan et al. 2006). Biofilm dannes i følgende trinn: Planktoniske celler treffer og adherer til en overflate blant annet ved å benytte hydrofile interaksjoner, flageller, fimbrier og pili. På overflaten begynner cellene å formere seg og syntetisere ulike ekstracellulære polysakkarider (EPS), da hovedsakelig polysakkarider av mannose, glukose og N-acetylglucosamin. EPS holder cellene sammen og når de føler tilstedeværelsen av andre mikroorganismer, quorum sensing, aktiveres spesifikke gener, nye proteiner syntetiseres og biofilmen fortsetter å vokse (Behnke & Camper 2012; Lado & Yousef 2007; McDonnell 2007). EPS spiller en viktig rolle ved å beskytte bakteriecellene fra ulike miljøpåvirkninger, som desinfeksjonsprosesser og penetrering av desinfeksjonsmidler inn i cellene (McDonnell 2007).

Dannelse av biofilm kan skje på alle overflater i produksjonsmiljøet samt på utstyr og redskaper. Typisk dannelse av biofilm er på overflater som er vanskelige å rengjøre i det daglige eller er slitte. Biofilm er sett på som en smittekilde som er med til å kontaminere produkter og er derfor viktig å få fjernet (Behnke & Camper 2012; McDonnell 2007; Sundheim 1999; Truong 2008).

Tilstedeværelsen av bakterieceller i produksjonslokalet etter renhold avhenger av effektiviteten av vask og desinfeksjon, samt antall bakterieceller tilstede før vask og desinfeksjon. Undersøkelser har vist at effekten av renholdet er størst på celler som nettopp har adhert til overflater enn celler som har overlevd i produksjonen lenge (Carpentier & Cerf 2011).

Selv om virksomheten har gode produksjonsrutiner, og et velfungerende rengjørings- og sanitær program vil *L. monocytogenes* allikevel kunne komme inn i produksjonsmiljøet. På bakgrunn av dette bør hver bedrift jevnlig foreta mikrobiologisk prøvetaking for *L. monocytogenes* av produktene, både under produksjon og av de ferdige produktene. Den mikrobiologiske prøvetakingen bør inkluderes i bedriftens HACCP-plan (Huss et al. 2000).

2.4 Slekten *Listeria*

Slekten *Listeria* plasseres fylogenetisk i samme gruppe som *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* og *Caryophanon* (Holt et al. 1994). Den fylogenetiske posisjonen til *Listeria* skyldes blant annet det lave innholdet av guanin og cytosin i dens DNA, mellom 36 og 42 % (Rocourt & Cossart 1997; Rocourt & Buchrieser 2007).

Slekten *Listeria* består av åtte arter, hvor to er patogene og seks er apatogene. De patogene artene er *L. monocytogenes* og *L. ivanovii*, med subspecies *ivanovii* og *londoniensis*. Hvor kun *L. monocytogenes* er humanpatogen. De apatogene artene er *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* og *L. rocourtiae* (Graves et al. 2010; Leclercq et al. 2010; O'Connor et al. 2010; Rørvik 2008). *L. marthii* og *L. rocourtiae* er nylig blitt identifisert fra henholdsvis det naturlige miljøet ved Fingers Lake regionen i New York og fra salat dyrket i Østerrike (Graves et al. 2010; Leclercq et al. 2010).

Listeria er en Gram-positiv, kokkoid, ikke-sporedannende stavbakterie, med en størrelse på 0,4-0,5 µm i diameter og 0,5-2 µm lang. Cellene kan opptre enkeltvis eller i korte kjeder arrangert i V- eller Y form. *Listeria* beveger seg ved hjelp av flageller ved temperaturer mellom 20-25 °C, den har begrenset bevegelse ved temperaturer omkring 37 °C (Holt et al. 1994; Rocourt & Buchrieser 2007).

Listeria artene er fenotypisk like, hvilket henger sammen med høy genomisk likhet. Artene kan allikevel skilles ved en kombinasjon av flere tester, som hemolyse, syreproduksjon fra D-xylose, L-rhamnose, alpha methyl-D-mannoside og mannitol (Rocourt & Buchrieser 2007; Rørvik 2008).

Listeria har evnen til å vokse på de fleste bakteriologiske medier som benyttes i laboratorier. Veksten økes ved tilstedeværelse av sukker, da hovedsakelig glukose, hvor den danner melkesyre, eddiksyre og acetoin som sluttprodukt under aerobe forhold. Ved vekst på petriskåler danner *Listeria* en karakteristisk syrlig lukt, hvilket skyldes dannelse av karboksylsyrer, hydroksylsyrer og alkoholer. Ved vekst i buljong blir buljongen blakket etter 8 til 24 timers inkubering ved 37 °C. I buljong er det typisk å se et klart område på overflaten av mediet, hvilket indikerer at *Listeria* vokser bedre ved lavere oksygennivåer (Rocourt & Buchrieser 2007).

2.4.1 Arten *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes er en fakultativ intracellulær bakterie som har forårsaket mange utbrudd av næringsmiddelbårne infeksjoner hos mennesker og dyr (Cabanés et al. 2002). Dette skyldes blant annet at bakterien har evne til å overleve og vokse under ulike vekstvilkår. Vekstbetingelser er gjengitt i tabell 2.4.1.1.

Tabell 2.4.1.1 Vekstbetingelser for *L. monocytogenes*. Tabell er fremstilt etter opplysninger innhentet fra Rocourt og Buchrieser (2007) og Rørvik (2008).

Parametere	Vekstbetingelser
Temperatur	0-45 °C
pH	4,5-9,2, optimum ved pH 7
NaCl	10 % for vekst, 30 % for overlevelse
Minimum a_w for vekst	0,92
Atmosfære	Fakultativ anaerob og mikroaerofil, vokser i vakuumpakninger og modifisert atmosfære

A_w er vannaktivitet
NaCl er natriumklorid

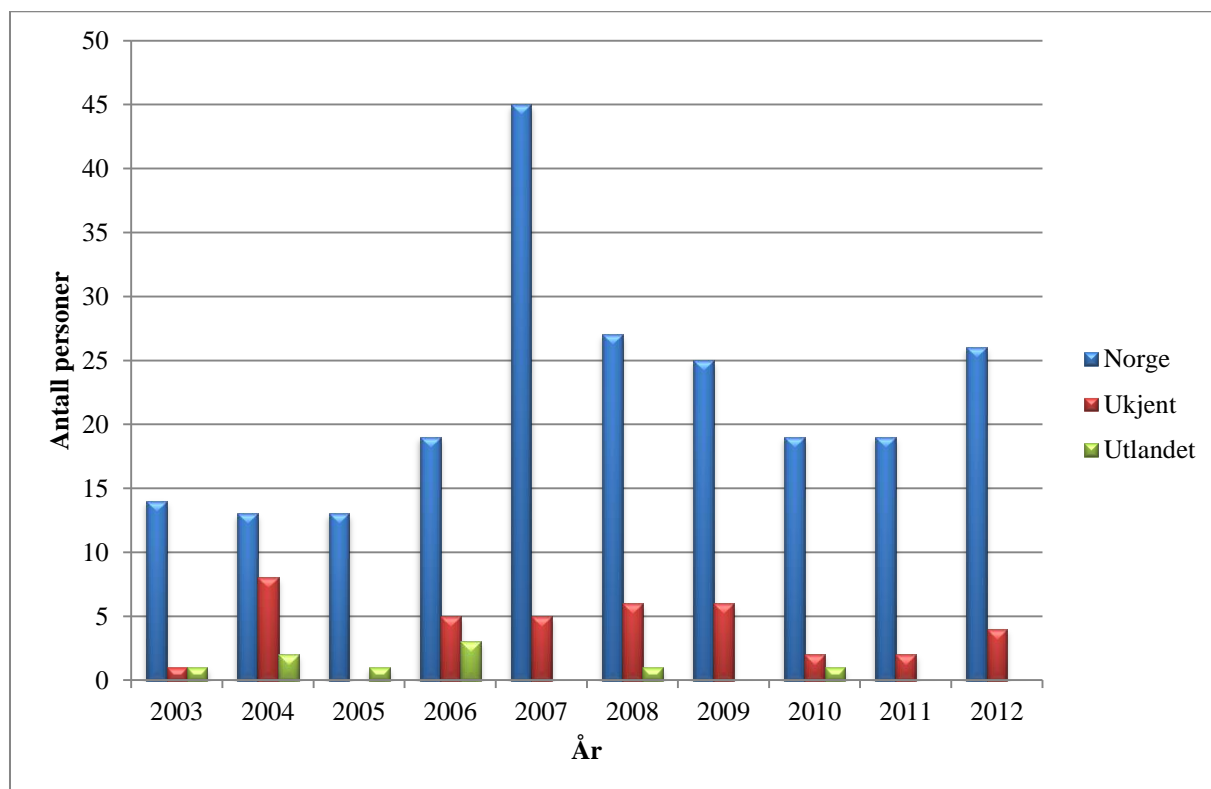
Listeria monocytogenes kan oppformeres i næringsmidler under kjølelagring, hvor den har spesielt gode utviklingsmuligheter i kjøtt- og fiskeprodukter da de har en pH omkring 7. Bakterien har evne til å overleve ved høye saltkonsentrasjoner, opp til 30 % (Rocourt & Buchrieser 2007; Rørvik 2008). Bakterien inaktiveres ved pasteurisering, men den påvirkes ikke vesentlig av frysing. Gjentatte frysinger og lagring ved -18 °C kan skade *L. monocytogenes*, men ikke inaktivere cellene (Rocourt & Cossart 1997; Rørvik 2008).

Ved serologiske klassifiseringsmetoder grupperes *L. monocytogenes* i 13 serotyper. Dette gjøres på bakgrunn av antigen presentert på celleoverflaten, da somatiske (O) og flagelle (H) –antigen. Variasjonene i antigen presentert avhenger av flere overflatestrukturer, inkludert lipoteikoidsyrer, membranproteiner og ekstracellulære organeller som flageller og fimbrier (Lewis et al. 2007). Serotypene 1/2a, 1/2b og 4b er ansvarlige for over 95 % av de humane listeriosetilfellene. Blant isolatene samlet inn fra mennesker er 4b og 1/2b var mest vanlig, mens serotype 1/2a er vanligst i isolat fra næringsmidler og miljø (O'Connor et al. 2010; Rocourt & Cossart 1997; Rørvik 2008; Sauders & Wiedmann 2007).

2.4.2 Listeriose

Listeriose er en alvorlig bakterieinfeksjon forårsaket av *L. monocytogenes*. Sykdommen rammer oftest personer i risikogruppene, som er gravide i siste trimester og deres fostre, nyfødte, eldre og personer med nedsatt immunforsvar. Det antas at gravide har 12-ganger større risiko for å få listeriose ved inntak av næringsmidler som er kontaminert av *L. monocytogenes*, sammenlignet med ikke-gravide (Hof 2003; Rocourt & Cossart 1997; Rørvik 2008).

Sykdommen er meldingspliktig, og skal meldes til meldingssystemet for smittsomme sykdommer (MSIS). I folkehelseinstituttets årsrapport om *Næringsmiddelbårne infeksjoner og utbrudd i 2011* kan det ses at i løpet av de siste ti årene har antall listeriosetilfeller i Norge som er blitt meldt til MSIS variert fra 14 til 50 tilfeller i året (Lange et al. 2011). Figur 2.4.2.1 viser at de fleste listeriose tilfellene i Norge skyldes at personer har blitt smittet i eget land.



Figur 2.4.2.1 Registrerte tilfeller av listeriose i Norge fordelt på smittested (Folkehelseinstituttet MSIS).

Sett i et lengre perspektiv ses det en økende forekomst, noe som muligvis skyldes flere personer i risikogrupperne som eldre og immunsupprimerte. Andre faktorer kan være endrede matvaner og produksjonsrutiner, som eksempelvis større konsum av produkter fra småskalavirksomheter, mer testing og bedre overvåkning (Lange et al. 2011). Her har det også blitt spekulert i at den økende trenden som ses i de nordiske landene kan skyldes høyt inntak av røykte lakseprodukter, som regnes som risikoprodukter (Forsker Heir, E., personlig meddelelse 2013).

Selv om listeriose er en sjelden infeksjon i Norge er det meget alvorlig når den først inntreffer, hvor dødsraten er omkring 20-30 % (Rocourt & Cossart 1997). Symptomene ved listeriose er oppkast, feber, muskelsmerter og i enkelte tilfeller magesymptomer som kvalme, magesmerter, diaré og vekttap. Hvis infeksjonen sprer seg til sentralnervesystemet kan symptomene være forvirring, stiv nakke, tap av balanse og kramper. Vanlige alvorlige

symptomer er blodforgiftning, hjernehinnebetennelse og i verste tilfelle dødsfall. Gravide kan overføre sykdom til fostret uten at de selv blir syke, noe som kan lede til abort, for tidlig fødsel, dødfødsel eller komplikasjoner hos det nyfødte barnet (Farber & Peterkin 1991; Painter & Slutsker 2007; Rørvik 2008).

Inkubasjonstiden for listeriose varierer med hensyn til dosee størrelse og mottagelighet hos pasienten. Det antas å være omkring 30 dager, men det er sett variasjoner fra 11 til 70 dager innenfor samme utbrudd (Rørvik 2008). Ved sporadiske tilfeller og utbrudd av listeriose har det blitt påvist konsentrasjoner i den kontaminerte maten på over 100 cfu/g (Rocourt & Cossart 1997). Her trengs det flere epidemiologiske undersøkelser for å kunne fastsette mer konkret infektiv dose.

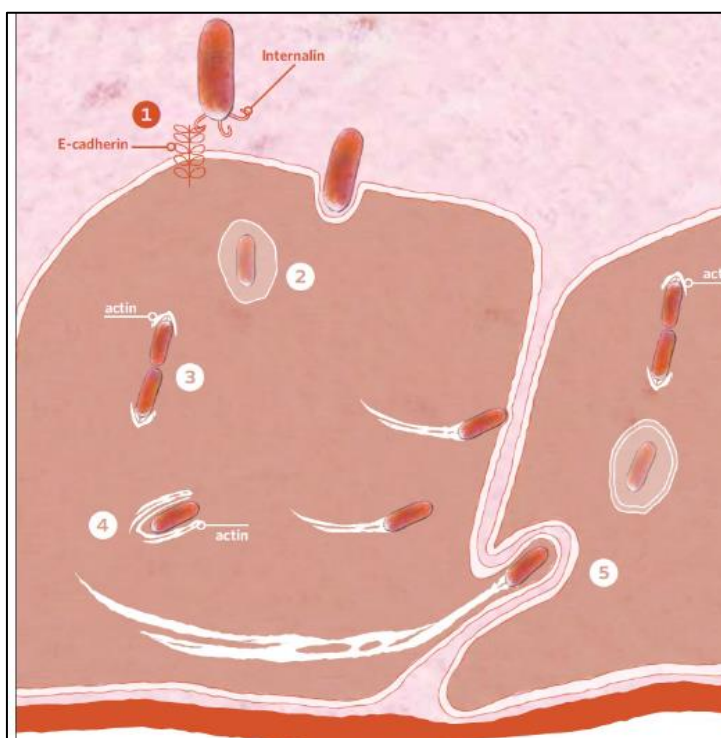
2.4.3 Virulens

Listeria monocytogenes tilhører en gruppe av bakterier som har evnen til å invadere, overleve og replikere inne i fagocyterende celler og alle andre celler i kroppen. Bakterien kan så spres via blodet til andre organer hvor den forårsaker infeksjon. Hovedinnfallsporten for *L. monocytogenes* antas å være gjennom gastrointestinaltrakten, ved passasje gjennom epitelcellene eller M-cellene i peyer's patch (Hof 2003; Rocourt & Cossart 1997; Rørvik 2008).

Listeria monocytogenes uttrykker flere proteiner som er involvert ved en infeksjon. For å kunne penetrere og invadere celler benytter *L. monocytogenes* seg av overflateproteinene internalin A og internalin B. Disse proteinene gjør at bakterien kan bindes til E-cadherin på overflaten av cellene. Når bakterien har kommet inn i fagocyterende celler, som makrofager, vil den kunne overleve og replikeres. Bakterien vil så transporteres med blodet til lymfeknuter, leveren og milten via makrofagene. Her vil bakterien enten bli drept av immunforsvaret eller forårsake en infeksjon. *L. monocytogenes* kan også komme inn i ikke-fagocyterende celler, hvor det blir dannet en vakuole rundt bakterien. For å komme ut av den fagocytiske vakuolen benytter bakterien seg av et poredannende toksin kalt listeriolysin O og en fosfatidylinositol-spesifikk fosfolipase C. Listeriolysin O ødelegger kun membranen til vakuolen og ikke vertscellen, hvilket skyldes at listeriolysin O er mer aktiv ved lav pH som er inne i vakuolen enn ved den nøytrale pH som er ute i cytosolen. Samtidig inneholder listeriolysin O en PEST-sekvens som vil bli gjenkjent av proteasomene hos vertscellen og

listeriolysin O vil hurtig brytes ned før det rekker å ødelegge cellen (Cabanés et al. 2002; Farber & Peterkin 1991; Hof 2003; Rørvik 2008).

Listeria monocytogenes replikeres i cytoplasma. For å kunne bevege seg intracellulært indueres en polymerisering av aktin A. Aktin A rearrangeres til halelignende formasjoner på opp til 40 µm lange som «skyver» bakterien framover i cellen. Ved hjelp av en utposning vil bakterien komme over i nabocellen, her vil det da bli dannet en dobbelvakuole som senere lyses av listeriolysin O og lecithinase. Ved å benytte denne mekanismen kan *L. monocytogenes* spres mellom celler ved å unngå cellenes forsvarsmekanismer, som blant annet består av sirkulerende antistoffer. Dette kan forklare hvorfor antistoffene ikke beskytter mot andregangs infeksjon (Cabanés et al. 2002; Rocourt & Cossart 1997; Rørvik 2008). Figur 2.4.3.1 illustrerer infeksjon med *L. monocytogenes*.



Figur 2.4.3.1. Virulensegenskaper hos *L. monocytogenes*. 1. Bakterien bindes til E-cadherin på vertscellens membran. 2. *Listeria* er inne i vakuolen og skiller ut listeriolysin O, hvoretter den replikeres. 3. Hver bakterie blir omgitt av aktin A. 4. Aktin rearrangeres til haleformasjoner og skyver bakterien framover i cellen og over i nabocellen. 5. Bakterien kommer over i nabocellen og punkt 2 til 5 gjentas. Figuren er hentet fra Cossart (2010).

Virulensen til *L. monocytogenes* er knyttet til hemolysen, listeriolysin O, men enkelte stammer av listeriolysin O har vist seg å være avirulente. Disse stammene er vanskelige å skille ut ved tradisjonell diagnostikk, derfor må alle stammer av *L. monocytogenes* i utgangspunktet betraktes som virulente. Genene som koder for virulensegenskapene til *L.*

monocytogenes er samlet i et gencluster regulert av aktivatorgenet PrfA (Rocourt & Cossart 1997; Rørvik 2008).

2.5 Desinfeksjonsmidler

Innførsel, omsetning og bruk av et aktivt stoff, som desinfeksjonsmiddel, styres i henhold til biocidforskriften, som er basert på EUs biociddirektiv (Lovdata 2003). Her defineres et biocidprodukt som: *«et aktivt stoff eller en stoffblanding som inneholder et eller flere aktive stoffer, og som i den form de overdras til brukeren, er bestemt til å kunne ødelegge, uskadeliggjøre, hindre eller på annen måte bekjempe virkningen av skadeorganismer»*. Formålet med denne forskriften er blant annet å forhindre uakseptable effekter på helse og miljø (Lovdata 2003).

Desinfeksjonsmidler til områder som kommer i kontakt med næringsmidler og fôr tilhører hovedgruppe 1, produktgruppe 4 i biocidforskriften. Dette gjelder alle produkter som benyttes til desinfisering av utstyr, beholdere, spiseredskaper, overflater eller rør i forbindelse med produksjon, transport, lagring eller inntak av næringsmidler, fôr eller drikke til mennesker og dyr (Lovdata 2003).

Egenskapene som ønskes av desinfeksjonsmiddel er (Stanga 2010):

- Bredspektret slik at det har evne til å drepe alle patogene- og kvalitetsforringende mikroorganismer
- Effektive ved lave konsentrasjoner, også ved tilstedeværelse av kontamineringer
- Enkle i bruk
- Kan brukes på alle overflater
- Forårsaker ikke helseskader hos personell
- Enkle å fjerne fra avløpsvann
- Miljøvennlige

Virkestoffene i desinfeksjonsmidlene som benyttes i næringsmiddelindustrien er basert på relativt få stoffgrupper. Hvor det skilles mellom oksidative-, overflateaktive desinfeksjonsmidler og alkoholer (Sundheim 1999).

2.6 Oksidative desinfeksjonsmidler

De vanligste oksidative desinfeksjonsmidlene er basert på klor, hvor hypokloritt inngår, samt oksid- og peroksidforbindelser hvor klordioksid og pereddiksyre inngår (Stanga 2010; Sundheim 1999). Desinfeksjonsmidlene som er basert på kloraktive-, oksid- og peroksidforbindelser dreper mikroorganismer ved å bryte ned viktige cellekomponenter, som lipider, proteiner, nukleinsyrer og karbohydrater (McDonnell 2007). De oksiderende desinfeksjonsmidlene er karakterisert ved at de har en hurtig antimikrobiell aktivitet, men liten restaktivitet (Stanga 2010).

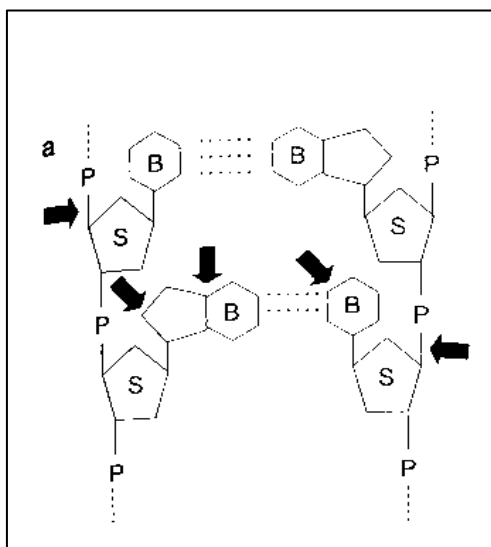
Oksiderende desinfeksjonsmidler angriper strukturelle proteiner, fettsyrer og karbohydrater i celleveggen og cellemembranen hos bakteriene. Strukturen til aminosyrene endres og peptidbåndene mellom aminosyrene brytes, noe som leder til at den primære, sekundære og tertiære strukturen til proteinene endres. Dette fører til tap av enzymaktivitet og proteinstruktur, som er nødvendig for bakterienes normale funksjon (McDonnell 2007).

De oksiderende desinfeksjonsmidlene kan også endre aminosyresekvensen ved å modifisere sidekjedene til aminosyrene. Dette kan være modifiseringer som fører til dannelse av karbonylgrupper som vil senke pH eller endringer av sidekjedene som fører til dannelse av kryssbindinger til andre komponenter. Her er spesielt aminosyren cystein utsatt for modifiseringer. Cystein spiller en viktig rolle ved folding av ulike proteiner, da spesielt proteiner som utskilles fra cytoplasma og som er assosiert med celleveggen eller cellemembranen. Desinfeksjonsmidlene kan føre til at to cystein danner disulfidbindinger, noe som blant annet vil påvirke strukturen til proteinet og regulering av proteinets aktivitet. Dette kalles en oksidativ respons (McDonnell 2007).

Videre angriper de oksiderende desinfeksjonsmidlene fettsyrene i cellemembranen. Umettede fettsyrer er spesielt utsatt grunnet mange dobbeltbindinger. Den totale effekten på cellemembranen er dramatisk, og kan lede til tap av fluiditet, som igjen vil ødelegge strukturen og funksjonen, inkludert permeabiliteten, til cellemembranen. Cellemembranen er et viktig organ for ulike cellefunksjoner, så dens ødeleggelse vil påvirke leveevnen til bakteriene (McDonnell 2007).

Hvis bakteriene ikke er i stand til å reparere skadene på celleveggen og cellemembranen vil desinfeksjonsmidlene kunne trenge inn i cellen og ødelegge celle- og arvematerialet. Når de oksiderende desinfeksjonsmidlene har trengt inn i cellen vil de angripe DNA- og RNA

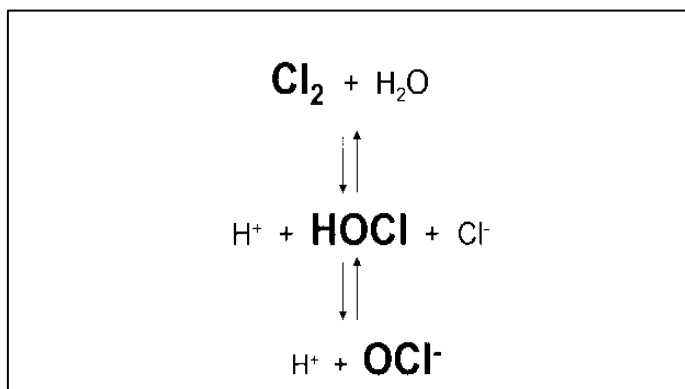
strukturer i tillegg til enzymer og andre proteiner. DNA vil ødelegges ved at nukleotid basene og sukker-fosfat ryggraden angripes, som illustrert i Figur 2.6.1. Ødeleggelse av polynukleotidkjedene kan føre til mutasjoner samt ødeleggelse av cellulære prosesser som replikasjon, transkripsjon og translasjon, som er nødvendige prosesser for oppforming og mikrobiell overlevelse (McDonnell 2007).



Figur 2.6.1 Pilene illustrerer angrepssteder for de oksidative desinfeksjonsmidlene på DNA strukturen, hvilket er nukleotid basene, sukker-fosfat ryggraden og bindingene mellom dem. Figuren er hentet fra McDonnell (2007).

2.6.1 Natriumhypokloritt

Natriumhypokloritt (NaOCl) kan fremskaffes i pulver- eller flytende form, og egner seg til bruk i all næringsmiddelindustri (Lilleborg Profesjonell 2012b). Virkestoffet i natriumhypokloritt er klor som tilhører de halogene stoffene. Klor er et bredspektret virkestoff som ofte benyttes i desinfeksjonsmidler, da det er et svært reaktivt på grunn av høy elektronnegativitet. I forbindelse med desinfeksjon er innholdet av aktivt, også kalt oksiderende, klor interessant. Aktivt klor er et uttrykk for den totale oksiderende kapasiteten i forhold til rent klor. Aktivt klor er klorkomponenter som dannes i vann, hvilket er elementært klor Cl_2 , hypokloritt ioner OCl^- og underklorsyrting HOCl (Figur 2.6.1.1). Den bakteriedrepende effekten til klor skyldes hovedsakelig underklorsyrting, HOCl (McDonnell 2007). Underklorsyrting spaltes i saltsyre (HCl) og oksygen (O), hvor oksygenatomet står for den oksiderende kapasiteten (Lenntech BVa u.å.). Virkningsmekanismen til de oksidative desinfeksjonsmidlene er beskrevet i kapittel 2.6.



Figur 2.6.1.1 Forenklet fremstilling av klor i vann, de komponentene som er viktige for den desinfiserende effekten er fremhevet. Dette er klor Cl_2 , hypokloritt ioner OCl^- og underklorsyrling HOCl . Figuren er hentet fra McDonnell (2007).

Fordelene med å benytte natriumhypokloritt er at det er billig, har god bakteriedrepende effekt, er enkelt å håndtere og fargeløst. Natriumhypokloritt er effektivt mot et bredt spekter av mikroorganismer, inkludert bakterier (både Gram positive og Gram negative), virus, sopp og bakteriesporer (AISE 1997; Stanga 2010). Vegetative bakterier er sensitive overfor lave konsentrasjoner av klor, 0,1 til 0,3 ppm (parts per million) i 30 sekunder er ofte nok, mens sopp, virus og bakteriesporer er betraktelig mer resistente (Folkehelseinstituttet 2008; McDonnell 2007).

Ulempene med natriumhypokloritt er at høye konsentrasjoner kan virke irriterende og føre til hypersensitivitet. Dette skyldes produksjon av uorganiske kloraminer ved reaksjon med ammoniakk og nitrogenholdige komponenter. Høye konsentrasjoner av klor kan også være giftig for fisk og andre akvatiske organismer. Konsentrerte løsninger kan reagere med organiske molekyler og føre til produksjon av biprodukter som de potensielt kreftfremkallende trihalomethaner (THM), inkludert kloroform og bromodichlorometan. Klorbaserte desinfeksjonsmidler må derfor behandles med forsiktighet. Ved høye konsentrasjoner kan natriumhypokloritt forårsake korrosjon av metalloverflater. Korrosiviteten øker om vannet varmebehandles da det kan lede til dannelse av klogass, som er spesielt korrosivt (McDonnell 2007).

Ved produksjon av natriumhypokloritt er vannet først gjort alkalisk med natronlut for å kunne løse mest mulig klor, handelspreparatet har derfor høy pH, omkring 13. Med tanke på stabiliteten og effekt er pH viktig, da alkaliske løsninger er mer stabile. En bruksløsning av natriumhypokloritt på 1350 ppm har en pH på omtrentlig 11. Natriumhypokloritt har best effekt ved pH under 7, men dette brukes lite fordi det dannes klogass som er giftig. Det vanligste er derfor å bruke alkalisk natriumhypokloritt. Natriumhypokloritt bør ikke brukes i

vann ved temperaturer over 50 °C da det vil føre til økt korrosjon (Forsker Langsrud, S., personlig meddelelse 2013, Folkehelseinstituttet 2008; McDonnell 2007).

En konsentrert løsning av natriumhypokloritt er ikke spesielt stabil, men påvirkes av lys og temperatur. For å redusere påvirkningen av lys selges produktet i lystette kanner og kannene bør oppbevares kjølig hos forbrukeren, da helst under 10 °C. Natriumhypokloritt har en blank til lysegul/-grønn farge med fremtredende irriterende klor lukt (Folkehelseinstituttet 2008; Lilleborg Profesjonell 2012b; Sundheim 1999).

Natriumhypokloritt selges i flytende form med konsentrasjoner mellom 1 til 15 % (10000-150000 ppm), da målt i aktivt klor (McDonnell 2007).

I forbindelse med desinfeksjon i næringsmiddelindustrien er det viktig å ta i betraktning at natriumhypokloritt er svært reaktivt med organisk smuss, da særlig proteiner. Dette betyr at desinfeksjonseffekten avtar med økende mengder organisk smuss. Her vil derfor et tilstrekkelig rengjøringsstrinn i forkant av desinfeksjon være viktig for å oppnå tilfredsstillende effekt av desinfeksjonstrinnet. (McDonnell 2007).

2.6.2 Pereddiksyre

Pereddiksyre er et effektivt desinfeksjonsmiddel som egner seg til bruk i næringsmiddelindustri (Lilleborg Profesjonell 2012a). Pereddiksyre ($C_2H_4O_3$) er en blanding mellom eddiksyre (CH_3COOH), hydrogenperoksid (H_2O_2) og vann. Når pereddiksyre løses i vann vil det spaltes til vann, oksygen (O) og karbondioksid (CO_2). Pereddiksyre har veldig sterk oksiderende kapasitet (Lenntech BVb u.å.).

Pereddiksyre angriper mikroorganismene på samme måte som de øvrige oksidative desinfeksjonsmidlene (kapittel 2.6). Pereddiksyre virker direkte på mikroorganismenes overflate og produserer til en viss grad kortlevde radikaler, da hovedsakelig hydroksyl (HO-). Effekten av pereddiksyre på celleveggen hos bakterier og dens evne til å trenge igjennom cellemembranen hos virus har blitt studert gjennom år. Det har blitt konkludert med at pereddiksyre denaturerer og degraderer proteiner og enzymer, hovedsakelig ved å bryte disulfid- (-SH) og svovel- (S-S) bindinger. Samtidig har det blitt vist at pereddiksyre har effekt på DNA og RNA, hvilket er effektivt ved bekjempelse av virus (McDonnell 2007).

Pereddiksyre er effektiv mot et bredt spekter av patogene mikroorganismer, i tillegg til å ha inaktiverende virkning på bakteriesporer, virus og sopp ved relativt lave konsentrasjoner (<3500 ppm). Pereddiksyre er effektiv mot bakterier og sopp ved konsentrasjoner så lave som 30 ppm, og er effektivt til fjerning av biofilm på grunn av sterk oksiderende aktivitet (McDonnell 2007).

Aktiviteten til pereddiksyre avhenger av temperatur og pH. Hvor pereddiksyre er mer aktiv ved pH 7 enn mellom 8 og 9, optimal temperatur for pereddiksyre er ved 52 °C. Senkes temperaturen trengs større mengde for å oppnå samme aktivitet, ved samme pH (Lenntech BVb u.å.; Stanga 2010).

Pereddiksyre selges kommersielt i konsentrasjoner mellom 50-370000 ppm, som en fargeløs væske med en sterk eddiklignende lukt. Pereddiksyrepreparater i konsentrert form virker etsende på øyne, hud og slimhinner, og bør derfor brukes i lukkede systemer (McDonnell 2007; Sundheim 1999).

Pereddiksyre er hyppig benyttet som desinfeksjonsmiddel i næringsmiddelindustrien, da på grunn av at middelet naturlig brytes ned i vann og er effektivt ved fjerning av biofilm (Pan et al. 2006). Typiske konsentrasjoner av pereddiksyre brukt til desinfeksjon er <3500 ppm. Pereddiksyre har en fordel, fremfor natriumhypokloritt, ved at det ikke påvirkes like mye av organisk smuss (McDonnell 2007).

2.6.3 Klordioksid

Klordioksid (ClO_2) er en vannløselig gass som er godkjent til behandling av drikkevann (Mattilsynet 2012). Klordioksid kan lages av reaksjon mellom natriumkloritt (NaClO_2) eller natriumklorat (NaClO_3) og saltsyre (HCl), svovelsyre (H_2SO_4) eller organiske syrer. Klordioksid er et lite, flyktig og veldig sterkt molekyl som løst i vann opptrer som et fritt radikal. I gassfasen er klordioksid reaktivt, men brytes hurtig ned til klorgass (Cl_2) og oksygen (O) (Lenntech BVc u.å.; McDonnell 2007). Klordioksid hydrolyseres ikke i vann, men opptrer som en oppløselig gass, da med spesielt høy oppløselighet i kaldt vann (Lenntech BVc u.å.).

Klordioksid virker desinfiserende via oksidasjon. Klordioksid angriper elektronrike senter på organiske molekyler, hvor et elektron fjernes og klordioksid reduseres til kloritt (ClO_2^-).

Organiske komponenter i bakterieceller reagerer med klordioksid hvilket blant annet leder til ødeleggelse av cellevegg og cellemembraner. Dette kan ende med inaktivering av celler eller celledød. Klordioksid reagerer spesielt med aminosyrene tryptofan, cystein og tyrosin, noe som leder til tap av protein- og enzymstrukturer og funksjoner. Direkte reaksjon med fettsyrer har også blitt rapportert. Det har ikke blitt rapportert om at klordioksid har noen effekt på DNA og RNA, men deres syntese hemmes antagelig på grunn av klordioksids reaksjon med protein (Lenntech BVC u.å.; McDonnell 2007).

Klordioksid er effektivt mot et bredt spekter av mikroorganismer og dras frem som å være et av de mest effektive desinfeksjonsmidlene mot biofilm på grunn av høy oksiderende kapasitet (Stanga 2010). Vaid et al (2010) foretok en undersøkelse for å sammenligne drap i biofilm av fem *L. monocytogenes* stammer ved behandling med klordioksidgass, klordioksid oppløst i vann og natriumhypokloritt. Det ble konkludert med at lave konsentrasjoner av klordioksidgass og klordioksid oppløst i vann (henholdsvis 0,3 ppm og 7 ppm) hadde samme inaktiverende effekt på *L. monocytogenes* som desinfeksjon med 50 ppm natriumhypokloritt.

Klordioksid er aktivt ved pH 6-10, da mest ved høyere pH. Relativt lave konsentrasjoner er anbefalt for å fjerne bakterier og virus, da mellom 0,1 til 0,7 ppm ved romtemperatur og pH 7 (McDonnell 2007). Er det ønskelig å fjerne bakteriesporer kan høyere konsentrasjoner, 200 til 500 ppm i 5 til 30 minutter, benyttes. Klordioksid kan være eksplosivt ved konsentrasjoner mellom 70-80000 ppm i luft (McDonnell 2007).

Klordioksid kan være korrosivt på ulike metaller, som kobber og messing samt plastikk som polykarbonat og polyuretan. Bleking av fargede overflater har også blitt observert. Flytende klordioksid blir ofte betraktet som mer korrosivt enn klordioksid i gassform, noe som sannsynligvis skyldes utvikling av syre (McDonnell 2007).

Klordioksid er mer stabilt i vannfasen, enn i gassfasen, hvor stabiliteten blant annet påvirkes av lys, konsentrasjon, temperatur og eventuell tilstedeværelse av nøytraliserende middel. Klordioksid har en lysegul/-grønn farge og med sterk irriterende klor lukt (McDonnell 2007; Stanga 2010).

Klordioksid kan benyttes på overflater som er i kontakt med næringsmidler, og kan derfor være aktuelt desinfeksjonsmiddel i næringsmiddelindustrien (McDonnell 2007). Klordioksid kan benyttes som et alternativ til andre klorholdige desinfeksjonsmidler, da det ikke etterlater restsmak eller lukt i vannet samt at det dannes mindre potensielt kreftfremkallende stoffer (McDonnell 2007). Andre fordeler ved å benytte klordioksid er fremfor andre klorholdige

desinfeksjonsmidler er at det er mer effektivt ved lave konsentrasjoner og har kortere virketid (Vaid et al. 2010). Smaksgrensen for klordioksid i vann er 0,4 ppm (Folkehelseinstituttet 2008).

Det har vært en økende interesse i å benytte klordioksid for å kontrollere vekst av *Legionella* i drikkevann, da spesielt rettet mot større institusjoner som sykehjem og gamlehjem (Tryland et al. 2012).

2.7 Overflateaktive desinfeksjonsmidler

Det finnes mange desinfeksjonsmidler som baserer seg på overflateaktive komponenter. Midlene som er basert på positivt ladete ioner, kation, er de mest effektive i desinfeksjons sammenheng. En av disse er kvartære ammoniumforbindelser (QAC). Det mest kjente og benyttede desinfeksjonsmidlet basert på QAC er alkyl-dimethyl-benzyl-ammonium klorid, heretter kalt benzalkoniumklorid (BC) (McDonnell 2007).

2.7.1 Kvartære ammoniumforbindelser - Benzalkoniumklorid

Den positivt ladete delen av QAC er bygd opp av nitrogenatom bundet til fire organiske radikaler via enkeltbindinger (R_4N^+), disse er den funksjonelle delen av molekylet. Den negativt ladete delen er ofte klor (Cl^-) som er bundet til nitrogenatomet og det dannes QAC salt (McDonnell 2007). Nitrogenatomet gjør at zeta potensialet nedsettes slik at desinfeksjonsmidlene lettere absorberes i bakterienes cellevegg (Stanga 2010).

QAC virker bakteriedrepende ved å angripe cellevegg og cellemembran. QAC absorberes i og penetrerer celleveggen, noe som vil ødelegge dens struktur og funksjon. I kontakt med cellemembranen vil QAC reagere med fettsyrene og proteinene, hvilket vil lede til en kaskade av effekter, inkludert tap av struktur og funksjon samt lekkasje fra cytoplasma. Indikasjon på lekkasje fra cytoplasma er ekstracellulær deteksjon av intracellulære komponenter som kalium, uorganisk fosfat, aminosyrer og nukleinsyrer, etter behandling med QAC. Andre effekter av QAC har også blitt rapportert, som påvirkning på proteiner i cytoplasma og DNA, hvilket kan lede til celledød (Buffet-Bataillon et al. 2012; McDonnell 2007).

Den bakteriedrepende effekten av QAC avhenger av type, hvor benzalkoniumklorid ikke har vist drepende effekt på bakteriesporer. For å sikre fjerning av bakterier, alger og sopp

anbefales høye konsentrasjoner, på over 1000 ppm (McDonnell 2007). QAC anbefales til fjerning av biofilm. Ulempen med QAC er at Gram negative bakterier har vist seg å være ganske resistente mot dem, og at de generelt virker best på Gram positive bakterier som *Listeria* (McDonnell 2007; Stanga 2010; Sundheim 1999).

Fordelene med QAC er at midlene ikke forårsaker korrosjon på overflater, ikke er giftige i brukerkonsentrasjoner, er enkle i bruk og har en ren, frisk lukt. Ulempene med QAC er at de kan virke aggressivt på overflater av kobber og messing samt at effekten av enkelte typer kan bli redusert av hardt vann. Høye konsentrasjoner av QAC kan forårsake hudirritasjoner og skader på slimhinner (Buffet-Bataillon et al. 2012; McDonnell 2007).

QAC benyttes ofte til desinfisering av overflater som er i kontakt med næringsmidler. De kan benyttes som spray på bordoverflater, vegger, gulv og lignende eller til skumlegging av hele rom (McDonnell 2007). I motsetning til de oksidative desinfeksjonsmidlene vil QAC etterlate et tynt lag på de desinfiserte overflatene etter skylling. Dette kan være en fordel da overflatene blir desinfisert over en lengre periode (Stanga 2010).

2.8 Samspillseffekter mellom desinfeksjonsmidler

Det er blitt rapportert flere tilfeller hvor kombinasjon av desinfeksjonsmidler har vist seg å gi økt antimikrobiell effekt, sammenlignet med summen av effekten til desinfeksjonsmidlene hver for seg. Her kan det ene desinfeksjonsmidlet øke effekten av det andre. Andre effekter når desinfeksjonsmidler brukes sammen kan være additive effekter hvor effekten blir den samme som om effekten til hvert av desinfeksjonsmidlene slås sammen. Blir effekten av desinfeksjonsmidlene redusert når de benyttes sammen kalles effekten antagonistisk (Russell & Chopra 1996). Ved å benytte flere desinfeksjonstrinn oppnås en lengre eksponeringstid, hvilket kan føre til økt inaktivering av mikroorganismer. Samspillseffekter er også ønskelig med tanke på at dosen og eksponeringstiden kan reduseres, noe som igjen fører til reduserte driftskostnader (Cho et al. 2006).

2.9 Metoder til test av desinfeksjonsmidler

Desinfeksjonsmidler kan ha ulik effekt på forskjellige mikrober. Laboratorieforsøk benyttes ofte til å dokumentere effekten av de kjemiske desinfeksjonsmidlene. Her er det viktig å ta i betraktning at effekten påvirkes av en rekke faktorer, som kan være smussrester, konsentrasjon, temperatur, mengde, virketid, eventuelle vannrester etter renholdet som kan virke fortynnende, overflatens beskaffenhet, biofilmdannelse og resistente bakterier (Sundheim 1999).

En vanlig metode til å utvikle, verifisere og måle effekten av desinfeksjonsmidler er suspensjonstester. Disse utføres på følgende måte (Sundheim 1999):

- Bakteriekulturene fortynnes til en bestemt konsentrasjon
- Bakteriekulturene tilsettes i desinfeksjonsmiddel med kjent konsentrasjon og blandes
- Bakteriekulturene utsettes for desinfeksjonsmidlene i en bestemt eksponeringstid
- Effekten av desinfeksjonsmidlene stoppes ved nøytralisering
- Antall overlevende bakterier bestemmes ved utplating på næringsmedium

For å stoppe drapeseffekten kan desinfeksjonsmidlene fjernes ved filtrering, eller ved at aktive stoffer i desinfeksjonsmidlene nøytraliseres kjemisk. Filtrering gjøres ved å filtrere prøven gjennom et filter med porestørrelse mellom 0,1 og 0,4 μm . Filtret vil da samle opp mikroorganismene mens desinfeksjonsmiddelet vil passere gjennom. På den måten blir mikroorganismene skilt fra desinfeksjonsmiddelet. Kjemiske nøytraliseringsmidler inneholder ofte virkestoffene natriumtiosulfat, lecithin, natriumsulfitt eller glycin (McDonnell 2007). Det finnes en rekke standardiserte suspensjonstester som eksempelvis den Norske Standarden NS-EN 1276:1997 som benyttes til å bestemme effekten av et desinfeksjonsmiddel ved å benytte *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Enterococcus hirae* som testmikrober. Her er det forventet et drap på over fem log ved en virketid på fem minutter (Norges Standardiseringsforbund 1997).

En annen metode er overflatetester som kan benyttes til å verifisere den antimikrobielle aktiviteten til et desinfeksjonsmiddel eller en desinfiserende prosess på en overflate. I overflatetester tørker mikroorganismene inn på en bestemt overflate, hvorefter de eksponeres for en desinfiserende prosess eller et desinfeksjonsmiddel. Overflaten som benyttes til testen kan være en kupong av ønsket materiale, som eksempelvis papir, rustfritt stål, glass eller plastikk. Etter eksponering for desinfeksjonsmiddel, i ønsket tid, overføres kupongen til

nøytraliseringsmiddel. Bakteriene løses fra overflaten ved svabring, sonikering eller vortexing med glasskuler og antall overlevende mikroorganismer kan bestemmes ved utplating på næringsmedium (McDonnell 2007). En standardisert overflatetest er Norsk Standard NS-EN 13697:2001, hvilket er en kvantitativ ikke-porøs overflatetest til evaluering av baktericid-aktivitet og/eller fungicidal aktivitet av kjemiske desinfeksjonsmidler til bruk i mat, for industri- og hjemmebruk og i institusjoner. I denne overflatetesten inokuleres bakterieløsningen på en kupong av rustfritt stål, hvoretter stålkupongen utsettes for desinfeksjonsmiddel. Her kreves en reduksjon av bakterier på fire log i løpet av fem minutter og en reduksjon av sopp på tre log i løpet av 15 minutter, for at et desinfeksjonsmiddel skal betegnes som effektivt (Norges Standardiseringsforbund 2001).

Bakterier som vokser i biofilm er vanskeligere å drepe. Til dette formål finnes det ingen standardiserte laboratoriemetoder, men det gjøres ofte i forskningsstudier på forskjellige måter (Forsker Langsrud, S., personlig meddelelse 2013). Blant annet benyttet Pan et al. (2006) biofilm på stålkuponger og teflonkuponger i undersøkelse angående biofilms resistens mot desinfeksjonsmidler. Her ble bakteriekultur med bestemt konsentrasjon overført på kupongene hvor det jevnlig ble vasket med buljong for å fjerne celler som ikke var festet til kupongene og tilføre ny næring for biofilmdannelse. Kupongene ble inkubert ved 22,5 °C i 48 timer slik at biofilm ble dannet. Biofilmen kunne så bli utsatt for de ønskede desinfeksjonsmidlene. Bakteriene ble løsnet fra kupongene ved svabring av et område på 3,0x1,9 cm. Lignende metode ble benyttet i biofilmforsøk foretatt av Vaid et al. (2010).

3. MATERIALER OG METODER

Alle forsøk med patogene bakterier ble utført på patogen laboratoriet ved Nofima, Ås.

3.1 Medium og løsninger

Oppskriften til medium og løsninger som ble benyttet i forsøkene samt virkestoffene i desinfeksjonsmidlene kan ses i vedlegg 1. Oppsummering av hvilke medium og løsninger som ble benyttet kan ses i de etterfølgende underkapitler.

Medium

Følgende medium ble benyttet i forsøkene:

- Trypton soya agar, TSA (OXOID, Hampshire, England)
- Brain heart infusion buljong, BHI-buljong (OXOID)

Alle medier ble sterilisert i certoklav (Tisch-Autoclav, GmbH, Østerrike) ved 121 °C i 15 minutter. TSA-skålene ble lagret ved 4 °C og BHI-buljong ble lagret ved romtemperatur.

Løsninger

Følgende løsninger ble benyttet i forsøkene:

Løsninger til titrering av klordioksidkonsentrasjon:

- Sterilt vann til fortykning av klordioksid
- Natriumtiosulfatløsning 0,1 N (Titrisol, Merck, Darmstadt, Tyskland)
- Svovelsyre 2 M (Merck)
- Kaliumjodid 99,5 % (Merck)

Løsninger til nøytraliserings tester, biofilm- og suspensjonstester:

- Nøytraliseringsbuljong, DE-medium (Becton, Dickinson and Company, MD, USA)
- Peptonvann (0,1 % w/v peptone; 0,05 % w/v saline)
- Sterilt vann

Nøytraliseringsbuljong ble sterilisert i certoklav ved 121 °C i 15 minutter og lagret ved 4 °C. Peptonvann og sterilt vann ble oppbevart ved romtemperatur.

Ulike konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene:

- Natriumhypokloritt ~12,5 % (Titan Hypo, Lilleborg Profesjonell, Oslo)
- Pereddiksyre ~5 % (Climax SU 388, Lilleborg Profesjonell)
- Benzalkoniumklorid (BioXtra, Sigma-Aldrich, Danmark)
- Klordioksid (Legio Zon[®] Typ CDL5, ProMinent ProMaqua, GmbH, Tyskland)

Ufortynnede konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene ble lagret mørkt ved 4 °C.

3.2 Bakteriestammer

I forsøkene ble det benyttet seks stammer av *L. monocytogenes*, hvor alle var av serotype 1/2a, hvilket er den vanligste serotypen i næringsmidler og miljø (O'Connor et al. 2010). Stammene var isolert fra norsk matindustri, hvor tre var isolert fra prosesseringsanlegg for laks og tre fra kjøttindustri. Fire av stammene ble isolert fra miljøprøver tatt i produksjonsanleggene før produksjonsstart, altså etter renhold. Stammeinformasjon er gitt i Tabell 3.2.1.

Tabell 3.2.1 *L. monocytogenes* stammer benyttet i forsøkene, oppgitt med stammenummer (Nofima) og opprinnelse.

<i>L. monocytogenes</i> stammenummer (Nofima)	Opprinnelse
MF3860	Lakseprosesseringsanlegg L, transportbånd før oppstart
MF4077	Lakseprosesseringsanlegg Å, gulv før oppstart
MF3939	Lakseprosesseringsanlegg K, transportbånd før oppstart
MF4712	Kjøttindustri G, sponprøve ved påleggsslicer

MF4627

Kjøttindustri G, gulv før oppstart

MF4562

Kjøttindustri N, produksjonsutstyr under produksjon

3.2.1 Oppbevaring og dyrking av bakteriestammene

Listeria monocytogenes stammene ble oppbevart i cryorør med BHI-buljong og 20 % glycerol (Merck) ved -20 °C. Stammene ble strøket ut med steril podøse på TSA-skåler og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Agarskålene med kolonier ble oppbevart ved 4 °C og nye skåler ble jevnlig podet slik at det til enhver tid var ferske kolonier på skål. Før hvert forsøk ble enkeltkolonier podet over i rør med BHI-buljong og inkubert ved 12 °C i 48 timer. Se kapittel 4.1.1 for valg av tid og temperatur.

3.3 Produksjon og titrering av klordioksid

Produksjon

Kloridioksid ble produsert på anlegget Legio Zon[®] Typ CDL5 (figur 3.3.1), hvilket har blitt benyttet i tidligere forsøk utført av Tryland et al. (2012). Dette anlegget er konstruert for produksjon og dosering av klordioksid til behandling av drikkevann. Produksjonen ble styrt via kontrollpanelet. Før hver produksjon ble anlegget rensert og hele oppstartsprogrammet ble kjørt. Riktig mengde springvann ble tilført reaktorene og blandet med kalkulerte mengder av saltsyre (<10 %, Lilleborg Profesjonell) og natriumhypoklorittløsning (>2,5 %, Lilleborg Profesjonell), dosert automatisk via to doseringspumper. Produksjonen av klordioksid kan beskrives ut fra følgende formel:



Etter en definert reaksjonstid på 20 minutter, ble den tillagede klordioksidløsningen overført til en lagringstank. Klordioksid kunne så tappes av ved hjelp av en tredje doseringspumpe

(ProMinent ProMaqua 2008). Flasken med klordioksidløsningen ble pakket inn i aluminiumsfolie og lagret ved 4 °C.

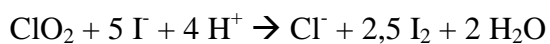


Figur 3.3.1 Klordioksidanlegg Legio Zon[®] Typ CDL5 levert av ProMinent (ProMinent 2013).

Titring

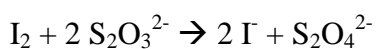
Ved ny produksjon av klordioksid ble konsentrasjonen bestemt ved titring. En produksjon ble benyttet i to uker, hvor det ble foretatt ny titring den andre uken batchen ble benyttet. 10 ml fortynnet klordioksid (1:5) ble overført til et begerglass tilsatt 0,5 gram kaliumjodid og 5 ml 2 M svovelsyre. Klordioksidløsningen ble titrert mot 0,1 mM natriumtiosulfatløsning og mengde (ml) natriumtiosulfat benyttet ble notert.

Ved titringen ble det tilsatt kaliumjodid, hvor prinsippet er at klordioksid kan ta opp 5 elektroner og vil reagere med jod på følgende måte (Suess 2010):



Klor i klordioksid vil da reagere med jod ut fra følgende formel: $\text{Cl}_2 + 2 \text{I}^- \rightarrow 2 \text{Cl}^- + \text{I}_2$

Ut fra denne reaksjonen blir det dannet fritt jod, som vil bli titrert mot tiosulfat slik:



Dette vil gi et fargeomslag fra gul/brun til fargeløs blanding.

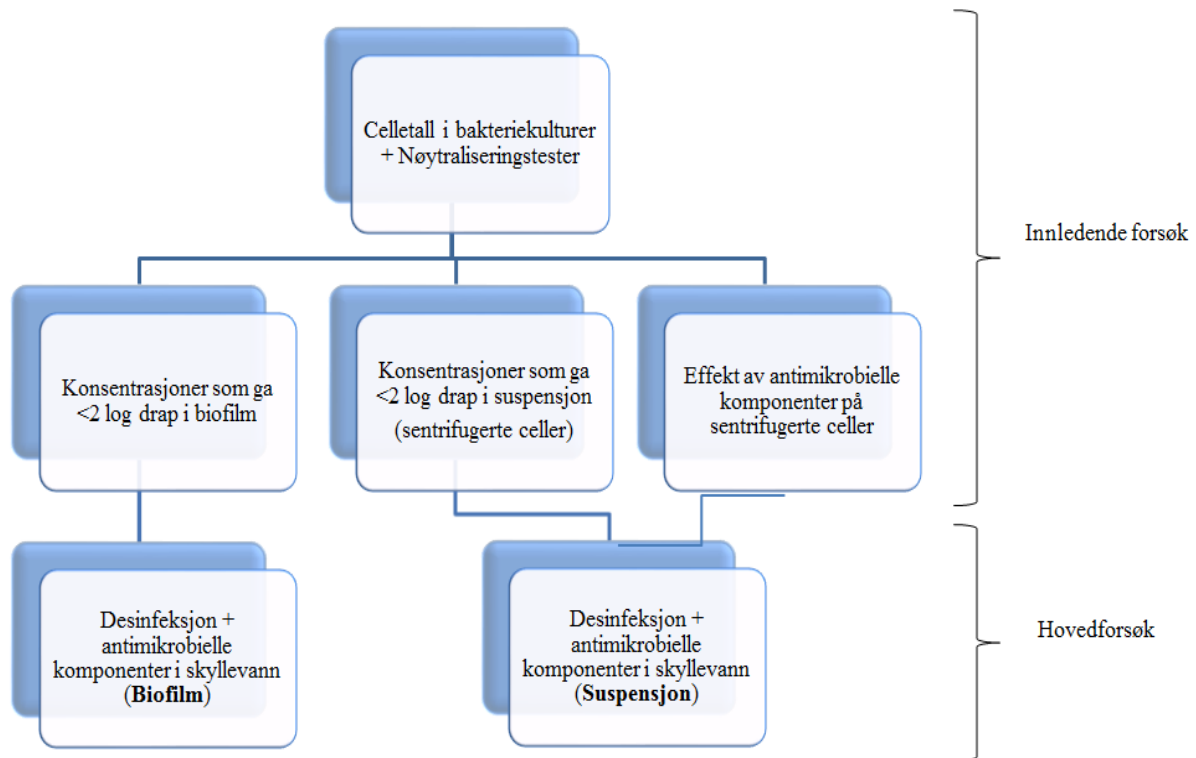
Ved å benytte ekvivalentvekten til klordioksid som er 13,49 g/mol kunne konsentrasjonen (mg/L=ppm) av klordioksid beregnes ut fra følgende formel (Suess 2010):

$$\frac{0,0001 \text{ mol/l} \times 13,49 \text{ g/mol} \times \text{antall ml natriumtiosulfat titrert}}{\text{Prøvevolumet (ml)}}$$

Før forsøk ble klordioksid fortynnet til ønsket konsentrasjon ut fra titreringen. Heretter ble konsentrasjonen målt ved å benytte hurtigmetoden Dulcotest (ProMinent, GmbH, Tyskland), levert av produsenten av klordioksidanlegget. Dette ble gjort for å sikre at konsentrasjonen var riktig.

3.4 Forsøksoppsett

Den bakteriedrepende effekten av tradisjonell desinfeksjon etterfulgt av hypokloritt og klordioksid i tillatte konsentrasjoner i drikkevann (Mattilsynet 2012), i skyllevannet ble undersøkt på *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon. For å kunne kvantifisere disse hovedforsøkene ble det foretatt en rekke innledende forsøk. Figur 3.4.1 viser oversikt over innledende- og hovedforsøkene som er beskrevet i de etterfølgende kapitlene.



Figur 3.4.1 Oversikt over innledende- og hovedforsøk.

3.5 Innledende forsøk

De innledende forsøkene var bestemmelse av celledannelse i bakteriekulturer, test av nøytraliseringseffekt på desinfeksjonsmidlene samt bestemmelse av desinfeksjonsmiddelkonsentrasjonene som ga under to log drap på *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon. Konsentrasjonene som er oppgitt er konsentrasjonene av desinfeksjonsmidlene, ikke av de aktive komponentene.

Hypokloritt vil heretter bli benyttet om natriumhypokloritt, og betegnelsen skyllevann brukes om vann, hypokloritt og klordioksid som benyttes etter desinfeksjon.

3.5.1 Celletall i bakteriekulturer

For å kunne gjøre forsøkene kvantitative var det nødvendig å finne celletall av de ulike bakteriestammene etter oppdyrking i medium under ulike betingelser, som temperatur og tid. Disse celletallene ville bli utgangspunkt for videre forsøk. Det var ønskelig å finne den tid og temperaturen som ga celletall på 10^9 kolonidannende enheter per milliliter suspensjon (cfu/ml), hvilket har blitt benyttet i tidligere desinfeksjonsforsøk foretatt av Best et al. (1990) og Vaid et al. (2010). Høye og kvantitative celletall i bakteriekulturene var ønskelig for å kunne måle bakteriedrepende effekt av de ulike desinfeksjonsmidlene og deretter kunne måle drapeseffekt ved å benytte hypokloritt og klordioksid i skyllevannet.

Prosedyre

Bakteriekolonier ble podet fra TSA-skåler over i BHI-buljong, som ble benyttet som vekstmedium, og inkubert ved 12, 20 og 30 °C, uten risting. Celletallet ble bestemt etter 24, 48, 72 og 96 timers inkubering.

Utplating ble gjort ved hjelp av automatisk spiralutplater (Whitley Automatic Spiral Plater, WASP, Don Whitley Scientific Limited, England), heretter benevnt WASP. WASPen plater ut 50 µl fortynnet bakteriesuspensjon i et kontinuerlig mindre volum i form av en spiral på TSA-skålen. Dette muliggjør flere fortyntninger på en enkelt petriskål. TSA-skålene ble inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer og avlest ved hjelp av automatisk tellemaskin (Acolyte, Colony Counter, Synbiosis, England) som oppgir cfu/ml.

3.5.2 Test av nøytraliseringsmiddelets effekt på desinfeksjonsmidlene

For å kunne kontrollere eksponeringstidene for desinfeksjonsmidlene var det nødvendig å benytte nøytraliseringsmiddel (DE-medium) som stoppet den desinfiserende virkningen.

Til testen ble det benyttet høye konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene:

- 200 ppm hypokloritt
- 100 ppm pereddiksyre
- 100 ppm benzalkoniumklorid (BC)
- 10 ppm klordioksid

Prosedyre

Stammen MF3860 hadde et celletall på 10^9 cfu/ml og ble fortynnet i peptonvann til en konsentrasjon på 10^3 cfu/ml, for å oppnå tellbare skåler. 500 μ l av 10^3 cfu/ml suspensjonen ble så overført til 5 rør med 4,5 ml DE-medium, hvoretter 500 μ l av de ulike desinfeksjonsmidlene ble tilsatt. Som kontroll ble et rør tilsatt 500 μ l sterilt vann. Eksponeringstiden var 5 minutter, hvoretter 100 μ l av prøvene ble platet ut på TSA-skåler ved hjelp av steril vinkelstav. TSA-skålene ble inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer. Skålene ble avlest, cellekonsentrasjonen beregnet og sammenlignet med kontrollen som var sterilt vann.

3.5.3 Bestemmelse av egnede konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler

Hensikten var å finne de konsentrasjonene som ga under to log drap på *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon. Dette var ønskelig for å kunne kvantifisere bakteriedrap i påfølgende skyllevann tilsatt antimikrobielle komponenter.

***Listeria monocytogenes* i biofilm**

Biofilmforsøkene ble utført etter tidligere erfaringer fra desinfeksjonsforsøk foretatt ved Nofima, Ås. Her ble effekten av desinfeksjonsmidlene når bakteriene hadde vokst i biofilm på ståloverflater undersøkt.

Prosedyre

Ved igangsetting av biofilm ble hver bakteriekultur (av de seks stammene) fortynnet til 10^7 cfu/ml i BHI-buljong, hvoretter de ble blandet i forholdet 1:1:1:1:1:1. Med steril pinsett ble sterile stålkuponger (AISI 304, 2x2 cm) overført til sterile cellekultur Brett (Multi dish, 6 wells, Nunc AS, Roskilde, Danmark) med 6 brønner. 5 ml av 10^7 bakteriesuspensjonen ble overført til hver brønn, slik at stålkupongene ble dekket. Lokkene ble satt på cellekultur Brettene og Brettene ble plassert i plastboks uten lokk og inkubert ved 20 °C i 3 timer.

Etter 3 timer ble BHI-buljongen pipettert fra ved hjelp av engangspipette, hvoretter 5 ml steril BHI-buljong ble pipettert i hver brønn, dette ble gjort for å fjerne bakterier som ikke hadde festet seg samt tilføre næring for biofilmdannelse. BHI-buljongen ble tilsatt mot kanten i hver brønn og ikke direkte på stålkupongene. BHI-buljongen ble umiddelbart pipettert fra igjen.

Cellekulturbrettene uten lokk ble plassert i plastboksen, sammen med et lite begerglass med sterilt vann for å unngå uttørking. Lokket ble satt på plastboksen og inkubert ved $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 48 ± 2 timer.

Etter 2 døgns inkubering ble det tilsatt 5 ml sterilt vann til hver brønn og blandet forsiktig ved hjelp av sirkelbevegelser. Dette ble gjort for å vaske stålkupongene og fjerne celler som ikke var i biofilm. Stålkupongene ble heretter overført til sonikeringsrør som inneholdt 6 ml degasset desinfeksjonsmiddel med ønskede konsentrasjoner samt rør med degasset sterilt vann, som ble benyttet som kontroll. Her ble stålkupongene lagt i med biofilmoverflaten opp. Dette ble gjort ved hjelp av en steril pinsett med 20 sekunders mellomrom for å sikre lik eksponeringstid på 5 minutter på alle stålkupongene. Konsentrasjonene ble valgt ut fra tidligere erfaringer ved desinfeksjonsforsøk ved Nofima, Ås.

Følgende konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene ble benyttet i de to første gjentakene:

- 100, 200 og 500 ppm hypokloritt
- 20, 40 og 100 ppm pereddiksyre
- 20, 40 og 100 ppm benzalkoniumklorid, kun et gjentak

Ved endt eksponeringstid ble det tilsatt 34 ml DE-medium i sonikeringsrørene for å nøytralisere desinfeksjonsmidlene. Dette ble gjort med 20 sekunders mellomrom. Rørene ble sonikert i ultralydbad (40 kHz, BRANSON 3510, Branson Ultrasonic Corporation, USA) i 10 minutter for å få biofilmen til å slippe stålkupongene. Prøvene ble fortynnet og platet ut på TSA-skåler ved hjelp av WASP. TSA-skålene ble inkubert ved $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ og avlest ved hjelp av automatisk tellemaskin etter 24, 48 og 72 ± 2 timer. Antall bakterier per kupong ble beregnet.

Den logaritmiske reduksjon i celletall (log drap) ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\begin{aligned} & \text{Log (celletall i kontroll)} \\ & - \text{Log (celletall i rør med desinfeksjonsmiddel)} \\ & = \underline{\underline{\text{Log reduksjon}}} \end{aligned}$$

Ut fra resultatene fra de første biofilmforsøk ble konsentrasjonene justert for å finne de konsentrasjonene som ga under to log drap. Dette ble gjort på samme måte som beskrevet ovenfor.

De nye konsentrasjonene var følgende:

- 50 ppm hypokloritt
- 8 og 20 ppm pereddiksyre
- 5 og 20 ppm benzalkoniumklorid

***Listeria monocytogenes* i suspensjon**

Suspensjonsforsøkene ble satt opp etter Norsk Standard NS-EN 1276:1997 (Norges Standardiseringsforbund 1997), med modifikasjoner, samt ut fra tidligere erfaringer ved Nofima, Ås.

Prosedyre

For å standardisere forsøkene mest mulig ble nøytraliseringsmiddel, peptonvann og sterilt vann satt til temperering i inkubatorskap ved 20 °C dagen før forsøkene skulle gjennomføres. Desinfeksjonsmidlene ble fortynnet til ønskede konsentrasjoner samme dag som forsøket skulle gjennomføres. Kontrollen var sterilt vann. Bakteriekulturene ble fortynnet i peptonvann til en konsentrasjon på 10⁸ cfu/ml og blandet i forholdet 1:1:1:1:1:1.

Det ble tilsatt 500 µl bakteriesuspensjon i røret med 4,5 ml sterilt vann og øvrige rør med 4,5 ml desinfeksjonsmiddel med 20 sekunders mellomrom. Hvert rør ble umiddelbart vortexet. Eksponeringstiden var 5 minutter. Konsentrasjonene ble valgt ut fra tidligere erfaringer ved desinfeksjonsforsøk ved Nofima, Ås.

I første runde ble det benyttet følgende konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene:

- 10, 50 og 100 ppm hypokloritt
- 2, 10 og 30 ppm pereddiksyre
- 4, 20 og 40 ppm benzalkoniumklorid

Etter 5 minutter ble 500 µl av bakteriesuspensjon som var eksponert for desinfeksjonsmiddel eller sterilt vann overført til 4,5 ml DE-medium. Dette ble også gjort med 20 sekunders mellomrom for å sikre at alle prøvene fikk lik eksponeringstid, samtlige prøver ble umiddelbart vortexet. Prøvene ble platet ut ved ulike fortynninger på TSA-skåler ved hjelp av steril vinkelstav og WASP. Det ble platet ut ved flere fortynninger for å sikre tellbare skåler. TSA-skålene ble inkubert ved 30 °C og avlest etter 24, 48 og 72 ±2 timer. Skålene ble avlest

ved hjelp av automatisk tellemaskin og log drap ble beregnet ut fra formel beskrevet i kapittel 3.5.3 *Listeria monocytogenes* i biofilm.

Ut fra resultatene i første innledende suspensjonstest ble det foretatt nye tester for å justere til konsentrasjoner som ga under to log drap. Disse testene ble gjennomført på samme måte som beskrevet ovenfor.

De nye konsentrasjonene som ble benyttet var disse:

- 50 og 75 ppm hypokloritt
- 15 og 20 ppm pereddiksyre
- 10 og 20 ppm benzalkoniumklorid

Betydning av sentrifugering på bakteriedrap

Det var nødvendig å fjerne desinfeksjonsmiddel brukt i første desinfeksjonstrinn fra bakteriecellene før påfølgende bruk av antimikrobielle komponenter i skyllevann på bakterier i suspensjon. Dette ble gjort, etter inspirasjon fra Young og Setlow (2003) og Cho et al. (2006), ved bruk av sentrifugering (Hettich Zentrifugen, Universal 320). Under sentrifugering ble bakteriecellene skilt fra supernatanten som inneholdt desinfeksjonsmiddel eller vann som kontroll. Desinfeksjonsmiddelkonsentrasjonene som ga under to log drap ble derfor testet i suspensjonstest hvor det ble benyttet sentrifugering, for å undersøke om sentrifugeringen påvirket drapet.

Prosedyre

1 ml av 10^8 cfu/ml bakteriesuspensjon, fortynnet i peptonvann, ble overført til falconrør som inneholdt 9 ml av de aktuelle desinfeksjonsmiddelkonsentrasjonene eller vann som kontroll. Dette ble gjort så hurtig som mulig slik at det skulle bli tilnærmet lik eksponeringstid i alle rørene. Rørene ble sentrifugert i 5 minutter ved 1500 omdreininger i minuttet. Ved endt sentrifugering ble supernatanten tømt av. Bakteriecellene som lå i bunnen av falconrørene ble så resuspendert i sterilt vann, som utgjorde skyllevannet. Dette ble gjort med 20 sekunders mellomrom. Eksponeringstiden for skyllevannet ble satt til 5 minutter, slik at det ble mest mulig likt hovedforsøkene som senere skulle gjøres med bruk av sentrifugering.

Heretter ble 500 µl av bakteriesuspensjon i skyllevann (sterilt vann) overført til 4,5 ml DE-medium. Dette ble også gjort med 20 sekunders mellomrom for å sikre at alle prøvene fikk lik

eksponeringstid, samtlige prøver ble umiddelbart vortexet. Prøvene ble fortynnet og platet ut på TSA-skåler ved hjelp av steril vinkelstav og WASP. Prøvene ble platet ut ved flere fortynninger for å sikre tellbare skåler. TSA-skålene ble inkubert ved 30 °C og avlest etter 24, 48 og 72 ±2 timer. Skålene ble avlest ved hjelp av en automatisk tellemaskin, cellekonsentrasjonen ble bestemt og log drap beregnet.

3.5.4 Effekt av antimikrobielle komponenter i skyllevann på bakterier i suspensjon

For å bestemme drapeseffekten av hypokloritt og klordioksid i konsentrasjoner som er lovlige i drikkevann (Mattilsynet 2012), ble det foretatt suspensjonstester. Tillatt konsentrasjon av klordioksid er ≤ 5 ppm ved bruk i internt ledningsnett og kloritt under 0,7 ppm. Produsentens anbefaling angående dosering av klordioksid er 0,1-0,5 ppm (Mattilsynet 2012).

Konsentrasjonene som ble benyttet var disse:

- 0,1 og 0,7 ppm hypokloritt
- 0,5 og 1 ppm klordioksid

Prosedyre

Her ble drapeseffekt bestemt ved ulike eksponeringstider, som var 1 minutt, 5 minutter, 1 time og 4 timer. Fremgangsmåte, utplating og avlesning ble utført som beskrevet i kapittel 3.5.3 *Listeria monocytogenes* i suspensjon.

Betydning av sentrifugering på bakteriedrap

Bakteriecellene skulle utsettes for antimikrobielle komponenter i skyllevannet etter at de hadde blitt utsatt for desinfeksjonsmidler under sentrifugering. Drapeseffekten av antimikrobielle komponenter i skyllevann ble derfor gjort på bakterieceller som først hadde blitt utsatt for sentrifugering, da dette skulle gjøres i hovedforsøkene.

Prosedyre

1 ml av 10⁸ cfu/ml bakteriesuspensjon, fortynnet i peptonvann, ble overført til falconrør som inneholdt 9 ml sterilt vann. Rørene ble sentrifugert i 5 minutter ved 1500 omdreininger i minuttet. Ved endt sentrifugering ble supernatanten tømt av. Bakteriecellene som lå i bunnen av falconrørene ble så resuspendert i skyllevann som var 0,7 ppm hypokloritt, 1 ppm

klordioksid og sterilt vann som kontroll. Dette ble gjort med 20 sekunders mellomrom. Eksponeringstiden for skyllevannet var 1 time.

Heretter ble 500 µl av bakteriesuspensjon i skyllevann overført til 4,5 ml DE-medium. Dette ble også gjort med 20 sekunders mellomrom for å sikre at alle prøvene fikk lik eksponeringstid, samtlige prøver ble umiddelbart vortexet. Prøvene ble fortynnet og platet ut på TSA-skåler ved hjelp av steril vinkelstav og WASP. Prøvene ble platet ut ved flere fortynninger for å sikre tellbare skåler. TSA-skålene ble inkubert ved 30 °C og avlest etter 24, 48 og 72 ±2 timer. Skålene ble avlest ved hjelp av automatisk tellemaskin, cellekonsentrasjonen ble bestemt og log drap utregnet.

3.6 Hovedforsøk

Hensikten med hovedforsøkene var å undersøke den bakteriedrepende effekten ved å benytte hypokloritt og klordioksid, i lovlige konsentrasjoner i drikkevann (Mattilsynet 2012), i skyllevannet etter tradisjonell desinfeksjon. Både på *L. monocytogenes* som vokste i biofilm på ståloverflater og i suspensjon. Desinfeksjon ble foretatt i konsentrasjoner bestemt ut fra de innledende forsøkene, som ga under to log drap. Konsentrasjoner og eksponeringstid for hypokloritt og klordioksid i skyllevannet ble også bestemt ut fra de innledende forsøkene.

3.6.1 Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i biofilm

Metoden med å benytte antimikrobielle komponenter i skyllevannet etter desinfeksjon var en ny metode som ble prøvd ut for første gang ved forsøkene i denne oppgaven. Metoden ble satt sammen ut fra tidligere erfaringer med desinfeksjonsforsøk ved Nofima, Ås.

Igangsetting av biofilm, vasking av stålkuponger og første desinfeksjonstrinn ble gjort som beskrevet i kapittel 3.5.3 *Listeria monocytogenes* i biofilm. Etter eksponeringstid på 5 minutter ved første desinfeksjonstrinn ble stålkupongene overført til nye sonikeringsrør som inneholdt 6 ml skyllevann. Dette ble også gjort med 20 sekunders mellomrom slik at eksponeringstiden på både desinfeksjonstrinnet og skyllingen ble lik. Eksponeringstiden for skyllevannet var 5 minutter.

Følgende konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene ble benyttet:

- 50 ppm hypokloritt
- 8 ppm pereddiksyre
- 5 ppm benzalkoniumklorid

Følgende konsentrasjoner av skyllevann ble benyttet:

- 0,7 ppm hypokloritt
- 0,5 ppm klordioksid
- Sterilt vann som kontroll

Ved endt eksponeringstid ble 34 ml DE-medium tilsatt i sonikeringsrørene hvor stålkupongene lå i skyllevann. Dette ble også gjort med 20 sekunders mellomrom. Rørene med stålkupongen ble sonikert i ultralydbad i 10 minutter for å få biofilmen til å slippe stålkupongene. Prøvene ble fortynnet og platet ut på TSA-skåler ved hjelp av WASP. TSA-skålene ble inkubert ved 30 °C og avlest etter 24 og 48 ± 2 timer. Skålene ble avlest ved hjelp av automatisk tellemaskin, cellekonsentrasjonen ble bestemt og log drap per kupong ble beregnet.

3.6.2 Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i suspensjon

Metoden ved å benytte antimikrobielle komponenter i skyllevannet var en ny metode som ble prøvd ut for første gang ved forsøkene i denne oppgaven. Metoden ble satt sammen ut fra tidligere erfaringer med desinfeksjonsforsøk ved Nofima, Ås.

1 ml av 10^8 cfu/ml bakteriesuspensjon, fortynnet i peptonvann, ble overført til falconrør som inneholdt 9 ml av de aktuelle desinfeksjonsmiddelkonsentrasjonene og vann som kontroll. Dette ble gjort så hurtig som mulig slik at det skulle bli tilnærmet lik eksponeringstid i alle rørene. Rørene ble sentrifugert i 5 minutter ved 1500 omdreininger i minuttet. Eksponeringstiden ved første desinfeksjonstrinn ble derfor 5 minutter (+ 20 sekunder). Det ble kjørt 2 paralleller av de 3 desinfeksjonsmidlene, slik at det totalt ble kjørt 8 rør i hver runde, da 2 rør var kontroll som inneholdt sterilt vann. Rekkefølgen av rørene med de forskjellige desinfeksjonsmidlene ble randomisert for å sikre at eventuelle variasjoner ble tilfeldig og ikke systematisk.

Følgende konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene ble benyttet:

- 50 ppm hypokloritt
- 8 ppm pereddiksyre
- 5 ppm benzalkoniumklorid

Ved endt sentrifugering ble supernatanten tømt av. Bakteriecelleene som lå i bunnen av falconrørene ble så resuspendert i skyllevann. Dette ble gjort med 20 sekunders mellomrom.

Følgende konsentrasjoner av skyllevann ble benyttet:

- 0,7 ppm hypokloritt
- 0,5 og 1 ppm klordioksid
- Sterilt vann som kontroll

Etter første runde i sentrifugen ble alle rørene resuspendert i sterilt vann, ved andre sentrifugering i 0,7 ppm hypokloritt og ved tredje sentrifugering i 0,5 og 1 ppm klordioksid, gitt i Tabell 3.5.2.1. Eksponeringstiden for skyllevannet var 5 og 30 minutter.

Tabell 3.5.2.1 Oversikt over skyllevann benyttet i hver runde i sentrifugen. Det ble benyttet to paralleller av hvert desinfeksjonsmiddel i hver runde.

Desinfeksjonsmiddel	Skyllevann		
	Første runde i sentrifugen	Andre runde i sentrifugen	Tredje runde i sentrifugen
Vann			
Vann			
50 ppm hypokloritt	Resuspendert i vann	Resuspendert i 0,7 ppm hypokloritt	Resuspendert i 0,5 og 1 ppm klordioksid
50 ppm hypokloritt			
8 ppm pereddiksyre			
8 ppm pereddiksyre			
5 ppm BC			
5 ppm BC			

Etter henholdsvis 5 og 30 minutters eksponering ble 500 µl av bakteriesuspensjon i skyllevann overført til 4,5 ml DE-medium. Dette ble også gjort med 20 sekunders mellomrom for å sikre at alle prøvene fikk lik eksponeringstid, samtlige prøver ble umiddelbart vortexet. Prøvene ble fortynnet og platet ut på TSA-skåler ved hjelp av steril vinkelstav og WASP. Prøvene ble platet ut ved flere fortyninger for å sikre tellbare skåler. TSA-skålene ble inkubert ved 30 °C og avlest etter 24, 48 og 72 ±2 timer. Skålene ble avlest ved hjelp av automatisk tellemaskin, cellekonsentrasjon ble bestemt og log drap utregnet.

3.6.3 Statistiske analyser

Excel 2010 ble benyttet til fremstilling av grafer og beregning av standardavvik. ANOVA i MINITABTM ble benyttet til statistiske beregninger av datamaterialet. T-test og Tukey test ble benyttet til å avdekke signifikante forskjeller hvor det ble brukt et signifikansnivå på 5 % ($p < 0,05$).

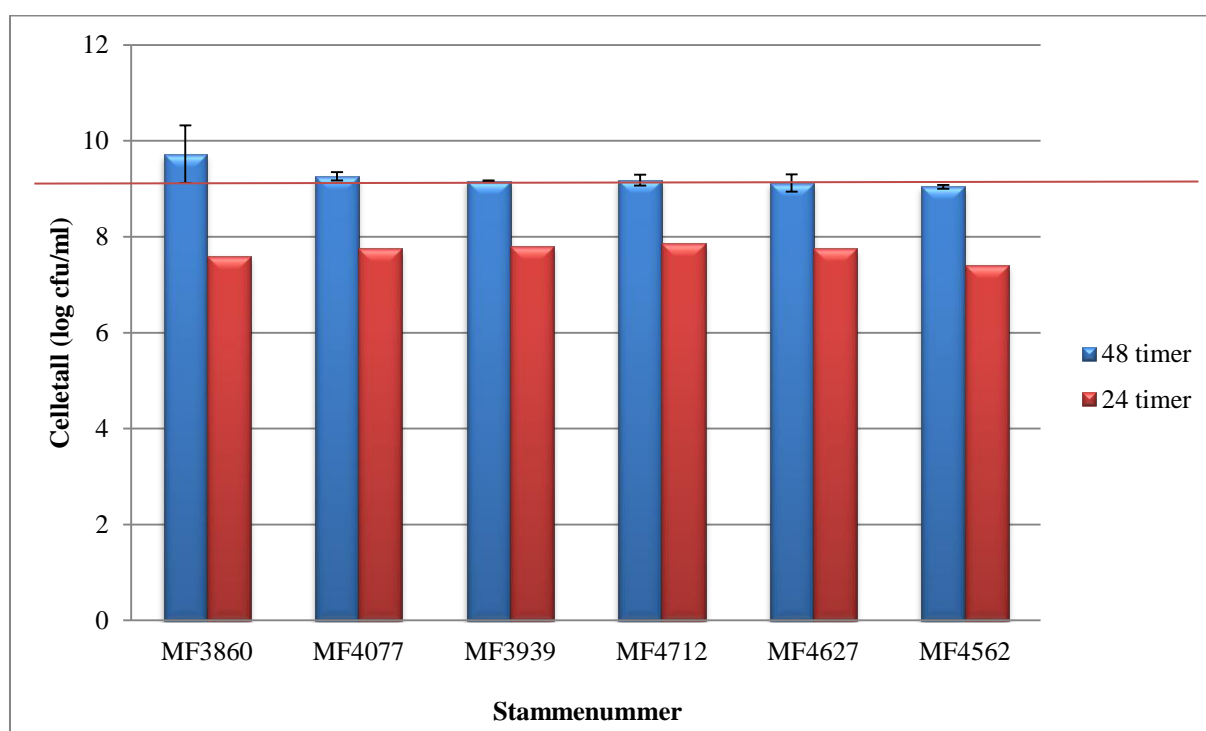
4. RESULTATER

4.1 Innledende forsøk

Innledende forsøk ble foretatt for å bestemme inkuberingstid og temperatur for bakteriekulturene, test av nøytraliseringsmiddelets effekt på desinfeksjonsmidlene samt bestemme konsentrasjoner og eksponeringstid for desinfeksjonsmidler som skulle benyttes i hovedforsøkene. Rådata brukt til utarbeidelse av figurer fra de innledende forsøkene er gitt i vedlegg 2.

4.1.1 Celletall i bakteriekulturer

Bakterietall på over 10^9 cfu/ml ble oppnådd etter 24 timers inkubering ved 20 og 30 °C. Figur 4.1.1.1 viser at inkubering ved 12 °C i 48 timer ga et celletall på 10^9 cfu/ml hos samtlige stammer og at variasjonene mellom gjentakene var lite.

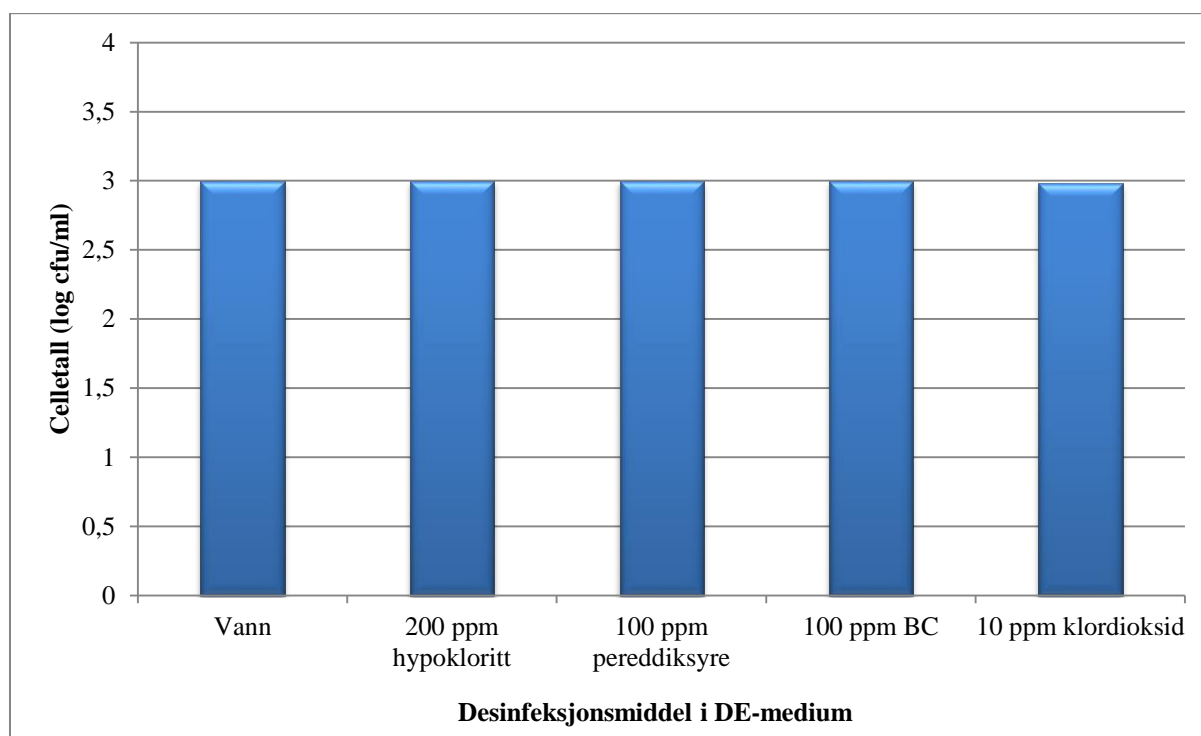


Figur 4.1.1.1 Celletall (log cfu/ml) i bakteriekulturer, inkubert ved 12 °C i 24 og 48 timer. Søylen angir gjennomsnitt av to gjentak for 48 timer og et gjentak for 24 timer. Standardavvik er vist. Rød strek markerer ønsket bakterietall som var 10^9 cfu/ml.

Ut fra dette ble det bestemt å jobbe videre med bakteriekulturer ved 12 °C i 48 timer, da denne temperaturen var mest realistisk i forhold til temperaturer i produksjonslokaler i industrien.

4.1.2 Test av nøytraliseringsmiddelets effekt på desinfeksjonsmidlene

Figur 4.1.2.1 angir at det ikke ble observert reduksjon i cfu/ml i suspensjonene hvor bakteriene ble eksponert for desinfeksjonsmiddel fortynnet i nøytraliseringsmiddel, DE-medium. DE-medium virket derfor nøytraliserende på samtlige av desinfeksjonsmidlene og ble benyttet i videre forsøk.



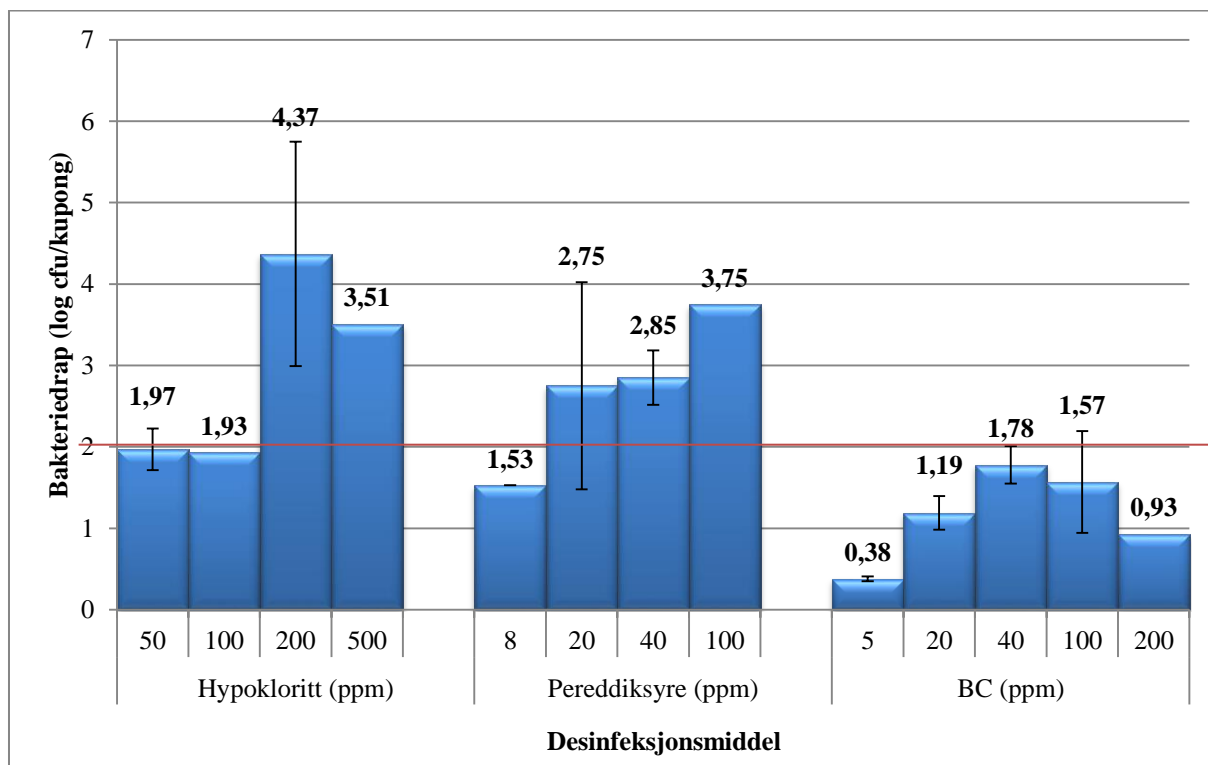
Figur 4.1.2.1 Celltall i log cfu/ml i suspensjonene hvor bakteriene ble utsatt for desinfeksjonsmiddel, eller vann som kontroll, fortynnet i DE-medium. Søylen angir resultat etter et gjentak.

4.1.3 Bestemmelse av egnede konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler

For å kunne kvantifisere effekten av antimikrobielle komponenter som senere skulle benyttes i skyllevann var det nødvendig å finne konsentrasjoner av desinfeksjonsmidlene som ga under to log drap på *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon.

***Listeria monocytogenes* i biofilm**

Figur 4.1.3.1 angir oppnådd log drap ved ulike konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler på *L. monocytogenes* i biofilm.

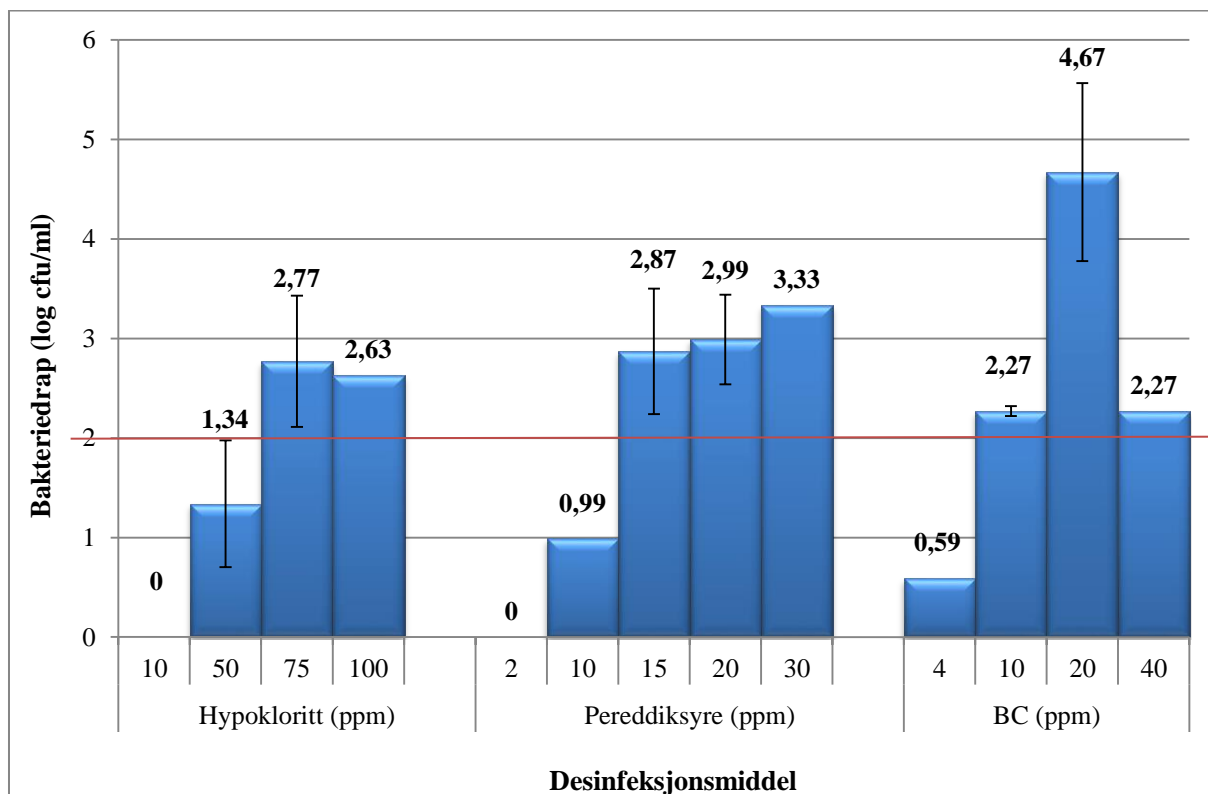


Figur 4.1.3.1 Bakteriedrap i log cfu/kupong ved ulike konsentrasjoner av hypokloritt, pereddiksyre og benzalkoniumklorid (BC). Søylen angir gjennomsnitt av to, tre eller fire gjentak. Standardavvik er angitt. Ved søylene hvor det ikke er fremstilt standardavvik er det kun et gjentak ved den aktuelle konsentrasjonen. Den røde streken markerer øvre grense for ønsket log drap.

Resultatene viste at 50 ppm og 100 ppm hypokloritt samt 8 ppm pereddiksyre førte til et log drap like under to, og variasjonene mellom gjentakene var forholdsvis lite. BC ga mindre drap på *L. monocytogenes* i biofilm, hvor alle konsentrasjonene som ble benyttet ga et log drap under to.

Listeria monocytogenes i suspensjon

Figur 4.1.3.2 angir oppnådd log drap ved ulike konsentrasjoner av desinfeksjonsmiddel på *L. monocytogenes* i suspensjon.

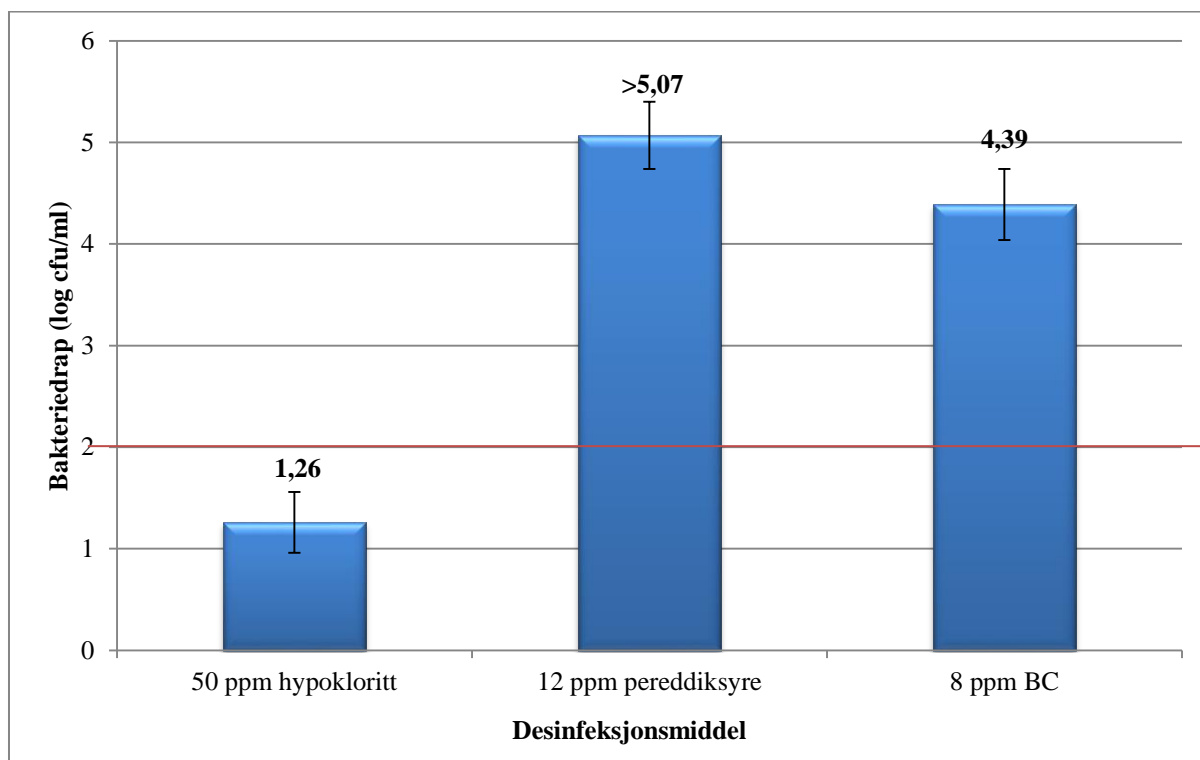


Figur 4.1.3.2 Bakteriedrap i log cfu/ml ved ulike konsentrasjoner av hypokloritt, pereddiksyre og BC. Søylen angir gjennomsnitt av to eller tre gjentak. Standardavvik er angitt. Ved søylene uten standardavvik er det kun et gjentak ved den aktuelle konsentrasjonen. Den røde streken markerer øvre grense for ønsket log drap.

Ut fra resultatene i Figur 4.1.3.2 ble det bestemt at 50 ppm hypokloritt, 12 ppm pereddiksyre og 8 ppm benzalkoniumklorid skulle benyttes for å undersøke om sentrifugeringen hadde noen innvirkning på bakteriedrap.

Betydning av sentrifugering på bakteriedrap

Figur 4.1.3.3 viser oppnådd log drap ved de valgte konsentrasjonene når bakteriesuspensjonen ble utsatt for sentrifugering. Dette ble undersøkt med hensyn til bruk av sentrifugering i hovedforsøkene. Figuren viser at 50 ppm hypokloritt ga passe drap, mens 12 ppm pereddiksyre og 8 ppm BC førte til for stort drap når bakteriecellene ble sentrifugert.



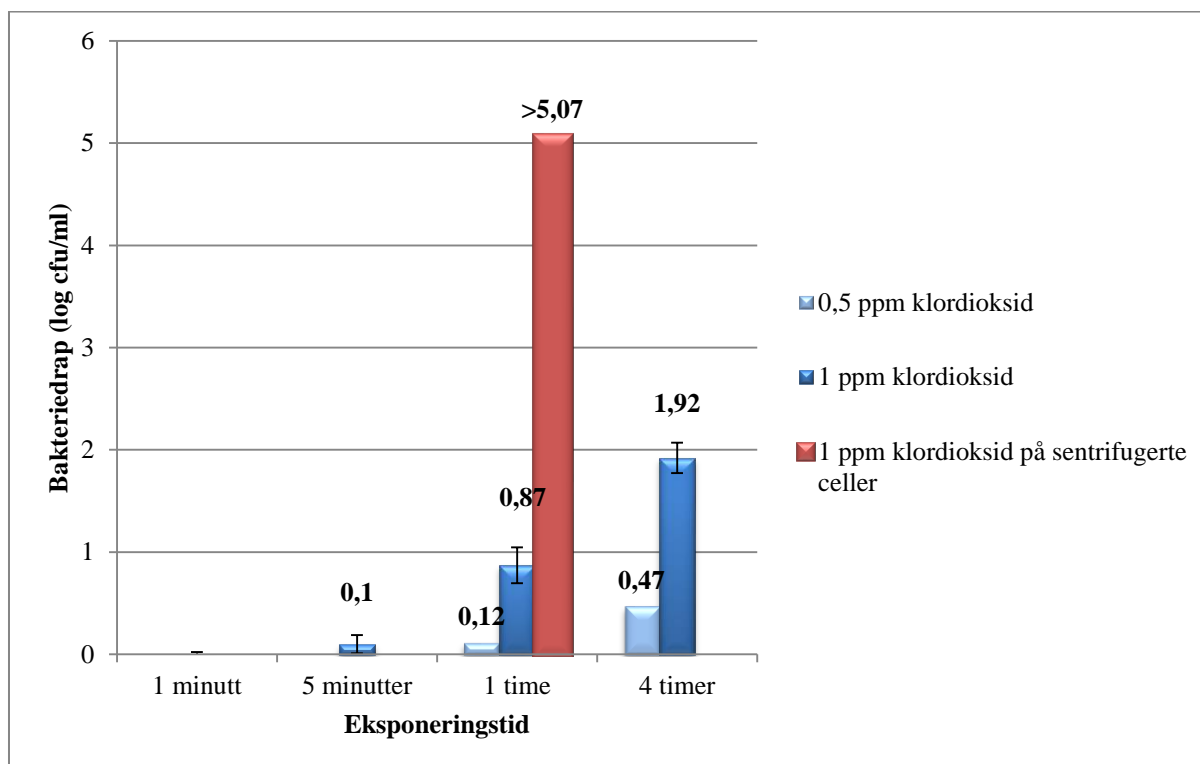
Figur 4.1.3.3 Bakteriedrap i log cfu/ml ved de valgte konsentrasjonene av hypokloritt, pereddiksyre og BC. Søylen angir gjennomsnitt av to gjentak, standardavvik er gitt. Den røde streken markerer øvre grense for ønsket log drap.

Valg av desinfeksjonsmiddelkonsentrasjoner til hovedforsøk

På grunnlag av de foregående forsøkene ble det valgt å benytte de samme konsentrasjonene i desinfeksjonstestene på bakterier i biofilm og i suspensjon med sentrifugering. Konsentrasjonene som ble valgt var 50 ppm hypokloritt, 8 ppm pereddiksyre og 5 ppm BC. Disse konsentrasjonene ble valgt da det ble vurdert at de ville føre til kvantifiserbart drap av bakterier både i biofilm og i suspensjon. Bruk av de samme konsentrasjonene ga også mulighet for felles oppsett.

4.1.4 Effekt av antimikrobielle komponenter i skyllevann på bakterier i suspensjon

Hypokloritt og klordioksid skulle benyttes i lave konsentrasjoner i skyllevann. Drapeseffekten av klordioksid i lave konsentrasjoner ved flere eksponeringstider, på celler som ikke hadde blitt eksponert for desinfeksjon i forkant er vist i Figur 4.1.4.1. Klordioksid ga økende drap som følge av økende konsentrasjoner og eksponeringstid. Eksponering for 0,1 ppm og 0,7 ppm hypokloritt viste ingen drapeseffekt på bakterieceller som ikke hadde vært utsatt for desinfeksjon i forkant og er derfor ikke vist i Figur 4.1.4.1.



Figur 4.1.4.1 Bakteriedrap i log cfu/ml ved ulike konsentrasjoner og eksponeringstider for klordioksid. Søylene for 0,5 ppm klordioksid angir resultatene etter et gjentak og søylene for 1 ppm klordioksid angir gjennomsnittlig resultat etter tre gjentak. Standardavvik er vist. Rød søyle angir bakteriedrap i log cfu/ml av 1 ppm klordioksid på sentrifugerte celler.

Betydning av sentrifugering på bakteriedrap

Drapseeffekten av 0,7 ppm hypokloritt og 1 ppm klordioksid ble testet på bakterieceller som hadde blitt sentrifugert i sterilt vann. Her ble eksponeringstiden satt til 1 time, resultatet er gitt i Figur 4.1.4.1 (angitt med rød søyle). 0,7 ppm hypokloritt hadde ingen drapseeffekt på sentrifugerte bakterieceller og er derfor ikke vist i figuren. Her ble det observert større drapseeffekt av 1 ppm klordioksid på celler som hadde blitt sentrifugert. Det ble bestemt at 0,5 ppm og 1 ppm klordioksid skulle benyttes i skyllevannet i hovedforsøkene. Det ble også bestemt at eksponeringstiden skulle reduseres til 5 og 30 minutter.

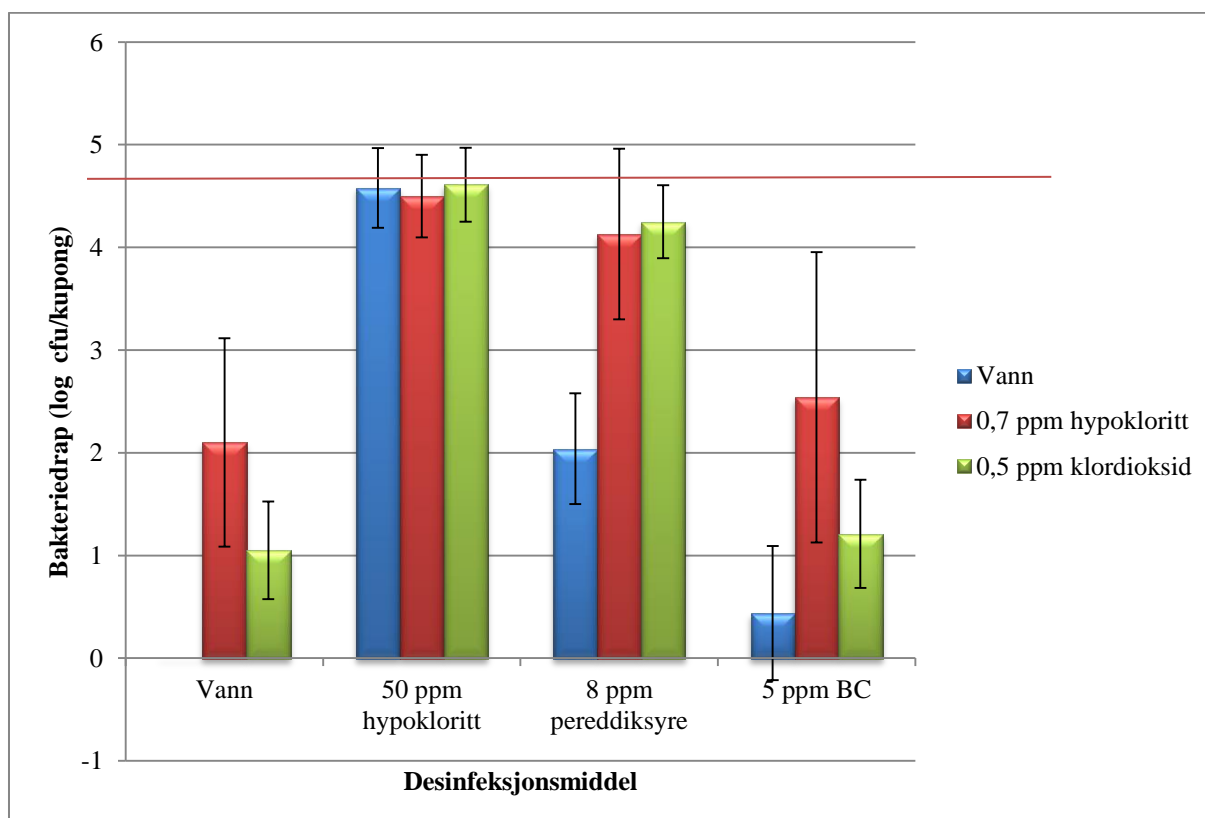
Ut fra resultatene ble det også bestemt at 0,5 ppm klordioksid og 0,7 ppm hypokloritt skulle benyttes i skyllevannet i forsøkene med biofilm.

4.2 Hovedforsøk

Hensikten med hovedforsøkene var å undersøke den bakteriedrepende effekten ved å benytte hypokloritt og klordioksid, i lovlige konsentrasjoner i drikkevann (Mattilsynet 2012), i skyllevannet etter tradisjonell desinfeksjon. Både på *L. monocytogenes* som vokste i biofilm på ståloverflater og i suspensjon. Rådata brukt til utarbeidelse av figurer og tabeller i hovedforsøkene kan ses i vedlegg 3 og statistiske beregninger kan ses i vedlegg 4.

4.2.1 Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i biofilm

Figur 4.2.1.1 angir bakteriedrap i biofilm etter desinfeksjon med hypokloritt, pereddiksyre eller BC etterfulgt av skyllevann uten og med hypokloritt eller klordioksid. Eksponeringstiden var 5 minutter ved begge trinn.



Figur 4.2.1.1 Bakteriedrap i log cfu/kupong etter desinfeksjon med hypokloritt, pereddiksyre og BC etterfulgt av skyllevann med vann, hypokloritt eller klordioksid. Desinfeksjon med vann er kontroll. Søylene angir gjennomsnittlig bakteriedrap etter fem gjentak, hvor det ble benyttet to paralleller innenfor hvert gjentak. Eksponeringstiden var 5 minutter både ved desinfeksjon og skyllevann. De ulike fargene på søylene angir de ulike midlene benyttet i skyllevann. Standardavvik er angitt. Rød strek markerer øvre deteksjonsnivå ved drap.

Tilleggsdrap oppnådd ved å benytte lave konsentrasjoner av antimikrobielle komponenter i skyllevannet, med eksponeringstid på 5 minutter, er spesifisert i Tabell 4.2.1.1.

Tabell 4.2.1.1 Tilleggsdrap som oppnås ved å benytte antimikrobielle komponenter i skyllevann etter desinfeksjon, oppgitt i log cfu/kupong. Eksponeringstiden for skyllevann var 5 minutter.

Skyllevann	Desinfeksjon			
	Vann	50 ppm hypokloritt	8 ppm pereddiksyre	5 ppm BC
0,7 ppm hypokloritt	2,1	-0,08	2,09	2,1
0,5 ppm klordioksid	1,05	0,03	2,21	0,77

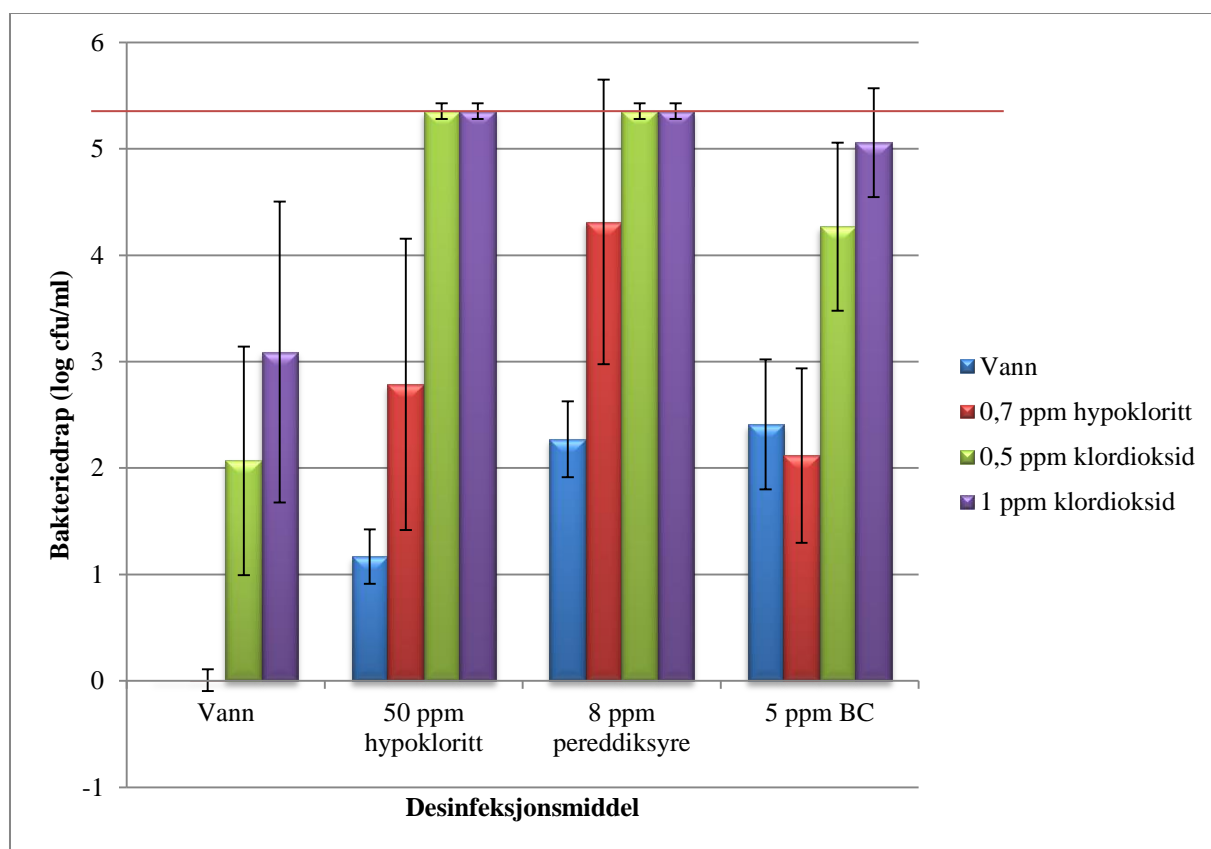
Sammenlignet med å skylle med vann uten tilsats av antimikrobielle komponenter ble det oppnådd et tilleggsdrap på omlag 2 log ved å bruke hypokloritt etter desinfeksjon med pereddiksyre ($p=0,002$) eller BC ($p=0,016$) (Figur 4.2.1.1, Tabell 4.2.1.1). En lignende effekt ble funnet for bruk av klordioksid etter desinfeksjon med pereddiksyre ($p=0,002$). En mindre, men signifikant tilleggseffekt ble også funnet for klordioksid etter desinfeksjon med BC ($p=0,014$). Hypokloritt eller klordioksid i skyllevann ga ikke tilleggsdrap for bakterier eksponert for 50 ppm hypokloritt.

For å undersøke om drapeseffekten av hypokloritt og klordioksid i skyllevannet var uavhengig av forbehandlingen som var enten vann eller de ulike desinfeksjonsmidlene ble Tukeys test (5 % signifikansnivå) benyttet. Drapeseffekten av hypokloritt i skyllevannet var uavhengig av om vann, pereddiksyre eller BC ble benyttet som første desinfeksjonstrinn. Drapeseffekten av hypokloritt i skyllevannet ble signifikant mindre om hypokloritt ble benyttet i første desinfeksjonstrinn, sammenlignet med vann i første trinn. Drapeseffekten ved å benytte klordioksid i skyllevannet var uavhengig av om vann eller BC ble benyttet som første desinfeksjonstrinn, her ga BC som første desinfeksjonstrinn noe mindre drap av klordioksid i skyllevannet, men dette var ikke signifikant. Ble pereddiksyre benyttet som første desinfeksjon ble det oppnådd signifikant større drap av klordioksid i skyllevannet, sammenlignet med vann som første desinfeksjonstrinn. Dette viste at pereddiksyre økte effekten av klordioksid. Hypokloritt som første desinfeksjon ga signifikant mindre drap av klordioksid i skyllevannet, sammenlignet med vann som første desinfeksjonstrinn.

4.2.2 Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i suspensjon

5 minutters eksponeringstid for skyllevann

Figur 4.2.2.1 angir bakteriedrap i suspensjon etter desinfeksjon med hypokloritt, pereddiksyre eller BC etterfulgt av skyllevann uten og med hypokloritt eller klordioksid. Eksponeringstiden var 5 minutter ved begge trinn.



Figur 4.2.2.1 Bakteriedrap i log cfu/ml etter desinfeksjon med hypokloritt, pereddiksyre og BC etterfulgt av skylling med vann, hypokloritt eller klordioksid. Desinfeksjon med vann er kontroll. Søylen viser resultat etter fire gjentak, hvor det ble benyttet to paralleller innenfor hvert gjentak. Eksponeringstiden var 5 minutter både ved desinfeksjon og ved skylling. De ulike fargene på søylene angir de ulike midlene benyttet i skyllevann. Standardavvik er gitt. Rød strek markerer øvre deteksjonsnivå ved drap.

Tilleggsdrap oppnådd ved å benytte lave konsentrasjoner av antimikrobielle komponenter i skyllevannet, med eksponeringstid på 5 minutter, er spesifisert i Tabell 4.2.2.1.

Tabell 4.2.2.1 Tilleggsdrap oppnådd ved å benytte antimikrobielle komponenter i skyllevann etter desinfeksjon, oppgitt i log cfu/ml. Eksponeringstiden var 5 minutter for begge trinn.

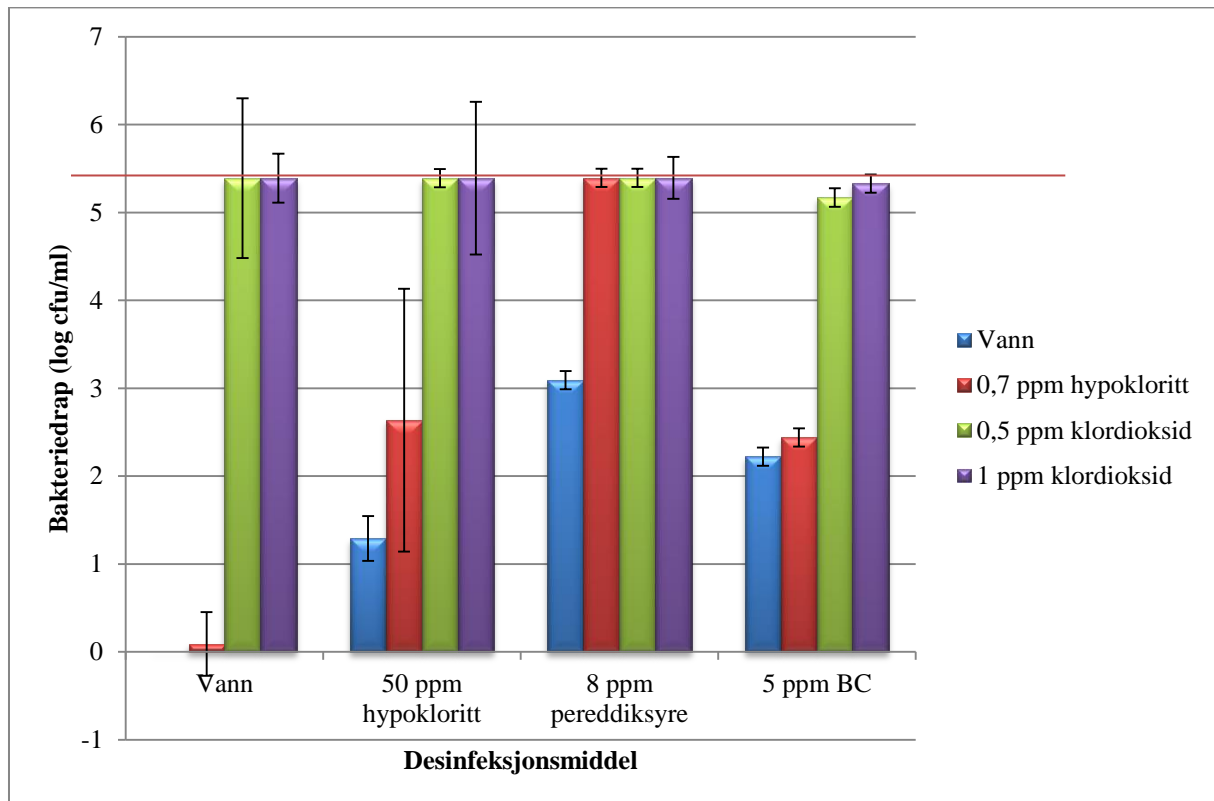
Skyllevann	Desinfeksjon			
	Vann	50 ppm hypokloritt	8 ppm pereddiksyre	5 ppm BC
0,7 ppm hypokloritt	0	1,5	2,04	-0,3
0,5 ppm klordioksid	2,1	>4,2	>3,1	1,9
1 ppm klordioksid	3,1	>4,2	>3,1	2,7

Forsøkene med hypokloritt og pereddiksyre etterfulgt av klordioksid ga drap over deteksjonsgrensen. For å kunne regne statistikk på dette ble det testet om celletall etter hypokloritt/vann (5,48 log cfu/ml) og pereddiksyre/vann (4,38 log cfu/ml) var signifikant høyere enn nedre deteksjonsgrense på 1,3 log cfu/ml. Klordioksid i skyllevannet etter desinfeksjon med hypokloritt førte til et tilleggsdrap på over 4 log ($p=0,000$ og $p=0,000$) (Figur 4.2.2.1, Tabell 4.2.2.1). Lignende effekt ble funnet ved bruk av klordioksid etter desinfeksjon med pereddiksyre, hvor tilleggsdrapet var på over 3 log ($p=0,000$ og $p=0,000$). En mindre, men signifikant tilleggseffekt ble også funnet for 1 ppm klordioksid etter desinfeksjon med BC ($p=0,026$). Hypokloritt i skyllevannet etter desinfeksjon med pereddiksyre ga signifikant større tilleggsdrap ($p=0,05$) enn å skylle med vann. Blant de øvrige kombinasjonene var det ingen signifikante tilleggseffekter.

For å undersøke om drapeseffekten av hypokloritt og klordioksid i skyllevannet var uavhengig av forbehandlingen som var enten vann eller de ulike desinfeksjonsmidlene ble Tukeys test (5 % signifikansnivå) benyttet. Drapeseffekten av hypokloritt i skyllevannet var signifikant større i kombinasjon med pereddiksyre i første desinfeksjonstrinn, sammenlignet med BC. 0,5 ppm klordioksid i skyllevannet etter desinfeksjon med hypokloritt ga signifikant større drap sammenlignet med vann som første desinfeksjonstrinn. Dette viste at hypokloritt som første desinfeksjonstrinn økte effekten av 0,5 ppm klordioksid i skyllevannet. Her kunne den samme tendensen ses ved å benytte pereddiksyre som første desinfeksjonstrinn og 0,5 ppm klordioksid i skyllevannet, men dette var ikke statistisk signifikant. 1 ppm klordioksid i skyllevannet var uavhengig av forhandlingene.

30 minutters eksponeringstid for skyllevann

Ved forlenget eksponeringstid, til 30 minutter, for skyllevannet kunne det samme mønstret i bakteriedrap observeres (Figur 4.2.2.2).



Figur 4.2.2.2. Bakteriedrap i log cfu/ml etter desinfeksjon med hypokloritt, pereddiksyre og BC etterfulgt av skylking med vann, hypokloritt eller klordioksid. Desinfeksjon med vann er kontroll. Søylen viser resultat etter fire gjentak, hvor det ble benyttet to paralleller innenfor hvert gjentak. Eksponeringstiden for desinfeksjon var 5 minutter og skyllevann var 30 minutter. De ulike fargene på søylene angir de ulike midlene benyttet i skyllevann. Standardavvik er gitt. Rød strek markerer øvre deteksjonsnivå ved drap.

Tilleggsdrap oppnådd ved å benytte lave konsentrasjoner av antimikrobielle komponenter i skyllevannet, med eksponeringstid på 30 minutter, er spesifisert i Tabell 4.2.2.2.

Tabell 4.2.2.2 Tilleggsdrap som oppnås ved å benytte antimikrobielle komponenter i skyllevann etter desinfeksjon, oppgitt i log cfu/ml. Eksponeringstiden for desinfeksjon var 5 minutter og skyllevann var 30 minutter.

Skyllevann	Desinfeksjon			
	Vann	50 ppm hypokloritt	8 ppm pereddiksyre	5 ppm BC
0,7 ppm hypokloritt	0,09	1,35	>2,3	0,22
0,5 ppm klordioksid	>5,4	>4,1	>2,3	2,95
1 ppm klordioksid	>5,4	>4,1	>2,3	3,11

Med forlenget eksponeringstid, til 30 minutter, kunne de samme tendensene med hensyn til log drap observeres. Statistiske tester var vanskelig å utføre i og med at mange av resultatene var over deteksjonsgrensen.

5. DISKUSJON

Desinfeksjon er en viktig prosess for å eliminere patogene og kvalitetsforringende bakterier fra produksjonsmiljø. Ved produksjon av produkter som konsumeres uten videre varmebehandling er det spesielt viktig å forhindre kontaminering. Har bakterier som *L. monocytogenes* dannet reservoar i produksjonsmiljøet, er det stor fare for at produkter blir kontaminert under produksjonsprosessen (Beumer 1997; Rørvik 2008).

Carpentier og Cerf (2011) konkluderte i sin oversiktsartikkel med at utforming av lokalet og utstyrets sanitære design har betydning for om *L. monocytogenes* kan festes til overflater og danne reservoar. Hygienisk design og godt vedlikehold av utstyr bør gjøres for å redusere steder hvor *L. monocytogenes* er beskyttet for mekaniske påvirkninger og kjemiske desinfeksjonsmidler. Det har blitt spekulert i om persistens kan ha en sammenheng med toleranse overfor desinfeksjonsmidler. Heir et al. (2004) foretok en undersøkelse som omhandlet persistente stammers toleranse overfor desinfeksjonsmidler basert på QAC, som benzalkoniumklorid. Her ble 84 isolat fra fire forskjellige kjøttproduksjonsmiljøer undersøkt. Det ble konkludert med at det ikke ble funnet korrelasjon mellom toleranse overfor benzalkoniumklorid i hemmende konsentrasjoner og persistensen til stammen. Dette ble påvist selv om desinfeksjonsmiddel basert på QAC daglig ble benyttet i to av de studerte produksjonsmiljøene. Lignende konklusjon ble trukket av Lourenco et al. (2009) som understreker at resistens mot desinfeksjonsmidler ikke alene er en faktor som fører til persistens blant *L. monocytogenes* i meieri. Det kan antas at resistens overfor desinfeksjonsmiddel ikke er den eneste faktoren som fører til persistens, men kan være en medvirkende faktor.

Mulige tiltak for å redusere forekomsten av persistente *L. monocytogenes* i produksjonsmiljø kan være nye desinfeksjonsstrategier. Hensikten med forsøkene i oppgaven var å undersøke ulike desinfeksjonsstrategiers effekt på drap av *L. monocytogenes*, hvilket inkluderte bruk av tradisjonelle desinfeksjonsmidler etterfulgt av hypokloritt og klordioksid i skyllevannet. Metoden ved å benytte antimikrobielle komponenter i skyllevannet var på forhånd lite undersøkt på bakterier i biofilm og i suspensjon, og det var derfor lite forskning å finne på dette området. En lignende metode hvor det blir benyttet desinfeksjonsmidler i flere trinn er sekvensiell desinfeksjon. Sekvensiell desinfeksjon har blitt utført på bakteriesporer og

parasitter i suspensjon, hvor det har ledet til økt drap (Cho et al. 2006; Vasquez-Corona et al. 2002).

5.1 Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i biofilm

Hypokloritt eller klordioksid i skyllevannet etter desinfeksjon med pereddiksyre eller BC ga signifikant økt bakteriedrap, i forhold til å skylle med vann (Figur 4.2.1.1 og Tabell 4.2.1.1). Dette skyldes trolig at bakteriecellene ble skadet ved første desinfeksjon og derfor var mer følsomme overfor antimikrobielle komponenter i skyllevannet. Økt inaktivering ved bruk av flere desinfeksjonstrinn ble også funnet av Cho et al. (2006) som undersøkte sekvensiell inaktivering av *Bacillus subtilis* sporer med ulike desinfeksjonsmidler. Vanskeligheter med å detektere tilleggsdrap/samspillseffekter av hypokloritt og klordioksid i skyllevannet etter desinfeksjon med 50 ppm hypokloritt på bakterier i biofilm er diskutert i kapittel 5.3.

Totalt sett kunne det tydes at lave konsentrasjoner av hypokloritt i skyllevannet var like effektivt eller mer effektivt for drap av bakterier i biofilm, sammenlignet med lave konsentrasjoner av klordioksid. Dette skyldes nødvendigvis ikke at hypokloritt i seg selv hadde større drapeseffekt enn klordioksid, men at hypokloritt muligvis fikk biofilmen til å slippe stålkupongene. Det er derfor usikkert om det var løsning eller drap, men den totale reduksjonen av *L. monocytogenes* ble større, noe som er viktig for industrien. Dette stemmer ikke overens med teorien hvor klordioksid blir fremhevet som det mest effektive mot bakterier i biofilm, hvilket skyldes at klordioksid har høyere oksiderende kapasitet enn andre klorholdige desinfeksjonsmidler (Stanga 2010). Det har blitt antatt at klordioksid virker spesifikt på celler og elektronrike organiske molekyler og er derfor antatt til å være spesielt effektiv mot biofilm (Mayack et al. 1984; Stanga 2010; Tryland et al. 2012).

Skal klordioksid benyttes i skyllevannet er det viktig å være bevisst om at klordioksid muligvis kan stimulere biofilmdannelse ved sub-lethale konsentrasjoner. Dette ble rapportert av Shemesh et al. (2010), som viste at klordioksid med en konsentrasjon på 4 ppm stimulerte dannelsen av biofilm hos *Bacillus subtilis*, men også hos andre bakterier. Her antas det at bakteriene sannsynligvis danner biofilm som en forsvarsmekanisme mot de høye dosene av klordioksid. Dette blir forklart ut fra at klordioksid forårsaker lekkasje av ioner fra cytoplasma ved å ødelegge cellemembranen, hvilket fører til utsendelse av stress-signaler som stimulerer aktiviteten av histidin kinase KinC. KinC induserer oppregulering av genene som er involvert

i dannelsen av biofilm. Biofilmen som dannes skal forhindre at klordioksid når inn til cellemembranen og dermed kan ødelegge denne. I den samme undersøkelsen ble et annet oksidativt desinfeksjonsmiddel, hydrogenperoksid, testet. Dette desinfeksjonsmiddelet førte ikke til den samme stimulering av biofilmdannelse. Dette kan skyldes at klordioksid hovedsakelig virker på cellemembranen, mens hydrogenperoksid virker på mål inne i cellen (Shemesh et al. 2010).

Virkingen av klordioksid på cellemembraner blir understøttet av undersøkelser foretatt av Young og Setlow (2003) som konkluderer med at klordioksid dreper sporer ved å skade membranen. Hypokloritt i sub-lethale konsentrasjoner er også blitt vist til å stimulere biofilmdannelse. Stempel og Overhage (2011) presenterte en undersøkelse som viste at hypokloritt i konsentrasjoner på 2 ppm fritt klor kan stimulere biofilmdannelse hos *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriene dannet her en resistent biofilm som overlevelsesmekanisme mot hypokloritt. Konsentrasjonene som muligvis skulle bli benyttet i skyllevann er lave, og det er ikke funnet undersøkelser som viser at lave konsentrasjoner stimulerer til biofilmdannelse.

Figur 4.2.1.1 viste at ordinær desinfeksjon med 50 ppm hypokloritt og skylling med vann var svært effektivt til fjerning av todagers biofilm, hvor det ble oppnådd nesten fullt drap. Dette er i overensstemmelse med litteraturen hvor det understrekes at oksiderende klorholdige desinfeksjonsmidler, som hypokloritt, er svært effektive til fjerning av biofilm på grunn av struktur-ødeleggende aktivitet (McDonnell 2007; Stanga 2010). Hypokloritt i vaskemidler fremmer rengjøringen ved å påvirke adhesjonskapasiteten til cellene og klorholdige vaskemidler anbefales derfor til fjerning av biofilm før desinfeksjon (Stanga 2010). Rossoni og Gaylarde (2000) fant også i sin undersøkelse at hypokloritt var mer effektivt enn pereddiksyre til inaktivering og fjerning av celler som var festet til en overflate.

I forsøkene foretatt i oppgaven ble det benyttet lavere konsentrasjoner enn normal bruk, årsaken til effektiv inaktivering av bakteriene i biofilm kan skyldes at det var minimalt med organisk materiale tilstede som ville påvirket effekten av hypokloritt. Undersøkelser har vist at effekten av desinfeksjonsmidlene kan bli redusert om overflatene er skitne. Dette fant Aarnisalo et al. (2000) ut i sin undersøkelse hvor effekten av blant annet pereddiksyre, kvartære ammoniumforbindelser og natriumhypokloritt ble evaluert på *L. monocytogenes* i suspensjon og på overflater. I undersøkelsen ble det konkludert med at samtlige desinfeksjonsmidler var effektive om bakteriene befant seg i en suspensjon, med en virketid

på 30 sekunder ved den laveste anbefalte konsentrasjonen. På overflater var desinfeksjonsmidlene effektive om bakterier var på rene overflater, men om overflatene var skitne ble effekten tydelig redusert.

En annen mulig årsak til fult drap med 50 ppm hypokloritt kan være biofilmens modenhet. I følge Lee og Frank (1991) øker biofilmens resistens mot desinfeksjonsmidler med dens modenhet. I deres forsøk ble det funnet at åttedagers biofilm dannet av *L. monocytogenes* var dobbelt så motstandsdyktig mot desinfeksjonsmidler, sammenlignet med firedagers biofilm. Her ble biofilmen utsatt for 200 ppm hypokloritt i 30 sekunder. Det er derfor mulig at bakteriedrapet ville blitt betraktelig mindre om det hadde blitt benyttet biofilm dannet over flere dager, som ofte er tilfelle i industrien.

Angående samspillseffekter viste resultatene at pereddiksyre økte effekten av klordioksid i skyllevannet, hvor det ble avdekket signifikant større drap av klordioksid etter desinfeksjon med pereddiksyre enn ved å benytte vann i desinfeksjonstrinnet (Tabell 4.2.1.1). Samspillseffekten kan være knyttet til at desinfeksjonsmidlene har samme oksiderende virkningsmekanisme, og vil derfor reagere med de samme elementene i celleveggen hos bakteriene. Her er det mulig at pereddiksyre virket oppløsende på biofilmen, ved å degradere biofilmens struktur slik at bakteriecellene satt mindre beskyttet (McDonnell 2007). Dette gjorde det muligvis lettere for klordioksid som ble benyttet i skyllevannet å nå inn til bakteriecellene. Bakterier som har blitt skadet i første desinfeksjonstrinn kan dermed få økt følsomhet overfor midler med samme virkningsmekanisme.

Lignende resultater ble fremstilt av Cho et al. (2006) i en undersøkelse omhandlende samspillseffekter mellom desinfeksjonsmiddel for inaktivering av *Bacillus subtilis* sporer i suspensjon. Her ble det oppdaget størst samspillseffekt mellom oksidative desinfeksjonsmidler, med klor som primær desinfeksjon og klordioksid som sekundær desinfeksjon. I undersøkelsen blir det fremsatt en hypotese om at klor som ordinær desinfeksjon vil reagere med elementer i sporeveggen som klordioksid også ville reagert med. Dette vil gjøre at klordioksid passerer gjennom sporeveggen mer effektivt. Den samme hypotesen blir fremstilt av Vasquez-Corona et al. (2002) som foretok en undersøkelse av sekvensiell inaktivering av *Cryptosporidium parvum* med klordioksid som første desinfeksjonstrinn etterfulgt av fritt klor eller monokloramin.

Ut fra virkningsmekanismene til de oksidative desinfeksjonsmidlene, beskrevet i kapittel 2.6, er det sannsynlig at lignende effekt oppnås i celleveggen hos vegetative bakterieceller. Hadde det blitt benyttet lavere konsentrasjoner av hypokloritt til desinfeksjon av bakterier i biofilm ville muligvis lignende samspillseffekter blitt oppdaget med hypokloritt og klordioksid i skyllevannet. Det høye bakteriedrapet av hypokloritt i desinfeksjonstrinnet gjorde det vanskelig å detektere ytterligere drap og samspillseffekter med de antimikrobielle komponentene i skyllevannet.

Resultatene viste at pereddiksyre ikke hadde samme samspillseffekter med hypokloritt i skyllevannet. Årsaken til dette er usikker, men det kan skyldes at hypokloritt og klordioksid har noe ulike virkningsmekanismer (McDonnell 2007) og dermed ga ulike utfall i kombinasjon med pereddiksyre som desinfeksjon. Her er det nødvendig med flere undersøkelser av virkningsmekanismene til de ulike desinfeksjonsmidlene for å kunne si noe om hvordan samspillet mellom dem fungerer. I senere forsøk kunne eventuelt en hel serie med ulike konsentrasjoner av de antimikrobielle komponentene i skyllevannet blitt benyttet for å undersøke om konsentrasjonene er avgjørende for utfallet (Forsker Langsrud, S., personlig meddelelse 2013).

Annen litteratur motsier hypotesene omkring samspillseffekter mellom desinfeksjonsmidler med samme virkningsmekanisme, ved å presisere at desinfeksjonsmidler med ulike virkningsmekanismer kan føre til synergieffekter i større grad enn desinfeksjonsmidler med lik virkningsmekanisme (Hodges & Hanlon 1991; Russell & Chopra 1996). Dette var ikke tilfelle ved forsøkene i oppgaven hvor det ikke ble avdekket større effekt av de oksidative desinfeksjonsmidlene i skyllevannet når det på forhånd var desinfisert med BC, som er et overflateaktivt desinfeksjonsmiddel, enn vann i desinfeksjonstrinn (Tabell 4.2.1.1). Ut fra teorien (kapittel 2.7.1) kunne antas at BC ville angrepet den cellulære membranen via dens lipider, proteiner og transportsystem, noe som ville gjort det lettere for de oksidative desinfeksjonsmidlene, som ble benyttet i skyllevannet, å angripe cellulære komponenter som nukleinsyrer, proteiner og enzymer (Stanga 2010). Hypokloritt i skyllevannet etter desinfeksjon med BC førte til signifikant større totaldrap på bakterier i biofilm enn å skylle med vann (Tabell 4.2.1.1). Her kunne det da tydes at hypokloritt i skyllevannet virket uavhengig av BC, da drapet av hypokloritt i skyllevannet var like stort som når vann ble benyttet i første trinn. Det ble derfor ikke avdekket noen samspillseffekter.

I industrien er det ofte at *L. monocytogenes* vokser i biofilm sammen med andre bakterier, her er det viktig å være bevisst om at biofilmen da kan ha økt toleranse overfor desinfeksjonsmidler (Pan et al. 2006). Undersøkelser har rapportert om co-aggregering mellom *L. monocytogenes* og *Pseudomonas fragi* på glassoverflater. Hvor *L. monocytogenes* viste signifikant større evne til adhesjon når den vokste sammen med *Pseudomonas fragi* (Sasahara & Zottola 1993). Effekten av klordioksid på mono- og multikulturbiofilm dannet av *Pseudomonas aeruginosa* og *Burkholderia cepacia* ble også undersøkt av Behnke og Camper (2012). Her vokste kulturene både som planktoniske celler, biofilm og klynger av bakterier hentet fra biofilm. I deres forsøk ble det benyttet klordioksidkonsentrasjoner mellom 0,5 og 10 ppm. Undersøkelsen konkluderte med at bakterier som vokste i multikulturbiofilm var mer tolerante overfor desinfeksjonsmidler, enn bakterier som vokste i monokulturbiofilm. Det viste seg at biofilm dannet av multikultur hadde endret viskositet, noe som kunne gjøre biofilmen mer motstandsdyktig og dermed nedsette inntrenging av klordioksid inn i biofilmen (Behnke & Camper 2012). Dette blir understøttet av Burmolle et al. (2006) som også fant at multikulturbiofilm var mer motstandsdyktig mot antimikrobielle komponenter, hvilket sannsynligvis skyldtes synergieffekter mellom bakteriene innad i biofilmen. Ved forsøkene foretatt i oppgaven ble effekten av desinfeksjonsstrategiene testet på monokulturbiofilm, her ville muligvis andre resultater blitt oppnådd om det ble benyttet multikulturbiofilm.

5.2 Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i suspensjon

Kloridioksid i skyllevannet ga signifikant større totaldrap, enn å skylle med vann, i kombinasjon med alle desinfeksjonsmidlene, på bakterier i suspensjon (Figur 4.2.2.1 og Tabell 4.2.2.1). Hypokloritt i skyllevannet ga økt totaldrap i kombinasjon med hypokloritt og signifikant større totaldrap i kombinasjon med pereddiksyre som første desinfeksjonstrinn. Her førte klordioksid i skyllevannet til større totaldrap enn hypokloritt i skyllevannet. Dette kan forklares ut fra litteraturen om at klordioksid er veldig effektivt ved lave konsentrasjoner (Stanga 2010). Det har lenge har vært antatt at klordioksid har høyere antimikrobiell effekt enn andre klorløsninger. Hvor en undersøkelse fra 1979 viste at 5 ppm klordioksid hadde samme effekt som 34 ppm klor, da brukt i kjølevannet i fjærkreindustri (Lillard 1979).

Angående samspillseffekter viste resultatene at hypokloritt og pereddiksyre i første desinfeksjonstrinn økte effekten av 0,5 ppm klordioksid i skyllevannet, sammenlignet med

vann som første desinfeksjonstrinn. Pereddiksyre i første desinfeksjonstrinn økte også effekten av hypokloritt i skyllevannet signifikant, sammenlignet med BC som første desinfeksjonstrinn. Hypokloritt som desinfeksjon økte effekten av hypokloritt i skyllevannet, men dette var ikke signifikant (Figur 4.2.2.1 og Tabell 4.2.2.1). Mulig årsak til samspillseffekt mellom desinfeksjonsmidler med samme virkningsmekanisme er beskrevet i kapittel 5.1. Hvor det utdypes at samspillseffekten mellom to desinfeksjonsmidler bestemmes av det første desinfeksjonsmidlets evne til å endre den fysiske og kjemiske strukturen til celleveggen og dermed fremme transport av det andre desinfeksjonsmidlet inn i bakteriecellen (Cho et al. 2006).

Det ble ikke avdekket signifikante samspillseffekter ved å benytte høyere konsentrasjon av klordioksid (1 ppm) i skyllevannet. Dette kan skyldes at 1 ppm klordioksid i vann ga såpass stort drap alene at det var vanskelig å detektere samspillseffekter i kombinasjon med desinfeksjonsmidler (Tabell 4.2.2.1). Dette var også høyere konsentrasjon enn anbefalt fra leverandøren av klordioksidanlegget, som var mellom 0,1-0,5 ppm (Mattilsynet 2012). Skulle forsøket gjentas kunne det med fordel blitt benyttet lavere konsentrasjoner av klordioksid i skyllevannet på bakterier i suspensjon, da det her muligvis ble benyttet unødvendig høye konsentrasjoner.

I likhet med bakterier i biofilm ble det heller ikke i suspensjon observert signifikante samspillseffekter mellom BC og hypokloritt eller klordioksid i skyllevannet, dette er diskutert i kapittel 5.1.

5.3 Metodene

I oppgaven ble det valgt å teste de ulike desinfeksjonsstrategiene både på *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon. Dette ble gjort på bakgrunn av at desinfeksjon kan ha ulik effekt på bakterier i biofilm og i suspensjon. Det er vanskeligere for desinfeksjonsmidlene å nå inn til cellene som sitter beskyttet i en biofilm, da desinfeksjonsmidlene først må penetrere laget av ekstracellulært materiale før det kan utøve sin effekt på bakteriecellene. Desinfeksjonsmidlene angriper polysakkaridene og proteinene i biofilmen, noe som vil redusere konsentrasjonen av desinfeksjonsmidlene som kan benyttes på bakteriecellene. Organiske og uorganiske komponenter i biofilmen kan også virke direkte nøytraliserende på aktiviteten til desinfeksjonsmidlene. Dette kan blant annet være tilstedeværelse av enzymer som

peroksidase og katalase som kan redusere effekten av desinfeksjonsmidler. Organisk materiale og enzymene kan på den måten inaktivere sterke desinfeksjonsmidler som hypokloritt, QAC og pereddiksyre (McDonnell 2007; Stanga 2010). Her er det viktig å være bevisst om at desinfeksjonsmidler som er effektive mot celler i suspensjon ved laborietester kan være ineffektiv mot celler som sitter beskyttet i en biofilm. Ved praktisk renhold i industrien bør biofilmen først fjernes mekanisk, deretter desinifiseres med kjemiske midler. Dette kan være vanskelig å gjenskape i laborieforsøk, derfor kan ikke resultatene direkte overføres til bakterier som vokser i produksjonsmiljø (Stanga 2010; Sundheim 1999).

Det ble valgt å teste tre desinfeksjonsmidler i første desinfeksjonstrinn på bakgrunn av at biofilm- og suspensjonstester er enkle å utføre, men ofte svært tidkrevende. Det anbefales derfor å utføre desinfeksjonstestene på et fåtall stammer og noen få desinfeksjonsmidler i hver omgang (Buffet-Bataillon et al. 2012). Det ble valgt å danne biofilm på overflater av rustfritt stål av typen AISI 304, hvilket er en overflate som ofte benyttes i industrien. Dette på grunn av at materialet er enkelt å rengjøre og er relativt resistent mot kjemiske angrep som oksiderende desinfeksjonsmidler (Boulangue-Petermann 1996; Rossoni & Gaylarde 2000).

Figur 4.1.3.1 og Figur 4.1.3.2 viste at ved de laveste konsentrasjonene av desinfeksjonsmidlene ble det oppnådd omtrentlig like stort drap på bakterier i biofilm som i suspensjon. Dette var noe uventet på bakgrunn av tidligere studier (kapittel 2.3.2), hvor det var forventet at bakteriecellene var mer følsomme for desinfeksjonsmidler i suspensjon, sammenlignet med i biofilm. En mulig årsak er at cellene i biofilmen ble skadet ved å benytte sonikering for å få biofilmen til å slippe stålkupongene, og at det derfor ble detektert større drap enn det som ble forårsaket av desinfeksjonsmiddelet alene. Dette ble også vurdert i undersøkelse angående resistens mot desinfeksjonsmidler i biofilm dannet av *Listeria*, foretatt av Pan et al. (2006). Her kunne muligvis svabring vært en mer skånsom metode, men her kunne det igjen oppstått større usikkerhet omkring hvorvidt alle cellene ville blitt overført fra biofilmen ved svabring. En annen metode hadde vært votexing med glasskuler, men dette kunne også skadet cellene (Pan et al. 2006).

Figur 4.1.3.1 og Figur 4.2.1.1 viste at det ble oppnådd større drap av 50 ppm hypokloritt når det ble benyttet sterilt vann som skyllevann, sammenlignet med uten skylling på bakterier i biofilm (4,6 log cfu/kupong med skylling og 2 log cfu/kupong uten skylling) Årsaken til dette er usikkert, men i følge Stanga (2010) virker hypokloritt oppløsende på biofilm, hvilket kan være en mulig forklaring ved at hypokloritt førte til at biofilmen løsnet fra kupongen når

kupongen ble overført til skyllevannet som var sterilt vann, og at biofilmen derfor ble liggende igjen i røret med hypokloritt og det ble registrert stort drap. Her burde muligvis bakterietall blitt sjekket i røret med hypokloritt og ikke bare på kupongen, for å undersøke om bakteriene var drept eller om det kun var løsning av biofilm fra kupongene. Hvis forsøket skulle gjentas burde konsentrasjonene av desinfeksjonsmidlene som ga under to log drap bestemmes ut fra drapeseffekten når det benyttes sterilt vann som skyllevann. Dette ville gjort det enklere å detektere eventuelle draps-/samspillseffekter av hypokloritt og klordioksid i skyllevannet. I forsøkene foretatt i oppgaven ble det eksempelvis vanskelig å detektere tilleggsdrap av skyllevannet benyttet etter 50 ppm hypokloritt da 50 ppm hypokloritt/vann ga nesten fullt drap på bakterier i biofilm.

I suspensjonstestene var det nødvendig å fjerne desinfeksjonsmiddel brukt i første desinfeksjonstrinn fra bakteriecellene, før påfølgende bruk av antimikrobielle komponenter i skyllevann. Dette var nødvendig for å kunne måle drapeseffekt av både desinfeksjonstrinnet og de antimikrobielle komponentene i skyllevannet. Til dette formål ble det valgt å benytte sentrifugering. Det viste seg at det ble oppnådd mye større drap både av desinfeksjonsmidlene og de antimikrobielle komponentene som ble benyttet i skyllevannet når cellene ble utsatt for sentrifugering (Figur 4.1.3.3 og Figur 4.1.4.1). Årsakene til dette er usikkert, men mulige teorier er at cellene opplevde sentrifugeringen som stress og dermed var mer følsomme for desinfeksjonsmidler og de antimikrobielle komponentene i skyllevannet. En annen mulig årsak kan være at bakteriecellene ble samlet i bunnen av falconrørene under sentrifugering og at det kunne oppstå anaerobe forhold som gjorde cellene ble mer følsomme (Forsker Heir, E., personlig meddelelse 2013). Dette kan ha ført til større drapeseffekt av desinfeksjonsmidlene og de antimikrobielle komponentene i skyllevannet, enn det ellers ville blitt oppnådd. Cho et al. (2006) og Young og Setlow (2003) brukte sentrifugering i desinfeksjonsforsøk på *Bacillus subtilis* sporer, hvor det ikke ble påpekt at sentrifugeringen hadde noen effekt på drap.

Alternative metoder var å benytte nøytraliseringsmiddel eller filtrering (Sundheim 1999) mellom desinfeksjon og skyllevann. Nøytraliseringsmiddel ble valgt bort på grunn av risikoen for at nøytraliseringsmiddelet ble sittende i celleveggen hos bakteriene og dermed virke nøytraliserende i påfølgende skylletrinn. Bruk av nøytraliserende middel ville også blitt urealistisk i forhold til desinfeksjonsrutiner i industrien. Filtrering ble valgt bort av praktiske årsaker, da denne metoden ville være meget tidkrevende samt at det kunne oppstå usikkerhet om alle bakteriecellene ble med når prøvene ble resuspendert i skyllevannet (Forsker Heir, E., personlig meddelelse 2013, Forsker Langsrud, S., personlig meddelelse 2013).

5.4 Praktisk bruk i matindustrien

Klordioksid benyttes til desinfeksjon av overflater i matindustrien og til desinfeksjon av drikkevann i andre land (McDonnell 2007). Resultatene i oppgaven viste at klordioksid i skyllevannet kunne lede til økt drap av *L. monocytogene* både i biofilm og i suspensjon.

Klordioksid må genereres på stedet om det skal benyttes i skyllevannet etter desinfeksjon i matindustrien. Dette skyldes at klordioksid er ustabil og kan være eksplosivt ved høye konsentrasjoner. Klordioksid kan produseres via et klordioksidanlegg. Dette anlegget monteres ved hovedvanninntaket i bedriften, hvor det produserer klordioksidgass i små doser som tilføres vannsystemet. Dette anlegget dimensjoneres etter vannforbruket for å sikre tilstrekkelig effekt, det er enkelt å montere og krever liten plass. Anskaffelse av anlegget vil kreve en investeringskostnad, men det antas at driften ikke er så dyr. Her vil muligvis investeringskostnadene bli dekket ved at det er tidsbesparende for personellet og energisparende siden det ikke er behov for å bruke varmtvann til sjokkbehandlinger (Norkjemi AS u.å.). Klordioksid i skyllevannet i matindustrien har flere fordeler fremfor hypokloritt, blant annet reduseres effekten ikke i samme grad av organisk materiale, det dannes mindre potensielt kreftfremkallende stoffer i reaksjon med organisk materiale og klordioksid etterlater mindre restsmak i vannet (McDonnell 2007; Stanga 2010).

Ulempene ved klordioksid er at det kan være korrosivt mot metall og plastikk, og det kan bleke fargede overflater (McDonnell 2007). Her antas klordioksid for å være mindre korrosivt enn andre klorholdige desinfeksjonsmidler, som hypokloritt. Korrosiviteten til 100 ppm klordioksid ble testet på overflater av rustfritt stål, hvor overflatene ble utsatt for klordioksid kontinuerlig i 10 dager. Resultatene viste at klordioksid ikke var korrosivt ved denne høye konsentrasjonen (Bohner & Bradley 1991). Det kan antas at klordioksid derfor ikke er særlig korrosivt ved de lave konsentrasjonene som er aktuelle å benytte i skyllevann. Dette burde undersøkes før eventuell installering og daglig bruk av klordioksid i skyllevannet.

Personell som skal behandle kjemikaliene som benyttes for produksjon av klordioksid bør ha opplæring i dette, også med tanke på at klordioksid kan være eksplosivt ved høye konsentrasjoner (Stanga 2010). Behandling av kjemikaliene og produksjon av klordioksid bør inngå i bedriftens HMS-plan.

Hypokloritt har lenge blitt benyttet til tradisjonell desinfeksjon av overflater i matindustrien. Hypokloritt har også blitt benyttet direkte på matvarer for å redusere risikoen for patogener

mikroorganismer som *Salmonella* og *Listeria* (McDonnell 2007). Resultatene i oppgaven viste at hypokloritt i skyllevannet kunne lede til økt drap av *L. monocytogenes*. Fordeler med å benytte hypokloritt i skyllevannet er at det er billig og enkelt å håndtere. Hypokloritt er mer stabilt enn klordioksid og trengs derfor ikke å produseres på stedet. Skulle hypokloritt benyttes i skyllevannet må det doseres direkte i bedriftens vannsystem, hvilket også ville krevd et doseringsanlegg. Til dette bør man ha en lagertank for hypokloritt tilknyttet en doseringspumpe. Dette bør utformes på en slik måte at hypokloritt kan overføres til doseringstanken på en arbeidsmiljømessig tilfredsstillende måte (Folkehelseinstituttet 2008).

En ulempe med hypokloritt er at det kan virke korrosivt på metalloverflater, da hovedsakelig ved høyere konsentrasjoner. Hypokloritt er et kjemikalie som kan føre til hypersensitivitet og personell bør få opplæring i håndtering og sikkerhetstiltak (McDonnell 2007).

6. KONKLUSJON

Resultatene indikerer at klordioksid i skyllevannet kan være effektivt mot *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon hvor det ledet til signifikant større totaldrap i kombinasjon med pereddiksyre og BC. Klordioksid i skyllevannet var også effektivt etter desinfeksjon med hypokloritt mot bakterier i suspensjon.

Hypokloritt i skyllevannet kan også være effektivt mot *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon, hvor det ledet til signifikant større totaldrap i kombinasjon med pereddiksyre samt i kombinasjon med BC på bakterier i biofilm. Hypokloritt i skyllevannet ga også et større totaldrap i kombinasjon med hypokloritt som desinfeksjon på bakterier i suspensjon, men dette var ikke signifikant. Hypokloritt som desinfeksjon var svært effektiv mot biofilm dannet av *L. monocytogenes*, hvilket gjorde det vanskelig å detektere ytterligere drap av de antimikrobielle komponentene i skyllevannet.

Samspillseffekter ble avdekket mellom enkelte av desinfeksjonsmidlene som hadde samme virkningsmekanisme som de antimikrobielle komponentene benyttet i skyllevannet. Hvor pereddiksyre økte drapeseffekten av klordioksid i skyllevannet signifikant både på *L. monocytogenes* i biofilm og i suspensjon. Hypokloritt som desinfeksjon førte til en signifikant større drapeseffekten av klordioksid i skyllevannet på bakterier i suspensjon. Hypokloritt i skyllevannet virket uavhengig av desinfeksjonsmiddel i første trinn på bakterier i biofilm, mens pereddiksyre økte drapeseffekten av hypokloritt i skyllevannet på bakterier i suspensjon.

Sett under ett indikerer dette at hypokloritt og klordioksid i skyllevann etter tradisjonell desinfeksjon kan gi økt drap av *L. monocytogenes* både i biofilm og i suspensjon, hvor kombinasjon av desinfeksjonsmidler med samme virkningsmekanismer viste tendens til å gi størst totaldrap.

7. FORSLAG TIL VIDERE ARBEID

- Bekrefte resultatene fra denne studien ved flere gjentak og muligvis flere/andre *L. monocytogenes* stammer. Standardavvikene indikerte at det var større og mindre variasjoner mellom gjentakene i hovedforsøkene.
- Undersøke om det er levende celler i røret med hypokloritt etter at stålkupongene ble overført til skyllevann. Dette for å undersøke om hypokloritt har drept cellene eller kun løsnet biofilmen slik at det ble detektert større drap.
- Endrede egenskaper til bakterier etter desinfeksjon og skyllevann, undersøke celler med hensyn til lagfase og vekst.
- Fastsette konsentrasjoner av de ulike desinfeksjonsmidlene som gir like stort drap, da ulikt drap her kan ha påvirket effekten av antimikrobielle komponenter i skyllevannet.
- Samme desinfeksjonsstrategier på multikulturbiofilm hvor *L. monocytogenes* inngår, da dette er mer realistisk i forhold til industrien.
- Test av andre metoder, enn sentrifugering, for å kunne utføre desinfeksjon etterfulgt av skyllevann på bakterier i suspensjon. Da sentrifugering påvirket bakteriedrapet.
- Undersøke mulighetene for at resistens kan oppstå når det benyttes desinfeksjonsmidler med samme virkningsmekanisme i desinfeksjon og etterfølgende skyllevann.
- Teste ut de samme desinfeksjonsstrategiene på biofilm dannet på annet materiale som PVC og polyester. Da undersøkelser har vist at effektiviteten til desinfeksjonsmidlene avhenger av materialet som biofilmen er dannet på (Boulangé-Petermann 1996).

8. REFERANSER

- Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G., Autio, T., Lunden, J., Korkeala, H. & Sjøberg, A. M. (2000). Baktericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20: 237-250.
- AISE. (1997). *Benefits and safety aspects of hypochlorite formulated in domestic products*. Association Internationale de la Savonnerie de la Detergence et des Produits d'Entretien (red.). Brussel.
- Behnke, S. & Camper, A. K. (2012). Chlorine dioxide disinfection of single and dual species biofilms, detached biofilm and planktonic cells. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 28 (6): 635-647.
- Best, M., Kennedy, M. E. & Coates, F. (1990). Efficacy of a Variety of Disinfectants against *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (2): 377-380.
- Beumer, R. (1997). *Listeria monocytogenes : detection and behaviour in food and in the environment*. Wageningen: Landbouwniversiteit Wageningen. 198 s.
- Bohner, H. F. & Bradley, R. L. (1991). Corrosivity of Chlorine Dioxide Used as Sanitizer in Ultrafiltration Systems. *Journal of Dairy Science*, 74: 3348-3352.
- Boulangé-Petermann, L. (1996). Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 10 (4): 275-300.
- Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M. & Jolivet-Gougeon, A. (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds-a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39 (5): 381-389.
- Burmolle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sorensen, S. J. & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (6): 3916-3923.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L. & Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 10 (5): 238-+.
- Carpentier, B. & Cerf, O. (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (1): 1-8.
- Cho, M., Kim, J. H. & Yoon, J. (2006). Investigating synergism during sequential inactivation of *Bacillus subtilis* spores with several disinfectants. *Water Research*, 40 (15): 2911-2920.
- Cossart, P. (2010). *The Maverick Bacterium*. The Scientist. Tilgjengelig fra: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/27896/title/The-Maverick-Bacterium/> (lest 08.02.2013).
- Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W. & Scott, V. N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64 (3): 410-429.
- Embarek, B. P. K. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (1): 17-34.

- Farber, J. M. & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, 55 (3): 476-511.
- Folkehelseinstituttet. (2008). *Vannforsyningens ABC*. Tilgjengelig fra: www.fhi.no/dav/e279ad2538.pdf (lest 03.03.2013).
- Folkehelseinstituttet MSIS. *Statistikk-Listeriose*. Tilgjengelig fra: <http://www.msis.no/> (lest 02.04.2013).
- Graves, L. M., Hessel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, H. C., et al. (2010). *Listeria marthii* sp nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1280-1288.
- Heir, E., Lindstedt, B. A., Røtterud, O. J., Vardund, T., Kapperud, G. & Nesbakken, T. (2004). Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 85-96.
- Hodges, N. A. & Hanlon, G. W. (1991). Detection and Measurement of Combined Biocide Action. I: Denyer, S. P. & Hugo, W. B. (red.) *Mechanisms of action of chemical biocides - Their study and exploitation*, s. 297-309. Britain: Blackwell Scientific Publications.
- Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 35 (3): 199-202.
- Hofshagen, M., Heier, B. T. & Hauge, K. (2011). Zoonoserapporten 2011 - Om sykdommer som kan smitte mellom dyr og mennesker. Norges situasjon: Veterinærinstituttet.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th utg. USA: Williams & Wilkins. 756 s.
- Huss, H. H., Jorgensen, L. V. & Vogel, B. F. (2000). Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (3): 267-274.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *Fems Microbiology Letters*, 236 (2): 163-173.
- Jinneman, K. C., Wekell, M. W. & Eklund, M. W. (2007). Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Fish and Seafood. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Listeria, listeriosis and Food Safety*, s. 617-654. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Jorgensen, L. V. & Huss, H. H. (1998). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 42 (1-2): 127-131.
- Lado, B. H. & Yousef, A. E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, s. 158-213. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Lange, H., Heier, B. T., Nygård, K., Vold, L., Wester, A. L. & Kapperud, G. (2011). Årsrapport næringsmiddelbårne infeksjoner og utbrudd i 2011. Oslo: Folkehelseinstituttet. 40 s.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., et al. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2210-2214.

- Lee, S. H. & Frank, J. F. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection*, 54 (1): 4-&.
- Lenntech BVa. (u.å.). *Disinfectants Sodium hypochlorite*. Nederland. Tilgjengelig fra: <http://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-sodium-hypochlorite.htm> (lest 26.04.2013).
- Lenntech BVb. (u.å.). *Disinfectant Peracetic acid*. Nederland. Tilgjengelig fra: <http://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-peracetic-acid.htm> (lest 26.04.2013).
- Lenntech BVc. (u.å.). *Disinfectants Chlorine Dioxide*. Nederland. Tilgjengelig fra: <http://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-chlorine-dioxide.htm> (lest 26.04.2013).
- Lewis, M. G., Swaminathan, B. & Hunter, S. B. (2007). Subtyping *Listeria monocytogenes*. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, s. 283-299. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Lillard, H. S. (1979). Levels of chlorine and chlorine dioxide of equivalent bactericidal effect in poultry-processing water. *Journal of Food Science*, 44 (6): 1594-1597.
- Lilleborg Profesjonell. (2012a). Sikkerhetsdatatavle CLIMAX SU 388.
- Lilleborg Profesjonell. (2012b). Sikkerhetsdatatavle TITAN Hypo.
- Lin, C. M., Takeuchi, K., Zhang, L., Dohm, C. B., Meyer, J. D., Hall, P. A. & Doyle, M. P. (2006). Cross-contamination between processing equipment and deli meats by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (1): 71-79.
- Lourenco, A., Neves, E. & Brito, L. (2009). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. *Food Control*, 20 (6): 585-589.
- Lovdata. (2003). *Forskrift om godkjenning av biocider og biocidprodukter (biocidforskriften)*. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdata.no/for/sf/md/xd-20031218-1848.html#map0> (lest 12.02.2013).
- Lovdata. (2005). *Kommisjonens forordning (EF)Nr. 2073/2005 om mikrobiologiske kriterier for fødevarer*. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdata.no/for/grafikk/32005r2073k-d.pdf> (lest 14.01.2013).
- Lovdata. (2008). *Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften)*. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20081222-1623.html#map032> (lest 14.01.2013).
- Lunden, J., Tolvanen, R. & Korkeala, H. (2008). Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 276-280.
- Mah, T. F. C. & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9 (1): 34-39.
- Mattilsynet. (2012). *Godkjente kjemiske produkter til behandling av drikkevann*. Tilgjengelig fra: http://www.mattilsynet.no/mattilsynet/multimedia/archive/00078/vannbehandlingsprodu_78681a.pdf (lest 12.04.2013).

- Mayack, L. A., Soracco, R. J., Wilde, E. W. & Pope, D. H. (1984). Comparative effectiveness of chlorine and chlorine dioxide biocide regimes for biofouling control. *Water Research*, 18 (5): 593-599.
- McDonnell, G. E. (2007). *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: types, action, and resistance*. Washington DC, USA: ASM Press. 335 s.
- Norges Standardiseringsforbund. (1997). *Kjemiske desinfeksjonsmidler og antiseptika. Kvantitativ suspensjonstest til evaluering av baktericidaktivitet av kjemiske desinfeksjonsmidler til bruk i mat, for industri- og hjemmebruk og i institusjoner. Prøvningsmetode og krav (fase 2, trinn 1)*. NS-EN 1276. Oslo: Pronorm AS. 35 s.
- Norges Standardiseringsforbund. (2001). *Kjemiske desinfeksjonsmidler og antiseptika. Kvantitativ ikke-porøs overflatetest til evaluering av baktericid-aktivitet og/eller fungicidal aktivitet av kjemiske desinfeksjonsmidler til bruk i mat, for industri- og hjemmebruk og i institusjoner. Prøvningsmetode og krav uten mekanisk handling (fase 2/trinn 2)*. NS-EN 13697. Lysaker: Pronorm AS. 29 s.
- Norkjemi AS. (u.å.). *Klordioksid (ClO₂)*. Tilgjengelig fra: <http://www.norkjemi.no/legionella/produkter/klordioksid/> (lest 06.05.2013).
- O'Connor, L., O'Leary, M., Leonard, N., Godinho, M., O'Reilly, C., Coffey, L., Egan, J. & O'Mahony, R. (2010). The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. *Letters in Applied Microbiology*, 51 (5): 490-498.
- Painter, J. & Slutsker, L. (2007). *Listeriosis in Humans*. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, s. 85-109. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Pan, Y., Breidt, F. & Kathariou, S. (2006). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (12): 7711-7717.
- ProMinent. (2013). *Chlorine Dioxide Plants Legio Zon CDLa*. <http://www.prominent.com/Products/Disinfection-Systems-and-Oxidation-Systems/Chlorine-Dioxide-Systems/Chlorine-Dioxide-Plants-Legio-Zon.aspx> (lest 13.04.2013).
- ProMinent ProMaqua. (2008). *Operating Instructions Chlorine dioxide systems Legio Zon Type CDLa*. Germany.
- Rocourt, J. & Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. I: M.P., D., Beuchat, L. R. & Montville, T. J. (red.) *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers*, s. 337-352. Whashington D.C.: ASM Press.
- Rocourt, J. & Buchrieser, C. (2007). The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, s. 1-20. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Rossoni, E. M. M. & Gaylarde, C. C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61 (1): 81-85.
- Russell, A. D. & Chopra, I. (1996). *Understanding Antibacterial Action and Resistance*. 2nd utg. Britain: Ellis Horwood. 292 s.

- Rørvik, L. M. & Yndestad, M. (1991). *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 13 (2): 97-104.
- Rørvik, L. M., Caugant, D. A. & Yndestad, M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 25 (1): 19-27.
- Rørvik, L. M. (2008). *Listeria monocytogenes*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning : næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, s. 224-234. Kristiansand: Høyskoleforlaget.
- Sasahara, K. C. & Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, 56 (12): 1022-1028.
- Sauders, B. D. & Wiedmann, M. (2007). Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. I: Ryser, E. T. & Marth, E. H. (red.) *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, s. 21-54. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Shemesh, M., Kolter, R. & Losick, R. (2010). The Biocide Chlorine Dioxide Stimulates Biofilm Formation in *Bacillus subtilis* by Activation of the Histidine Kinase KinC. *Journal of Bacteriology*, 192 (24): 6352-6356.
- Stanga, M. (2010). *Sanitation - Cleaning av Disinfection in the Food Industry*. Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. 577 s.
- Stempel, N. & Overhage, J. (2011, 6-8 juli). *Sodium hypochlorite stimulates biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa*. Eurofilms 2011, København, Danmark.
- Suess, H. U. (2010). *Pulp Bleaching Today*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co. 309 s.
- Sundheim, G. (1999). *Renhold i næringsmiddelindustrien*. Ås: Matforsk. 104 s.
- Tompkin, R. B., Scott, V. N., Bernard, D. T., Sveum, W. H. & Gombas, K. S. (1999). Guidelines to Prevent Post-Processing Contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 19 (8): 551-562.
- Truong, T. T. T. (2008). *Listeria monocytogenes in fish processing factories*. Master of Science: University of Bergen, Department of Biology. 149 s.
- Tryland, I., Wenneberg, A. C. & Liltved, H. (2012). *Chlorine dioxide as a hygienic barrier*. Oslo: Norwegian Institute for Water Research (NIVA).
- Vaid, R., Linton, R. H. & Morgan, M. T. (2010). Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *Food microbiology*, 27 (8): 979-984.
- Vasquez-Corona, B. C., Rennecker, J. L., Driedger, A. M. & Marinas, B. J. (2002). Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with chlorine dioxide followed by free chlorine or monochloramine. *Water Research*, 36: 178-188.
- Veterinærinstituttet & Nasjonalt folkehelseinstitutt. (2007). Kunnskapsstatus knyttet til mattrygghet og smittespredning — Kjøtt og kjøttprodukter fra storfe, småfe, svin og fjørfe. *Veterinærinstituttets rapportserie*, 13. Oslo: Veterinærinstituttet.

Young, S. B. & Setlow, P. (2003). Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 54-67.

9. VEDLEGG

Vedlegg 1 – Tillaging av medium og løsninger

Vedlegg 2 – Rådata innledende forsøk

Vedlegg 3 – Rådata hovedforsøk

Vedlegg 4 – Statistiske beregninger

VEDLEGG 1: Tillaging av medium og løsninger

Trypton Soya Agar, TSA

32 gram Trypton Soya Agar (OXOID, Hampshire, England) ble løst i 800 ml destillert vann, flaskene ble ristet godt for å unngå at noe pulver satt i bunnen og kunne brenne seg. Flasken med løsningen ble så sterilisert i certoklav (Tisch-Autoclav, GmbH, Østerrike) ved 121 °C i 15 minutter. Etter sterilisering ble flaskene plassert til temperering i vannbad som holdt 50 °C. Heretter ble agaren overført til sterile petriskåler, lokket ble satt på petriskålene etter at agaren stivnet. Skålene ble så pakket i plastposer og lagret ved 4 °C.

Brain Heart Infusion, BHI buljong

29,6 gram Brain Heart Infusion (OXOID) ble løst i 800 ml destillert vann eller 14,8 gram ble løst i 400 ml destillert vann. Flaskene ble ristet godt for å unngå at noe pulver satt i bunnen og kunne brenne seg. Flasken med løsningen ble så sterilisert i certoklav ved 121 °C i 15 minutter. Flaskene ble lagret på benken ved romtemperatur.

Nøytraliserings buljong, Difco D/E, DE-medium

39 gram DE Neutralizing broth (Becton, Dickinson and Company, MD, USA) ble løst i 800 ml destillert vann, flaskene ble ristet godt for å unngå at noe pulver satt i bunnen og kunne brenne seg. Flasken med løsningen ble så sterilisert i certoklav ved 121 °C i 15 minutter. Flaskene med buljong ble lagret ved 4 °C.

Peptonvann

8,5 gram natriumklorid (Merck KGaA, Tyskland) og 1 gram Bacteriological peptone (OXOID) ble løst i 1000 ml destillert vann. Løsningen ble justert til pH 7,2 og autoklavert (Getinge, Instrumentnummer MIK 2001054) ved 121 °C i 20 minutter.

Destillert vann

ELGA Purelab Option (ELGA LabWater, Bucks, UK).

Sterilt vann

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

Hypokloritt 12,5 % (Titan Hypo, Lilleborg Profesjonell, Oslo)

Desinfeksjonsmiddel.

Virkestoff:

- Natriumhypokloritt ~13 %
- Natriumhydroksid < 1 %
- Natriumkarbonat < 1 %

Pereddiksyre 5 % (Climax SU 388, Lilleborg Profesjonell, Oslo)

Desinfeksjonsmiddel.

Virkestoff:

- Eddiksyre 10-25 %
- Hydrogenperoksid 20-30 %
- Pereddiksyre ~5 %

Benzalkoniumklorid (Sigma-Aldrich, Danmark)

Desinfeksjonsmiddel.

Pulverform, tillagingen er beskrevet nedenfor:

5 gram benzalkoniumklorid (Sigma-Aldrich, Danmark) ble løst i 95 gram sterilt vann, denne løsningen hadde en konsentrasjon på 50000 ppm.

Klordioksid (ProMinent ProMaqua, GmbH, Tyskland)

Desinfeksjonsmiddel.

Klordioksidanlegg: Legio Zon[®] Typ CDL5.

Virkestoff:

- Saltsyre < 10 %
- Natriumklorittløsning > 2,5 %

Natriumtiosulfatløsning (Titrisol, Merck, Darmstadt, Tyskland)

Benyttet en titrisol for 1000 ml, som ga en konsentrasjon av natriumtiosulfat på 0,1 mol/l (0,1 N). Ampullen ble plassert over flaskeåpningen og trakten ble fjernet. Trakten ble snudd den andre veien og ble benyttet til å ta hull på membranen, heretter ble den plassert den opprinnelige veien igjen. Ampullen ble holdt på skrå i flaskeåpningen samtidig som det ble overført destillert vann. Flasken ble fylt opp til 1000 ml og ristet for å blande natriumtiosulfatløsningen.

Svovelsyre 95-97 % (Merck, Darmstadt, Tyskland)

196 g svovelsyre ble tilført i 1000 ml vann, hadde da en 2 M løsning.

VEDLEGG 2 – Rådata innledende forsøkCelletall i bakteriekulturer

Celletall i bakteriekulturene ved forskjellige inkuberingstemperaturer.

Temperatur	Stammenummer	Inkuberingstid		
		Gjentak 1		Gjentak 2
		24 timer	48 timer	48 timer
12 °C	MF3860	7,60	9,12	10,32
	MF4077	7,76	9,18	9,35
	MF3939	7,81	9,15	9,18
	MF4712	7,86	9,07	9,30
	MF4627	7,75	8,94	9,30
	MF4562	7,41	9,08	9,00
20 °C	MF3860	9,36	9,34	
	MF4077	9,28	9,26	
	MF3939	8,27	9,32	
	MF4712	9,30	9,22	
	MF4627	9,10	9,30	
	MF4562	9,30	9,25	
30 °C	MF3860	9,37	9,32	
	MF4077	9,35	9,36	
	MF3939	9,34	9,28	
	MF4712	9,49	9,33	
	MF4627	9,38	9,26	
	MF4562	9,38	9,18	

Test av nøytraliseringsmiddelets effekt på desinfeksjonsmidlene

Cfu/ml avlest på skålene som hadde vært inkubert ved 30 °C i 24 ± 2 timer.

Desinfeksjonsmiddel	Cfu/ml
Vann	1,00x10 ³
200 ppm hypokloritt	1,00x10 ³
100 ppm pereddiksyre	1,00x10 ³
100 ppm BC	1,00x10 ³
10 ppm klordioksid	9,60x10 ²

Bestemmelse av egnede konsentrasjoner av desinfeksjonsmidler**Bakterier i biofilm**

Bakterietall (log cfu/kupong) ved ulike konsentrasjoner av hypokloritt, pereddiksyre og BC, eksponeringstid 5 minutter. Vann er regnet gjennomsnitt fra 3 paralleller i hvert gjentak.

Gjentak 1		Gjentak 2	
Desinfeksjon	Log (cfu/kupong)	Desinfeksjon	Log (cfu/kupong)
Vann	7,56	Vann	7,65
100 ppm hypokloritt	5,63	100 ppm hypokloritt	*
200 ppm hypokloritt	4,57	200 ppm hypokloritt	<1,9
500 ppm hypokloritt	4,05	500 ppm hypokloritt	*
20 ppm pereddiksyre	4,68	20 ppm pereddiksyre	7,01
40 ppm pereddiksyre	4,37	40 ppm pereddiksyre	5,13
100 ppm pereddiksyre	3,81	100 ppm pereddiksyre	*
20 ppm BC	6,23	40 ppm BC	6,10
40 ppm BC	5,55	100 ppm BC	6,70
100 ppm BC	5,36	200 ppm BC	6,72

*Forurenset

Her er log cfu/kupong beregnet ut fra gjennomsnitt av 2 paralleller.

Gjentak 1		Gjentak 2	
Desinfeksjon	Log (cfu/kupong)	Desinfeksjon	Log (cfu/kupong)
Vann	7,56	Vann	7,86
50 ppm hypokloritt	5,84	50 ppm hypokloritt	5,63
8 ppm pereddiksyre	6,03	8 ppm pereddiksyre	6,33
20 ppm pereddiksyre	3,91	20 ppm pereddiksyre	4,02
5 ppm BC	7,14	5 ppm BC	7,50
20 ppm BC	6,70	20 ppm BC	6,61

Bakterier i suspensjon

Bakterietall (log cfu/ml) ved ulike konsentrasjoner av hypokloritt, pereddiksyre og BC, eksponeringstid 5 minutter.

Desinfeksjon	Log (cfu/ml)
Vann	7,17
10 ppm hypokloritt	7,25
50 ppm hypokloritt	5,69
100 ppm hypokloritt	4,54
2 ppm pereddiksyre	7,22
10 ppm pereddiksyre	6,18
30 ppm pereddiksyre	3,84
4 ppm BC	6,58
20 ppm BC	3,50
40 ppm BC	4,90

Gjentak 1		Gjentak 2	
Desinfeksjon	Log (cfu/ml)	Desinfeksjon	Log (cfu/ml)
Vann	7,14	Vann	7,10
50 ppm hypokloritt	6,64	50 ppm hypokloritt	5,06
75 ppm hypokloritt	5,03	75 ppm hypokloritt	3,67
15 ppm pereddiksyre	4,90	15 ppm pereddiksyre	3,60
20 ppm pereddiksyre	4,60	20 ppm pereddiksyre	3,66
10 ppm BC	4,92	10 ppm BC	4,78
20 ppm BC	<1,3	20 ppm BC	2,60

Betydning av sentrifugering på bakteriedrap

Bakterietall (log cfu/ml) når bakteriesuspensjonen ble utsatt for sentrifugering med ulike konsentrasjoner av hypokloritt, pereddiksyre og BC, eksponeringstid 5 minutter. Beregnet gjennomsnitt av 2 paralleller.

Gjentak 1		Gjentak 2	
Desinfeksjon	Log (cfu/ml)	Desinfeksjon	Log (cfu/ml)
Vann	6,04	Vann	6,70
50 ppm hypokloritt	5,08	50 ppm hypokloritt	5,14
12 ppm pereddiksyre	<1,3	12 ppm pereddiksyre	<1,3
8 ppm BC	<1,3	8 ppm BC	2,67

Effekt av antimikrobielle komponenter i skyllevann på bakterier i suspensjon

Bakterietall (log cfu/ml) når bakteriesuspensjonen hadde blitt utsatt for lave konsentrasjoner av hypokloritt og klordioksid, ved ulike eksponeringstider.

Eksponeringstid	Log (cfu/ml)			
	1 min	5 min	1 time	4 timer
Desinfeksjon				
Vann	7,15	7,06	7,22	7,50
0,1 ppm hypokloritt	7,12	7,21	7,43	7,53
0,7 ppm hypokloritt	7,25	7,10	7,47	7,60
0,5 ppm klordioksid	7,18	7,12	7,10	7,03
1 ppm klordioksid	7,10	7,00	6,13	5,78

Eksponeringstid	Gjentak 1				Gjentak 2			
	1 min	5 min	1 t	4 t	1 min	5 min	1 t	4 t
Desinfeksjon								
Vann	7,21	7,18	7,15	7,38	7,20	7,36	7,19	7,51
0,7 ppm hypokloritt	7,27	7,30	7,31	7,40	7,19	7,23	7,17	7,37
1 ppm klordioksid	7,16	7,17	6,49	5,30	7,21	7,14	6,33	5,56

Betydning av sentrifugering på bakteriedrap

Bakterietall (log cfu/ml) når bakteriecellene hadde blitt utsatt for sentrifugering før skyllevann. Eksponeringstid 1 time. Beregnet ut fra gjennomsnitt av 2 paralleller.

Gjentak 1		Gjentak 2	
Desinfeksjon	Log (cfu/ml)	Desinfeksjon	Log (cfu/ml)
Vann	6,04	Vann	6,70
0,7 ppm hypokloritt	6,64	0,7 ppm hypokloritt	6,28
1 ppm klordioksid	<1,3	1 ppm klordioksid	<1,3

VEDLEGG 3 – Rådata hovedforsøk

Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i biofilm

Bakterietall (log cfu/kupong) etter desinfeksjon og skylling. Er regnet gjennomsnitt av 2 paralleller. Eksponeringstid er 5 minutter ved begge trinn. Totalt 5 gjentak.

	Log cfu/kupong		
	Skyllvann		
Desinfeksjon	Vann	0,7 ppm hypokloritt	0,5 ppm klordioksid
Vann	7,18	3,94	5,78
Vann	6,45	5,57	5,60
Vann	6,45	5,19	5,11
Vann	6,53	3,18	5,07
Vann	6,19	4,41	5,99
50 ppm hypokloritt	<1,90	<1,90	<1,90
50 ppm hypokloritt	<1,90	2,25	<1,90
50 ppm hypokloritt	2,29	2,20	2,14
50 ppm hypokloritt	1,90	2,05	<1,90
50 ppm hypokloritt	1,90	1,90	<1,90
8 ppm pereddiksyre	4,31	1,90	2,54
8 ppm pereddiksyre	4,17	2,86	2,66
8 ppm pereddiksyre	5,22	3,57	2,14
8 ppm pereddiksyre	4,72	<1,90	1,90
8 ppm pereddiksyre	4,17	<1,90	2,29
5 ppm BC	5,60	1,90	5,47
5 ppm BC	6,15	4,82	5,15
5 ppm BC	5,94	4,90	4,71
5 ppm BC	6,28	4,81	5,56
5 ppm BC	6,63	3,67	5,87

Effekt av kombinert desinfeksjon og skyllevann på bakterier i suspensjon**5 minutt eksponering for skyllevann**

Bakterietall (log cfu/ml) etter desinfeksjon og skylling. Er regnet gjennomsnitt av 2 paralleller. Eksponeringstid var 5 minutter ved begge trinn. Totalt 4 gjentak.

Desinfeksjon	Log cfu/ml			
	Skyllevann			
	Vann	0,7 ppm hypokloritt	0,5 ppm klordioksid	1 ppm klordioksid
Vann	6,77	6,83	3,20	3,16
Vann	6,59	6,71	4,09	1,6
Vann	6,59	6,52	5,87	3,94
Vann	6,66	6,52	5,18	5,55
50 ppm hypokloritt	5,89	*	<1,30	<1,30
50 ppm hypokloritt	5,33	5,25	<1,30	<1,30
50 ppm hypokloritt	5,05	1,99	<1,30	<1,30
50 ppm hypokloritt	5,67	4,36	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	3,94	1,89	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	4,72	4,48	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	4,29	1,54	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	4,58	1,45	<1,30	<1,30
5 ppm BC	4,85	4,76	1,6	<1,30
5 ppm BC	4,60	5,77	1,9	<1,30
5 ppm BC	4,30	3,81	3,54	<1,30
5 ppm BC	3,22	3,80	2,50	2,48

*Hypokloritt-hypokloritt var utelatt

30 minutter eksponering for skyllevann

Bakterietall (log cfu/ml) etter desinfeksjon og skylling. Er regnet gjennomsnitt av 2 paralleller. Eksponeringstid var 5 minutter for desinfeksjon og 30 minutter for skyllevann. Totalt 4 gjentak.

Desinfeksjon	Log cfu/ml Skyllevann			
	Vann	0,7 ppm hypokloritt	0,5 ppm klordioksid	1 ppm klordioksid
Vann	6,87	6,90	<1,30	<1,30
Vann	6,63	6,71	<1,30	<1,30
Vann	6,66	6,13	<1,30	1,30
Vann	6,61	6,67	<1,30	<1,30
50 ppm hypokloritt	6,03	*	<1,30	<1,30
50 ppm hypokloritt	5,32	5,52	1,30	<1,30
50 ppm hypokloritt	4,82	1,92	<1,30	<1,30
50 ppm hypokloritt	5,46	4,12	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	2,24	<1,30	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	4,36	1,30	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	3,96	<1,30	<1,30	<1,30
8 ppm pereddiksyre	3,85	<1,30	<1,30	<1,30
5 ppm BC	*	4,60	2,00	1,30
5 ppm BC	4,47	5,60	1,78	<1,30
5 ppm BC	4,07	3,50	<1,30	<1,30
5 ppm BC	4,69	3,47	<1,30	<1,30

*Prøvene var utelatt

VEDLEGG 4 – Statistiske beregninger

Biofilm

T-test for å undersøke om bruk av hypokloritt eller klordioksid i skyllevannet ga signifikant større totaldrap enn ved å skylle med vann.

One-Sample T: Delta vann v; Delta hypo; Delta vann v; Delta ClO₂

Test of $\mu = 0$ vs not = 0

Variable	P	
Delta vann vs hypo_5 ppm	0.016	BC: Hypokloritt vs vann
Delta vann vs ClO ₂ _5 ppm	0.014	BC: ClO ₂ vs vann
Delta vann vs h_50 ppm h	0.349	Hypokloritt: Hypokloritt vs vann
Delta vann vs C_50 ppm h	0.374	Hypokloritt: ClO ₂ vs vann
Delta vann vs h_8 ppm pe	0.002	Pereddiksyre: Hypokloritt vs vann
Delta vann vs C_8 ppm pe	0.002	Pereddiksyre: ClO ₂ vs vann

Tukeys test for å undersøke om drapeseffekten av hypokloritt eller klordioksid i skyllevannet var uavhengig av forbehandlingen som var vann eller ulike desinfeksjonsmidler.

0,7 ppm hypokloritt i skyllevannet:

One-way ANOVA: log drap 0,7 ppm Hypo versus Desinfeksjon

Source	DF	SS	MS	F	P
Desinfeksjon	3	17.822	5.941	7.82	0.002
Error	16	12.161	0.760		
Total	19	29.982			

S = 0.8718 R-Sq = 59.44% R-Sq(adj) = 51.84%

Grouping Information Using Tukey Method

Desinfeksjon	N	Mean	Grouping
Vann	5	2.1020	A
5 ppm BC	5	2.1000	A
8 ppm pereddiksyre	5	2.0920	A
50 ppm hypokloritt	5	-0.0820	B

Means that do not share a letter are significantly different.

0,5 ppm klordioksid i skyllevannet:**One-way ANOVA: log drap 0.5 ppm klordioksid versus Desinfeksjon**

Source	DF	SS	MS	F	P
Desinfeksjon	3	12.326	4.109	17.52	0.000
Error	16	3.753	0.235		
Total	19	16.080			

S = 0.4843 R-Sq = 76.66% R-Sq(adj) = 72.28%

Grouping Information Using Tukey Method

Desinfeksjon	N	Mean	Grouping
8 ppm pereddiksyre	5	2.2120	A
Vann	5	1.0500	B
5 ppm BC	5	0.7680	B C
50 ppm hypokloritt	5	0.0300	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Suspensjonstest

T-test for å undersøke om bruk av hypokloritt eller klordioksid i skyllevannet ga signifikant større totaldrap enn ved å skylle med vann.

One-Sample T: Delta hypo_5; Delta 0.5 Cl; Delta 1 ClO₂; Delta hypo_5; ...

Test of mu = 0 vs not = 0

Variable	P
Delta vann vs Delta hypo_5 ppm BC	0.483 BC: Hypokloritt vs vann
Delta vann vs Delta 0.5 ClO ₂ _5 ppm BC	0.066 BC: 0,5 ClO vs vann
Delta vann vs Delta 1 ClO ₂ _5 ppm BC	0.026 BC: 1 ClO vs vann
Delta vann vs Delta hypo_50 ppm hypokl	0.228 Hypokloritt: Hypo vs vann
Delta vann vs Delta 0.5 ClO ₂ _50 ppm hy	0.000 Hypokloritt: 0,5 ClO vs vann
Delta vann vs Delta 1 ClO ₂ _50 ppm hypo	0.000 Hypokloritt: 1 ClO vs vann
Delta vann vs Delta hypo_8 ppm pereddi	0.050 Pereddiksyre: Hypo vs vann
Delta vann vs Delta 0.5 ClO ₂ _8 ppm per	0.000 Pereddiksyre: 0,5 ClO vs vann
Delta vann vs Delta 1 ClO ₂ _8 ppm pered	0.000 Pereddiksyre: 1 ClO vs vann

Siden alle testene med 50 ppm hypokloritt og 8 ppm pereddiksyre ga drap over deteksjonsgrensen ble det statistisk testet om celletallet ved å benytte vann som skylking var signifikant høyere enn 1,3 som var deteksjonsgrensen:

One-Sample T: 50 ppm hypo; 8 ppm peredik

Test of mu = 1.3 vs > 1.3

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
50 ppm hypo	4	5.485	0.370	0.185	5.049	22.60	0.000
8 ppm peredik	4	4.383	0.345	0.173	3.976	17.86	0.000

Tukeys test for å undersøke om drapseffekten av hypokloritt eller klordioksid i skyllevannet var uavhengig av forbehandlingen som var vann eller ulike desinfeksjonsmidler.

0,7 ppm hypokloritt i skyllevannet:

One-way ANOVA: Drap 0.7 hypo versus Desinfeksjon

Source	DF	SS	MS	F	P
Desinfeksjon	3	14.84	4.95	4.92	0.021
Error	11	11.07	1.01		
Total	14	25.92			

S = 1.003 R-Sq = 57.28% R-Sq(adj) = 45.63%

Grouping Information Using Tukey Method

Desinfeksjon	N	Mean	Grouping
8 ppm pereddiksyre	4	2.042	A
50 ppm hypokloritt	3	1.483	A B
Vann	4	0.008	A B
5 ppm BC	4	-0.292	B

Means that do not share a letter are significantly different.

0,5 ppm klordioksid i skyllevannet:

One-way ANOVA: Drap 0.5 ClO2 versus Desinfeksjon

Source	DF	SS	MS	F	P
Desinfeksjon	3	13.692	4.564	5.21	0.016
Error	12	10.522	0.877		
Total	15	24.213			

S = 0.9364 R-Sq = 56.55% R-Sq(adj) = 45.68%

Grouping Information Using Tukey Method

Desinfeksjon	N	Mean	Grouping
50 ppm hypokloritt	4	4.1850	A
8 ppm pereddiksyre	4	3.0825	A B
Vann	4	2.0675	B
5 ppm BC	4	1.8575	B

Means that do not share a letter are significantly different.

1 ppm klordioksid i skyllevannet:

One-way ANOVA: Drap 1.0 ppm ClO2 versus Desinfeksjon

Source	DF	SS	MS	F	P
Desinfeksjon	3	5.16	1.72	1.50	0.265
Error	12	13.77	1.15		
Total	15	18.93			

S = 1.071 R-Sq = 27.28% R-Sq(adj) = 9.10%

Grouping Information Using Tukey Method

Desinfeksjon	N	Mean	Grouping
50 ppm hypokloritt	4	4.185	A
Vann	4	3.090	A
8 ppm pereddiksyre	4	3.083	A
5 ppm BC	4	2.648	A

Means that do not share a letter are significantly different.