



Forord

Denne oppgave ble skrevet som en del av mastergraden i matvitenskap, retning matvaretrygghet, kvalitet og hygiene ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Oppgaven ble skrevet i samarbeid med Nofima, avdeling for trygg og holdbar mat.

En stor takk rettes til mine veileder ved Nofima; Forsker Trond Møretro og seniorforsker Solveig Langsrud. Deres veiledning, oppfølging og innspill har vært veldig verdifulle, og settes stor pris på.

Takk til laboratorieleder Tove Maugesten for all praktisk hjelp og veiledning på laboratoriet, samt resten av gjengen på laboratoriet.

Takk til Jon Helge Normann for hjelp med korrekturlesing.

Sammendrag

Det blir brukt mye ressurser på å overvåke renhold i prosessmiljøer for produksjon av lakseprodukter. Samtidig som dette er viktig for å sikre trygg mat med god kvalitet er det for industrien ønskelig å effektivisere overvåkingen. Det er en utfordring med mikrobiologiske prøver at det tar så lang tid å få svar på analysene at det blir vanskelig å bruke slike analyser som grunnlag for korrektive tiltak. Spesielt med tanke på den sykdomsfremkallende bakterien *Listeria monocytogenes* er det viktig å kunne sette inn tiltak før den etablerer seg i produksjonsmiljøet. De siste årene har flere bedrifter tatt i bruk ATP overflatetester som et supplement til mikrobiologiske analyser ved overvåking av renhold. ATP finnes i alle levende celler, og metoden er basert på at enzymet luciferase sender ut lys i nærvær av ATP, slik at lys kan måles med et luminometer som RLU-verdier. Selv om metoden har blitt brukt i flere år, er det behov for kunnskap om hvordan metoden egner seg til bruk i produksjonsmiljøer for laks.

Målet med masteroppgaven var 1) å undersøke om ATP-metoden kan brukes for å detektere smuss, *L. monocytogenes* og forringelsesbakterier som ofte forekommer i prosessområder for laks. 2) Å undersøke hvor robust metoden er mot komponenter som kan være tilstede ved utilstrekkelig renhold. 3) Å undersøke hvordan ulike typer smuss påvirker festing av *Listeria monocytogenes* til overflater. Kunnskap om dette kan gi svar på om ATP-metoden egner seg til bruk i alle deler av prosesslinja, eller om det finnes områder hvor ATP-metoden ikke fungerer optimalt. Dette kan også gi indikasjoner på om ATP-metoden egner seg til å påvise forhold som fremmer festing av *L. monocytogenes* til overflater.

Alle ATP-overvåkningssystemer var godt egnet til å påvise små mengder ATP på overflater og viste høy reproducerbarhet. Systemene var hurtige, og resultatene kunne leses av innen et minutt. Det ble vist at ATP-metoden var mindre sensitiv for smuss av rå muskelfraksjoner og fett enn for blod, med omtrent 3 tifold høyere RLU-utslag for blod. Varmebehandlet smuss med høyt fettinnhold ga omtrent tifold høyere utslag på ATP-metoden enn rått smuss. Det var store forskjeller i ATP-verdier målt i ulike bakteriestammer. ATP-metoden var dårlig egnet til å detektere små mengder *L. monocytogenes*, da mer enn 4 log kde *L. monocytogenes* var nødvendig for å gi RLU-utslag. Resultatene viste at flere forbindelser assosiert med lakseproduksjon, blant annet natriumklorid og røykaroma, hadde negativ innvirkning på ATP-metoden. Natriumklorid hadde reduserende effekt på Cleantrace ved konsentrasjoner helt ned til 0,9 %. Det ble også vist at rå muskelfraksjoner og fettrand fremmer festing av *L. monocytogenes* til overflater av rustfritt stål og polyuretan. Det er en utfordring med metoden

at for noen typer smuss kan vekst av bakterier redusere RLU verdiene, slik at man får en omvendt korrelasjon mellom bakterietall og ATP-verdier.

Resultatene i denne oppgaven tyder på at ATP-metoden vil være mer sensitiv for å detektere smuss i prosessområder for slakting enn senere i prosesslinja, da blod gir høyt utslag på testen. Ellers er det en risiko for at metoden underestimerer smussnivået i røkeprosess og saltingsområder, da natriumklorid og røykaroma hemmer ATP-metoden. Resultatene tyder også på at ATP-metoden ikke er godt egnet til å påvise forhold som fremmer festing av *L. monocytogenes* til overflater.

Basert på funn i denne oppgaven vil det anbefales at ATP-metoden ikke blir brukt som substitutt for mikrobiologiske analyser, men sammen med dem. Det anbefales også at metodens begrensninger blir tatt i betraktning ved bruk.

Abstract

A lot of resources is spent on the surveillance of sanitation in production environments for salmon products. Well knowing this is important for ensuring safe food with good quality, it is desirable for the industry to make surveillance more efficient. The setback with the use of microbial testing is that it takes a long time to get results, making it difficult to take corrective measures based on them. In particular, given the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, it is important to be able to initiate corrective measures before it establishes itself in the production environment. In recent years, an increasing number of companies are using the ATP hygiene monitoring systems as a supplement to microbial analysis. ATP exist in every living cell, and the method is based on the enzyme luciferase releasing light in the presence of ATP so that the light can be measured in a luminometer as relative light units (RLU). Although the method has been in use for several years, knowledge about its suitability in production environments for salmon is needed.

The aim of this master thesis was 1) To investigate whether the ATP method can be used to detect soiling, *L. monocytogenes* and spoilage bacteria common to salmon processing areas. 2) To investigate its robustness to components that might be present in case of insufficient cleaning. 3) To investigate how different kinds of soil influence adherence of *L. monocytogenes* to surfaces. Knowledge about these subjects might be used in deciding whether the method is suitable for all parts of the processing line, or if there are areas that the method is less suitable. It can also give an indication as to if the method is suitable to detect conditions that promotes adherence of *L. monocytogenes* to surfaces.

All ATP monitoring systems were well suited for detection of small amounts of ATP on surfaces and showed high reproducibility. The systems were effective, as the results could be read within a minute. The ATP method was less sensitive to raw soiling of muscle and fat fractions than blood, with approximately 3 tenfold higher RLU readings with blood. Heat treatment of soil with high concentrations of fat led to increased RLU readings of approximately a tenfold. There were large differences in ATP values measured in different bacterial strains. The ATP method was not well suited for detection of small amounts of *L. monocytogenes*, as more than 4 log CFU *L. monocytogenes* was needed to give RLU readings. The results showed that several compounds associated with production of salmon, including sodium chloride and liquid smoke, had a negative impact on the ATP method. Sodium chloride had a reducing effect on Cleantrace at concentrations as low as 0,9 %. Raw muscle and fat fragments led to increased

adherence of *L. monocytogenes* to stainless steel and polyurethane surfaces. It is a challenge that bacteria can reduce RLU values in some types of soil, so that one gets a reverse correlation between bacterial numbers and ATP values.

The results in the thesis suggest that the ATP-method will be more sensitive for detection of soiling surrounding the slaughtering process than later in the processing line, as blood results in high RLU measurements. There is a risk that the method underestimates levels of soiling in areas where salmon is smoked and salted, due the reducing effect sodium chloride and liquid smoke has on measurements. The results also suggest that the method is not well suited in detecting conditions that promotes adherence of *L. monocytogenes* to surfaces.

Innhold

1. Innledning	1
2. Teori	2
2.1. Renhold i lakseindustri	2
2.1.1. Vasking.....	2
2.1.2. Desinfeksjon.....	2
2.2. Hygienisk kontroll i næringsmiddelindustri	3
2.2.1. Visuell overvåkning av renhold	4
2.2.2. Mikrobiologisk overvåkning av renhold	4
2.2.3. Overvåking av renhold basert på ATP	4
2.3. Bakterief flora i lakseindustri.....	5
2.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.3.2. <i>L. monocytogenes</i> i lakseindustri.....	7
2.4. Biofilm.....	8
3. Materialer og metoder	9
3.1. Bakteriestammer	9
3.2. Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer	9
3.3. Medier og løsninger	10
3.4. Vaske- og desinfeksjonsmidler.....	10
3.5. ATP-luminometer og -svabertester	11
3.6. Kuponger til biofilmforsøk	11
3.7. Kalibrering luminometre	11
3.8. Innvirkning av natriumklorid, røykaroma, lakseolje og vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden.....	12
3.8.1. Innvirkning av natriumklorid på ATP-metoden.....	12
3.8.2. Innvirkning av røykaroma og lakseolje på ATP-metoden	12
3.8.3. Innvirkning av vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden	12
3.9. Mengde ATP i bakterier sultet i 2 døgn.	13
3.10. Tilberedning av laksebuljong.....	14
3.11. Innvirkning av bakterier på ATP-innhold i laksebuljong	14
3.12. Forberedelser til biofilmforsøk	15
3.12.1. Tillaging av smussfraksjoner.....	15
3.12.2. Kjemiske analyser av smussfraksjoner.....	15
3.12.3. <i>L. monocytogenes</i> blandingskultur.....	16

3.13.	Utføring av biofilmforsøk	17
3.14.	Statistiske metoder	18
4.	Resultater	19
4.1.	Sammenligning av ATP-luminometre og -svabertester	19
4.2.	Innvirkning av natriumklorid, røykaroma, lakseolje og vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden.....	20
4.2.1.	Innvirkning av natriumklorid på ATP-metoden.....	20
4.2.2.	Innvirkning av røykaroma og lakseolje på ATP-målinger.....	21
4.2.3.	Innvirkning av vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden	22
4.3.	Mengde ATP i bakterier sultet i 2 døgn	24
4.4.	Innvirkning av bakterier på ATP-innhold i laksebuljong.....	26
4.5.	Etablering av <i>Listeria monocytogenes</i> til kuponger av rustfritt stål og polyuretan med rester av smuss fra ørret.....	28
4.6.	ATP-nivå for biofilm med ulike typer smuss	31
5.	Diskusjon	33
5.1.	Kalibrering av ATP-luminometer og -svabertester	33
5.2.	Innvirkning av forbindelser assosiert med lakseproduksjon på ATP overvåkningssystemer.	34
5.3.	ATP i bakterier og smuss.....	36
5.4.	Festing og biofilmdannelse av <i>L. monocytogenes</i> på overflater med ulike typer smuss	38
5.5.	Sammenfattende diskusjon	40
6.	Konklusjon	41
7.	Forslag til videre arbeid	42
8.	Referanser	43

Vedlegg

1. Innledning

Det stilles krav til produsenter av næringsmidler til overvåkning av renhold. Næringsmiddelprodusenter skal kartlegge hvilke farer som kan oppstå etter HACCP og etablere kritiske kontrollpunkter. Hensikten med overvåking av renhold er å kunne sette inn korrigerende tiltak dersom renholdet ikke i tilstrekkelig grad har fjernet bakterier som kan smitte produktet, eller smuss som kan gi grobunn for bakterier.

Overvåkning av renhold på overflater gjøres i dag med visuell inspeksjon, mikrobiologiske analyser eller ATP-metoden. Visuell inspeksjon baserer seg på menneskelige sanser og har derfor noen klare ulemper, spesielt for urenheter som ikke kan ses med det blotte øyet. Mer pålitelige resultater oppnås når en bruker mikrobiologiske analyser. Problemet med mikrobiologiske analyser er at de er tidkrevende og at det ofte tar lang tid før resultatet er klart. For et produkt som laks, som ofte konsumeres ferskt, kan det bety at produktet er i butikkhyllene før et eventuelt prøveresultatet er klart. I nyere tid har flere næringsmiddelbedrifter tatt i bruk bærbare instrumenter for å måle ATP (ATP-metoden). ATP-metoden gjennomføres enkelt ved å stryke en svabertest på overflaten som skal kontrolleres. Resultatet leses av i et luminometer og er klart på omtrent 15 sekunder. Dette gir bedriftene muligheten til å iverksette tiltak nesten umiddelbart etter rengjøring.

Adenosintrifosfat (ATP) er forbindelsen som binder energi i cellene til alle levende organismer. ATP-metoden baserer seg på at det frigjøres lys når luciferin kommer i kontakt med ATP og at mengden lys som blir frigjort sier noe om hvor mye ATP som er på overflaten.

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt ved Nofima ved navn «Forebygging av *Listeria* i produksjonsanlegg for laks». Hovedmålet til prosjektet er å undersøke om kontroll av renhold med ATP-metoden kan benyttes som supplement eller delvis erstatter for *Listeria* og kimtallsanalyser i bedrifter som i utgangspunktet har god hygienisk status. Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF).

Målet med masteroppgaven er 1) Å finne sensitiviteten til ATP-metoden for å detektere smuss, *L. monocytogenes* og forringelsesbakterier som ofte forekommer i prosessområder for laks. 2) Å undersøke hvor robust metoden er mot komponenter som kan være tilstede ved utilstrekkelig renhold. 3) Å undersøke hvordan ulike typer smuss påvirker festing av *Listeria monocytogenes* til overflater. Kunnskap om dette kan gi svar på om ATP-metoden egner seg til bruk i alle deler av prosesslinja, eller om det finnes områder hvor ATP-metoden ikke kan brukes. Det vil også gi indikasjoner på om ATP-metoden egner seg til å påvise forhold som fremmer festing *L. monocytogenes* til overflater.

2. Teori

2.1. Renhold i lakseindustri

En rengjøringsprosess i næringsmiddelindustrien er omfattende og består av flere steg. Prosessen starter vanligvis med skylling med lunket vann. På denne måten bli vil en bli kvitt skitt som lett skylles vekk, som for eksempel blod. Deretter vaskes overflaten med varmt vann og rengjøringsmiddel. Hvor lang tid vaskemidlet skal virke og hvilken temperatur vannet skal ha avhenger av type vaskemiddel og skitt. Vasker man overflater med mye fett, kan det være nødvendig med høy temperatur for å smelte fett. Når vasken er gjennomført skal overflater igjen skylles med lunket vann. For at desinfeksjonsmiddelet skal ha best mulig effekt, er det viktig at overflaten er helt ren. Dersom skylling etter vask ikke er tilstrekkelig, kan rester av desinfeksjonsmidler bli liggende igjen på overflater (Granum 2011; Marriott & Gravani 2006), noe Møretrø et al. (2017) har vist at forekommer.

2.1.1. Vasking

I lokaler hvor fet fisk behandles (f.eks. laks og ørret), vil det være behov for et vaskemiddel som kan fjerne skitt som inneholder fett og proteiner. Hovedsakelig brukes sterkt alkaliske vaskemidler. Disse er godt egnet til å løse opp fett og oljerester i tillegg til denaturerte og komplekse proteiner (Schmidt 2009).

2.1.2. Desinfeksjon

Det finnes en rekke desinfeksjonsmidler som benyttes i næringsmiddelindustrien. I de to påfølgende avsnittene beskrives to grupper desinfeksjonsmidler som ofte benyttes i prosessområder for laks.

Desinfeksjonsmidler med kvartære ammoniumforbindelser

Kvartære ammoniumforbindelser (QAC) er positivt ladde kationer med kovalent bundne alkylgrupper (R-grupper). De virker desinfiserende ved at de tiltrekker seg negativt ladde materialer. Bakteriers proteiner kan være eksempler på slike materialer. Egenskapene til QACene er avhengig av alkylgruppene. Generelt sett kan en si at karbonlengden til alkylgruppene er direkte relatert til deres desinfiserende effekt. QACer er effektive mot bakterier, gjær, mugg og virus, men er ikke veldig effektive mot bakteriofager. De er også generelt mer effektive mot gram positive enn gram-negative bakterier (Schmidt 2009).

QACer er overflateaktive stoffer som blir mindre påvirket av skitt enn andre desinfeksjonsmidler, men ved store mengder skitt vil effekten synke drastisk. De er ikke veldig tolerante mot hardt vann (vann med høyt innhold av kalsium- og magnesiumioner), men toleransen økes ved bruk av EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid). På grunn av at QACer ikke er kompatible med en del vaskemidler, er det viktig med grundig skylling etter vask. Dersom forhåndsregler følges og QACene brukes riktig, er det lav helserisiko knyttet til bruk (Schmidt 2009).

Desinfeksjonsmidler med pereddiksyre

Pereddiksyre inaktiverer gram-positive og gram-negative bakterier, så vel som mugg og gjær. Virkningsmekanismen er ikke godt dokumentert, men en tror at pereddiksyren denaturerer proteiner, forstyrrer permeabiliteten i celleveggen og oksiderer svovelhydrid- og svovelbindinger i proteiner, enzymer og andre metabolitter. Pereddiksyrebaserte desinfeksjonsmidler vil fungere selv om andre organiske materialer er tilstede, men det kan være behov for større doser (Rutala et al. 2008).

2.2. Hygienisk kontroll i næringsmiddelindustri

Det stilles krav til norske næringsmiddelprodusenter om etablering av interkontroll (IK) i samsvar med næringsmiddeloven. Internkontroll er i *Internkontrollforskriften for næringsmidler* (2010) definert som «systematiske tiltak som skal sikre at virksomhetens aktiviteter planlegges, organiseres, utføres og vedlikeholdes i samsvar med krav fastsatt i næringsmiddellovgivingen». Dette innebærer blant annet etablering av renholdsrutiner som skal sikre offentlig helse (Mattilsynet u. år).

Det stilles også krav til næringsmiddelprodusenter om å kartlegge og kontrollere eventuelle farer som kan oppstå. Til dette brukes «hazard analysis of critical control points» (HACCP). HACCP er en fareanalyse som går ut på å identifisere mulige farer og etablere kritiske kontrollpunkter (Mattilsynet u. år). Farene i næringsmiddelindustrien kan være mikrobiologisk, kjemiske, fysiske eller allergener (Marriott & Gravani 2006), og det settes grenseverdier for hvor mye av disse som kan forekomme. De kritiske kontrollpunktene overvåkes slik at korrigerende tiltak kan iverksettes ved overskridelse av grenseverdier (Mattilsynet u. år). Dersom kravene som stilles til industrien skal overholdes er det viktig at ansatte involvert i renhold har kunnskap om matforurensninger (Marriott & Gravani 2006). I dag gjennomføres kontroll av renhold hovedsakelig ved mikrobiologiske analyser, visuell inspeksjon og ATP-metoden.

2.2.1. Visuell overvåkning av renhold

Visuell overvåkning av renhold i næringsmiddelindustrien må innebære mer enn en overfladisk inspeksjon av produksjonslokalene. Det bør lages skjemaer og sjekklister for å sikre at viktige områder bli kontrollert (Marriott & Gravani 2006). Langsrud et al. (2016) har vist at selv om en overflate ser ren ut, kan det være et høyt antall mikroorganismer tilstede. Det kan derfor være nødvendig med mikrobiologisk overvåkning av renhold i tillegg.

2.2.2. Mikrobiologisk overvåkning av renhold

Det finnes flere metoder for å bestemme mengden mikroorganismer på overflater og utstyr i produksjonslokaler. Hvilke metoder en bør benytte avhenger av hvilke mikroorganismer en forsøker å påvise, og hva slags utstyr som skal undersøkes (Marriott & Gravani 2006).

Den mest utbredte metoden for påvisning av mikroorganismer er kimtallsberegninger. Med metoden kan en finne den totale mengden mikroorganismer som er tilstede på utstyret. Prøvetakingen gjennomføres ved at en klut, svaber eller svamp strykes på overflaten eller produksjonsutstyret som skal undersøkes. Kluten blir så fortynnet i fortynningsvann før det påføres et vekstmedie. Vekstmediet er sterilt slik at antall kolonier som vokser opp reflekterer antall mikroorganismer som er fanget opp av kluten. Selv om metoden er tidkrevende og kostbar er den vidt utbredt fordi den er veldig pålitelig (Marriott & Gravani 2006). For påvisning og opptelling av *Listeria monocytogenes* brukes NMKL 136 (NMKL 2010). Metoden består av to steg, hvor steg en er vekst i medie med redusert selektivitet i omtrent 24 timer. Steg to er utplating på selektiv agar.

Prøvetaking med kontaktskåler kan være mer effektivt da det eliminerer behovet for klut, svaber eller svamp. Prøven tas ved å presse en skål med vekstmedie eller fuktet petrifilm direkte på overflaten som skal undersøkes. Kontaktskåler gir ikke muligheten til å fortynne prøven. De passer derfor best dersom man forventer lav forekomst av bakterier (Marriott & Gravani 2006).

2.2.3. Overvåking av renhold basert på ATP

Adenosintrifosfat (ATP) er forbindelsen som binder energi i cellene til alle levende organismer. Om det er energi fra organiske kjemikalier, uorganiske kjemikalier eller lys, kan ingen organismer konservere energi uten ATP (Madigan et al. 2012). Det finnes flere måter å måle ATP i et organisk prøvemateriale, blant annet high performance liquid chromatography (HPLC) (Prévost et al. 1991) og bioluminescens analyse av reaksjon mellom luciferase og luciferin (Davidson et al. 1999; Prévost et al. 1991). I denne oppgaven vil det bli fokusert på sistnevnte

(ATP-metoden) med bærbare instrumenter for å måle ATP (Luminometer). ATP-metoden er en enkel og hurtig metode for å overvåke hygiene etter renhold. I og med at alle organiske celler inneholder ATP, gir systemet en indikasjon på mikrobiologisk så vel som ikke-mikrobiologisk kontaminering (apparatet kan ikke skille mellom disse to) (Bellamy 2012). Metoden baseres på fenomenet bioluminescence.

Bioluminescence er et fenomen som brukes av mange organismer, blant annet sopp, bakterier og insekter, hvor lys produseres som et reaksjonsprodukt på en eksitert tilstand. Enzymene som katalyserer reaksjonene kalles luciferase. Av organismene med bioluminescence-aktivitet er det ildfluen som er mest effektiv til å produsere lys (Milne et al. 2010). Produksjon av lys er en prosess som kan deles inn i 2 steg, hvor det første er reaksjonen mellom luciferin og ATP-Mg²⁺, som danner et uorganisk pyrofosfat, og mellomproduktet luciferyl-adenylate (LH₂-AMP). Luciferin er substratet til luciferase. Det andre steget er oksidasjon og dekarboksylering av LH₂-AMP til oxyluciferin. Det er oxyluciferin-molekylet som frigjør et foton av lys når den går tilbake til grunntilstanden (Marques & Esteves da Silva 2009; Milne et al. 2010).

Et luminometer kan fange opp dette lyset og fremstille det som relative lysenheter (RLU) (Bellamy 2012). RLU er ikke en standardisert måleenhet slik som kilogram eller centimeter. Det er dermed opp til produsentene å sette sin egen verdi for en RLU. Til å samle opp ATP som skal avleses i luminometeret, kan en bruke svabertester fuktet med buffer. Bufferen gjør at kontaminanter fra både tørre og fuktige overflater fester seg til svaberen, og at ATP i cellene som plukkes opp blir frigitt. Lys blir først laget når luciferase påføres svabertesten sekunder før den puttes i luminometeret. Mengden lys som frigjøres skal være proporsjonalt med mengden ATP på svabertesten. Økt mengde ATP vil dermed gi høyere RLU (3M 2015; Hygiena 2013).

2.3. Bakterief flora i lakseindustri

Mesteparten av bakterier vil i levende fisk finnes i tarmen, men det finnes også noe i gjeller og i slimlaget utenpå fisken. Ingen bakterier vil derimot leve i fiskemuskel. Bakterief floraen er ikke veldig avhengig av fiskeart, men heller andre faktorer som temperaturen og renheten til vannet. Siden laks er kaldblodig, vil bakterief floraen i den reflektere temperaturen på vannet den lever i. I nordlige havområder vil temperaturen være lav og dermed domineres av psykrofile og psykrotrofe bakterier. Psykrofile er kuldeelskende bakterier som har optimal vekst fra 12-15 °C og kan ikke vokse over 20 °C, men de kan vokse ved 0 °C. Psykrotrofe bakterier har optimal vekst ved 25-30 °C, men kan også vokse ved høyere temperaturer. Psykrotrofe bakterier kan også vokse ved ned til 0 °C (Adams & Moss 2008).

Forringelse av nedkjølt fisk skyldes primært *Pseudomonas* spp. og *Shewanella putrefaciens* (Adams & Moss 2008). Det er også disse som dominerer når bakterier isoleres fra produksjonsutstyr i lakseindustrien etter renhold og desinfeksjon (Bagge-Ravn et al. 2003; Langsrud et al. 2016; Møretrø et al. 2016). I tillegg til disse forekommer *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Enterobacteriaceae* og *Aeromonas* (Bagge-Ravn et al. 2003; Møretrø et al. 2016). *Pseudomonas* spp. er en av de mest vanlige forringelsesbakteriene i mat. Mye av dette skyldes dens evne til å vokse ved lave temperaturer og kort generasjonstid (Andreani 2017). *Pseudomonas* adherer godt til overflater av rustfritt stål og danner robust biofilm. Den er også dominerende blant bakterier som overlever renhold og desinfeksjon i lakseindustrien. Langsrud et al. (2016) har i laboratorieforsøk vist at *Pseudomonas* spp. dominerer i biofilm med blandingskultur som representerer alle slekter som overlever desinfeksjon på transportbånd. *L. monocytogenes* representerte 0,1-0,01 % av denne biofilmen.

Flere sykdomsfremkallende (patogene) mikroorganismer kan finnes på fisk. *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. og noen typer *Clostridium botulinum* (B, E og F) er eksempler på patogen mikroorganismer som finnes naturlig i akvatiske miljøer og kan havne i fisken derfra (Huss et al. 1995). Andre patogener kan kontaminere produktet via produksjonsmiljøet. *L. monocytogenes* er et eksempel på en slik patogen som er av stor betydning for lakseindustrien (Langsrud et al. 2016).

2.3.1. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes er en gram-positiv kokkoid stavbakterie som tilhører slekten *Listeria* (Marriott & Gravani 2006; Rørvik 2014). Den kan vokse ved temperaturer mellom 0 og 45 °C, men den optimale veksttemperaturen ligger mellom 30 og 37 °C (Marriott & Gravani 2006). Varmebehandling ved 70 °C skal være nok til å inaktivere *L. monocytogenes* (Rørvik 2014). Den påvirkes i liten grad av frysing (Marriott & Gravani 2006; Rørvik 2014). Bakterien er halofil og kan vokse ved saltkonsentrasjoner høyere enn 10 % (Marriott & Gravani 2006). Den vokser ved pH mellom 6 og 9 (Rørvik 2014) og overlever pH mellom 5 og 9,6, avhengig av substrat og temperatur (Marriott & Gravani 2006). *L. monocytogenes* er fakultativt anaerob og mikroaerofil (Marriott & Gravani 2006; Rørvik 2014).

L. monocytogenes er patogen og kan forårsake sykdommen Listeriose hos mennesker. Sykdommen forekommer oftest i personer med nedsatt immunforsvar, gravide, eldre og nyfødte. Listeriose forekommer ikke ofte, men kan ha fatale konsekvenser når den først gjør

det. I Norge har 17 % av registrerte tilfeller av listeriose ført til dødsfall. I Norge har det bare vært to registrerte utbrudd, hvorav ingen kom fra laks (Rørvik 2014).

2.3.2. *L. monocytogenes* i lakseindustri

L. monocytogenes har stor betydning for næringsmiddelindustrien inkludert lakseindustri fordi den kan etablere seg som en husstamme. Husstammer er *L. monocytogenes* som har etablert seg i produksjonsmiljøet over lengre tid (Heir & Langsrud 2013). Disse stammene forblir i produksjonsmiljøet til tross for at *L. monocytogenes* ikke er spesielt resistent mot desinfeksjonsmidler (Rørvik 2014). Foreslåtte årsaker til at stammer overlever vask og desinfeksjon kan i tillegg til resistens mot desinfeksjonsmidler være sterk adhesjon til overflater og dannelse av robust biofilm (Langsrud et al. 2016). *L. monocytogenes* kan adhere til overflater som er mye brukt i næringsmiddelindustrien og danne biofilm (Rørvik 2014), men biofilmen den danner er derimot ikke veldig robust (Ferreira et al. 2014).

L. monocytogenes er ofte isolert fra prosessområder for slakting og røyking i fiskeindustrien. Ved kontaminering av mat er prosesseringsutstyr som oftest kontaminasjonskilden (Hansen et al. 2006). EFSA (2013) har påpekt at kaldrøkt laks er et potensielt høyrisikoprodukt på grunn av utbredelsen av *L. monocytogenes*. Dette til tross for at det med unntak av et utbrudd i Danmark i 2015 har det ikke vært noen utbrudd av listeriose som følge av konsum av laks (Langsrud et al. 2016). I Finland førte derimot konsum av røkt regnbueørret til et utbrudd av listeriose i 1997 hvor 5 personer ble syke. Noen år tidligere var produkter av regnbueørret kilden til et utbrudd som rammet 6 personer i Sverige (Rørvik 2014).

Næringsmiddelhygieneforskriften sier at det som et ledd i prøvetakningsplan må tas prøver fra foredlingsområder og utstyr for å avdekke forekomst av *L. monocytogenes* (Lovdata 2017). For lakseindustrien medfører dette utbredt prøvetaking og dermed en betydelig utgift. Det er også en utfordring at det tar omtrent en uke fra prøvetaking til resultatene er klare. Dette gjør det vanskelig å bruke resultatene til prosesskontroll, samt at produktet ofte vil være konsumert når resultatene er klare.

2.4. Biofilm

Biofilm er definert som et organisert samfunn av bakterier festet til en overflate og beskyttet av et ekstracellulært matrise av polymerer. Biofilm gjør det enklere for mikroorganismer å tilpasse seg tøffe vekstmiljøer (Winkelströter et al. 2014). En biofilm kan bestå av ulike arter som utnytter hverandres egenskaper til å gjøre biofilmstrukturen mest mulig motstandsdyktig mot miljøet (Madigan et al. 2012; Winkelströter et al. 2014).

Biofilmens livssyklus kan beskrives med de fire stegene adhering, dannelse av mikrokolonier, dannelse av tredimensjonal struktur og oppløsning/løsrivelse (Prakash et al. 2003). Den initiale adheringen skjer ved at en celle tilfeldigvis kolliderer med en overflate. Sannsynligheten for at cellen skal lykkes i å feste seg til overflaten er avhengig av cellulære strukturer og overflaten cellen skal festes til. Cellulære strukturer som bidrar til adhesjon er piler, flageller, overflateproteiner og polysakkarider (Madigan et al. 2012; Winkelströter et al. 2014). Når cellene er festet til overflaten starter produksjon av EPS, og det vil etterhvert bli dannet mikrokolonier og etterhvert tredimensjonale strukturer. Mengden, sammensetningen og egenskapene til EPS kan variere fra mellom arter og stammer (Winkelströter et al. 2014).

Den mest brukte kontaktmaterialet i næringsmiddelindustrien er rustfritt stål (type 304). Når utstyr av rustfritt stål brukes mye vil det etter hvert dannes sprekker og riper i overflaten. Når biofilm dannes i slike sprekker og riper vil den være ekstra godt beskyttet mot mekaniske rengjøring og desinfeksjonsmidler. Mye av maskinene og utstyret som brukes i næringsmiddelindustrien har deler som er vanskelige å nå ved rengjøring, for eksempel avløp og transportbånd. Proteinmolekyler kan feste seg til overflaten av utstyr og danne en «conditioning film». Dette skaper en nisje hvor mikroorganismer kan vokse hurtig samtidig som de er beskyttet mot vaske- og desinfeksjonsmidler (Winkelströter et al. 2014).

3. Materialer og metoder

3.1. Bakteriestammer

Alle stammer benyttet i dette forsøket tilhører Nofimas stammesamling. Alle utvalgte stammer er isolert fra fiskeindustrien. Tabell 3-1 viser oversikt over bakterier og deres opphav.

Tabell 3-1: Oversikt over bakteriestammer benyttet i oppgaven.

Nofima stammenummer	Bakterieslekt/art	Opphav	Kilde
MF05869	<i>Aeromonas</i> sp.	Sløyemaskin prismer	(Møretro et al. 2016)
MF05944	<i>Aeromonas</i> sp.	Plastflipp/transportør	(Møretro et al. 2016)
MF05861	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Sløyemaskin prismer	(Møretro et al. 2016)
MF05903	<i>Shewanella</i> sp.	Vektband	(Møretro et al. 2016)
MF05534	<i>Acinetobacter</i> sp.	Bånd skinnemaskin	(Møretro et al. 2016)
MF04122	<i>Acinetobacter</i> sp.	Transportband	(Langsrud et al. 2016)
MF 04099	<i>Serratia</i> sp.	Baader, kniv	(Langsrud et al. 2016)
MF03971	<i>Serratia liquefaciens</i>	Transportband	(Langsrud et al. 2016)
MF05860	<i>Pseudomonas</i> sp.	Transportør	(Møretro et al. 2016)
MF05905	<i>Pseudomonas</i> sp.	Transportør	(Møretro et al. 2016)
MF5259	<i>L. monocytogenes</i>	Transportband	(Møretro et al. 2017)
MF3949	<i>L. monocytogenes</i>	Sluk	(Møretro et al. 2017)
MF3858	<i>L. monocytogenes</i>	Sluk	(Møretro et al. 2017)
MF3939	<i>L. monocytogenes</i>	Transportband	(Langsrud et al. 2016)
MF3860	<i>L. monocytogenes</i>	Transportband	(Møretro et al. 2017)
MF3940	<i>L. innocua</i>	Transportband	(Langsrud et al. 2016)

3.2. Oppbevaring og dyrking av bakteriestammer

Før forsøkene startet ble alle bakteriestammer oppbevart i eppendorfrør med vekstmedium og 20 % glyserol ved - 80 °C. Før bruk ble stammene strøket ut på Brain Heart Infusion agar (BHI) og inkubert ved 30 °C i 1-2 døgn. Stammene ble oppbevart i kjølerom (4 °C) og strøket om innen 30 dager.

3.3. Medier og løsninger

Alle medier ble sterilisert ved autoklaving i 15 min ved 121 °C. Agarskåler og buljong ble oppbevart ved 4 °C. Løsninger ble oppbevart i romtemperatur eller etter anvisning fra produsenten. Tabell 3-2 viser alle medier og løsninger benyttet i oppgaven.

Tabell 3-2: Oversikt over medier og løsninger benyttet i oppgaven.

Medier	Løsninger
Brain Heart Infusion Agar (BHI, Oxoid ltd. Hampshire, England)	0,9 % NaCl
Iron Agar (Lyngby) (Jernagar, Oxoid, ltd. Hampshire, England) + 4 % L-cystein hydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	24 % NaCl-løsning
Rapid <i>L.mono</i> Agar Plates, (RLM, Bio Rad California, USA)	rATP 10 mM (Promega, Biotech AB, Wisconsin, USA)
Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid ltd. Hampshire, England)	Røykaroma (Smokez Enviro 24PA, Red Arrow International, Manitowoc, Wisconsin, USA)
Laksebuljong*	H-oil (Lakseolje, Hordafor DK, Støvring, Danmark)

*tilberedt etter Løype (2012) og beskrevet i kap. 3.10.

3.4. Vaske- og desinfeksjonsmidler

Vaske- og desinfeksjonsmidler ble oppbevart i romtemperatur. Tabell 3-3 viser vaske- og desinfeksjonsmidler benyttet i denne oppgaven.

Tabell 3-3: Oversikt over vaske- og desinfeksjonsmidler benyttet i denne oppgaven med kjemiske ingredienser.

Produkt	Kjemiske ingredienser	Produsent
ISS Alkalifoam 27	Natriumhypokloritt 2,5-5 %; Natriumhydroksid 2-5 %; Alkylaminoksider 1-5 %	ECOLAB AS, Oslo, Norge
Diverfoam Active	Hydrogenperoksid 10-20 %; Eddiksyre 3-10 %; Alkyldimetylaminoksid 3-10 %; Pereddiksyre 1-3 %	Lilleborg AS, Oslo, Norge
ACO Hygiene DES QA	Kvartære ammoniumforbindelser 5-15 %; Alkohol C13-C15 pol (1-6) etoksilet 5-15 %	ACO kjemi AS, Lillehammer, Norge

3.5. ATP-luminometer og -svabertester

Alle svabertester ble oppbevart ved 4 °C og temperert i romtemperatur 30-40 minutter før bruk. Luminometre ble oppbevart ved romtemperatur. Tabell 3-4 viser en oversikt over luminometre og svabertester benyttet i denne oppgaven.

Tabell 3-4: Oversikt over ATP-luminometre og -svabertester benyttet i oppgaven

ATP-luminometer	ATP-svabertester
Clean-Trace™ NG Luminometer UNG3 (Cleantrace luminometer)	Clean-Trace™ Surface ATP – UXL100 (Cleantrace)
	US2020 UltraSnap™ ATP Surface Test (Ultrasnap)
SystemSURE Plus™ (Hygiena luminometer)	SUS3000 SuperSnap™ High Sensitivity ATP Surface Test (Supersnap)

Cleantrace luminometer og svabertester er fra 3M company, Hammerfelddamm, Tyskland. Hygiena luminometer og Ultra- og Supersnap svabertester er fra Hygiena, Camarillo California, U.S.A.

3.6. Kuponger til biofilmforsøk

Kuponger benyttet til biofilmforsøk var av rustfritt stål (AISI 304, 2B, Norsk Stål AS, Nesbru, Norge) og Polyuretan (E 8/2 U0/V5 MT, Forbo movement systems, Hannover, Tyskland) og var 400 mm² (20x20 mm). Alle kuponger ble vasket med zalo og vann før bruk. Kuponger av rustfritt stål ble sterilisert ved autoklaving ved 121 °C i 15 minutter i. Kuponger av polyuretan ble sterilisert med 70 % etanol (Technisol, VWR int., Fontenay sous Bois, Frankrike) i sterilbenk. For å unngå kontaminering og fett fra fingre, ble det brukt sterilt pinsett til å løfte/flytte på kuponger.

3.7. Kalibrering luminometre

For å undersøke om det var lineær sammenheng mellom ATP og målt RLU ble det laget løsninger med ulike mengder ATP i dH₂O. Det ble laget 6 løsninger med ATP-konsentrasjon fra 10⁻⁹ til 10⁻⁴ M ATP. For å undersøke bakgrunnsstøy ble det gjort målinger med dH₂O uten ATP. 10 µl ATP-løsning ble pipettert direkte på svabertester (10⁻¹⁴-10⁻⁹ mol ATP tilsatt) og avlest i luminometer etter henvisning fra produsenten. .

3.8. Innvirkning av natriumklorid, røykaroma, lakseolje og vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden

3.8.1. Innvirkning av natriumklorid på ATP-metoden.

Mange ATP-målinger i områder av prosesseringsanlegg hvor fisk saltet, har gitt lave utslag av RLU (Solveig Langsrud, personlig kommunikasjon). Det kan tenkes at de lave målingene skyldes at NaCl påvirker testene slik at resultatet holdes kunstig lavt.

Det ble laget 6 løsninger med omtrent 10^{-7} M ATP, men med ulik konsentrasjon av NaCl, henholdsvis 0,9 (fysiologisk saltvann), 4,5, 9, 13,5, 18 og 21,6 % NaCl. For å undersøke om NaCl-løsninger i seg selv ga RLU-utslag, ble det laget 0,9 og 21,6 % NaCl-løsninger uten ATP. Fra hver løsning ble 10 μ l pipetert direkte på svabertesten (10^{-12} mol ATP tilsatt) og lest av med luminometer.

3.8.2. Innvirkning av røykaroma og lakseolje på ATP-metoden

I prosessområder i lakseindustrien kan lakseolje og komponenter fra røyk ligge igjen på overflater. For å undersøke om disse ga utslag på ATP-metoden ble 10 μ l lakseolje og røykaroma pipetert direkte på hver sin svabertest og avlest med luminometer.

For å undersøke om disse hadde negativ innvirkning på ATP-metoden ble det laget løsninger med 10^{-7} M ATP. Umiddelbart før avlesning ble 10 μ l lakseolje og røykaroma pipetert i hvert sitt 1,5 ml mikrorør (Microtube Superspin, VWR, Hannover Tyskland) og tilsatt 10 μ l 10^{-7} M ATP. Hele løsningen (20 μ l) ble pipetert direkte på svabertesten og avlest med luminometer. Som referanse ble 10 μ l ATP-løsning blandet med 10 μ l dH₂O og avlest i luminometer.

3.8.3. Innvirkning av vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden

Dersom skylling etter vask og desinfeksjon ikke har vært tilstrekkelig, kan rester av vaske- og desinfeksjonsmidler ligge igjen på overflaten. Vaskemidlene som benyttes er ofte sterkt alkaliske, mens desinfeksjonsmidlene ofte er basert på pereddiksyre eller kvartære ammoniumforbindelser. For å undersøke hvilken innvirkning dette kan ha på ATP-metoden, ble det brukt et alkalisk rengjøringsmiddel (ISS Alkalifoam 27), et pereddiksyrebasert desinfeksjonsmiddel (Diverfoam Active) og et desinfeksjonsmiddel basert på kvartære ammoniumforbindelser (ACO Hygiene des QA).

Det ble laget løsninger med 10^{-7} M ATP, men med forskjellige konsentrasjoner vaske- og desinfeksjonsmidler. Konsentrasjoner benyttet for de ulike vaske- og desinfeksjonsmidler er listet i Tabell 3-5. Målingene ble utført ved at 10 μ l av løsningene ble pipettert direkte på svabertesten (10^{-12} mol ATP tilsatt) og avlest i luminometer.

Tabell 3-5: Konsentrasjoner (%) av de forskjellige vaske- og desinfeksjonsmidler benyttet i forsøket.

Vaske-/desinfeksjonsmiddel	Konsentrasjoner (%)
Alkalifoam	5; 1; 0,1 og 0,01
Aco Hygiene Des QA	3; 1; 0,1; 0,01; 0,001 og 0,0001
Diverfoam	3; 1,5; 0,15; 0,015; 0,0015 og 0,00015

3.9. Mengde ATP i bakterier sultet i 2 døgn.

Dersom ATP-metoden skal kunne utelukke at en bakteriestamme har etablert seg må man vite hvor store RLU-utslag bakteriene gir på målingene. For å undersøke dette i bakterier som er sultet, ble det gjort målinger med 15 forskjellige bakteriestammer sultet 2 døgn i fysiologisk saltvann.

Hver bakteriestammene ble plukket fra BHI-agar med steril podeøse (1 μ l) og inokulert i 4,5 ml TSB over natt ved 30 °C. Fra overnattekulturen ble 1 μ l podet i 3 ml laksebuljong og inkubert i risteinkubator (150 rpm) ved 12 °C i 3 døgn. Etter 3 døgn ble 1 ml av hver kultur pipettert i 1,5 ml mikrorør og vasket. Vasking ble gjort ved sentrifugering (Biofude Fresco, Heraeus Instruments, Osterode, Tyskland) ved 10000 rpm i 5 min ved 4 °C. Supernatanten ble helt av og pelleten løst opp ved resuspending i 1 ml fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl). Vasking ble gjentatt en gang og kulturene ble inkubert i risteinkubator (150 rpm) ved 12 °C i 2 døgn. Etter 2 døgn ble ATP målt ved å appliserer 10 μ l fra 1:10 fortykning på ATP-svabertester. Celletall ble målt ved utplating på jernagar med Whitley Automated Spiral Plater (WASP, Don Whitley Scientific Limited, West Yorkshire, England) og avlesning med ProtoCOL 2 (Synbiosis UK, Cambridge, England) og Acolyte (Colony Counter, Synbiosis, Synoptics ltd, Cambridge, England).

3.10. Tilberedning av laksebuljong

Det ble kjøpt inn laksefilet i biter (FRA HAVET, lotnr: 45753, Coop, Oslo, Norge) på Coop Extra i Ås for å lage laksebuljong.

Omtrent 2.5 kg laksefilet uten skinn og bein ble kuttet i biter på omtrent 30 gram. Deretter ble ca. 100 g laks blandet med 100 ml springvann i stomacher-poser og homogenisert ved bruk av stomacher (Smasher AESAP1064, AES Chemunex, Combourg, Frankrike) i 1 minutt. Den homogeniserte væsken ble overført til 200 ml sentrifugerør og sentrifugert (Sorvall RC5C Plus, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA) ved 8120 rpm i 30 minutter. Supernatanten ble helt av og tilsatt 1 g NaCl per 100 g supernatant. Væsken ble fordelt i liters flasker (800 ml i hver) og autoklavert ved 121 °C i 15 minutter. Væsken ble så kjølt ned til 4 °C. Laksebuljongen ble fordelt på sterile sentrifugerør og sentrifugert på samme program som før autoklaving. Denne sentrifugeringen ble gjentatt en gang for å bli kvitt så mye partikler som mulig. Den ferdige laksebuljongen ble fordelt på 50 ml sterile rør (Sarstedt, Newton, NC, USA) og oppbevart ved -20 °C. Før bruk ble laksebuljong tint i kjøleskap (4 °C).

3.11. Innvirkning av bakterier på ATP-innhold i laksebuljong

For å undersøke hvilken innvirkning forskjellige bakteriestammer har på RLU-målinger i ATP-rikt smuss, ble 15 bakteriestammer inokulert i laksebuljong. Det ble gjort 2 uttak, det første etter 18 timer og det andre etter 5 døgn.

Hver bakteriestammene ble plukket fra BHI-agar med steril podeøse (1 µl) og inokulert i 4,5 ml TSB over natt ved 30 °C. Fra overnattekulturen ble 1 µl podet i 3 ml laksebuljong og inkubert i risteinkubator (150 rpm) ved 12 °C. Etter 3 dager inkubasjon ble 1 µl podet i ny laksebuljong og inkubert i risteinkubator (150 rpm) ved 12 °C i 18 timer. Den opprinnelige kulturen ble satt tilbake til inkubasjon. Etter 18 timer inkubasjon ble kulturen fortynnet 1:10 i dH₂O og ATP målt ved å pipettere 10 µl fra 1:10 fortynning direkte på svabertester. Celletall ble målt ved utplating på jernagar med WASP og avlesning med ProtoCOL2 og Acolyte.

Den opprinnelige kulturen ble inkubert i 2 nye døgn (totalt 5). Etter 5 dager ble kulturen fortynnet 1:100 i dH₂O og ATP ble målt ved å applisere 10 µl på ATP-svabertester. Celletall ble målt ved utplating på jernagar med WASP og avlesning med ProtoCOL2 og Acolyte.

*Fortynninger til ATP-målinger ble valgt ved å finne den fortynningen av kultur med *Pseudomonas* (MF05860) som ga omtrent 1000 RLU på Systemsure luminometer og 10000

RLU på Cleantrace. Dette ga RLU-utsalg i det lineære området og ga rom for reduksjon eller økning i RLU.

3.12. Forberedelser til biofilmforsøk

3.12.1. Tillaging av smussfraksjoner

I biofilmforsøket ble det benyttet 3 typer smuss - blod, fettrand og muskelhomogenat. Smuss ble laget av 4 ørret og 2 flasker lakseblod tilsendt fra en av bedriftene tilknyttet prosjektet oppgaven er en del av.

For å lage muskelsuspensjon ble loin skåret ut og kuttet opp i biter. Det ble tilsatt dH₂O til 1:1 fortykning. Blandingen ble homogenisert med stomacher i 30 sekunder.

For å lage fettsuspensjon ble fettrand skåret ut og kuttet opp i biter. Det ble tilsatt dH₂O til 1:1 fortykning. Blandingen ble homogenisert med stomacher i 30 sekunder.

Slo ble homogenisert i stomacher i 30 sekunder, før det i likhet med andre suspensjoner og blod ble fordelt på rør og frosset ned ved – 20 °C.

3.12.2. Kjemiske analyser av smussfraksjoner.

For å kunne si noe om hvorfor forskjellige smussfraksjoner påvirker ATP-metoden og etablering av biofilm, bør en vite noe om deres kjemiske sammensetning. Muskelfraksjoner, fettrand, blod og slo ble analysert for tørrvekt, pH og innhold av fett, protein og salt. I tillegg ble det målt saltinnhold i røykaroma.

Muskel og fettrand ble analysert som 1:1 løsninger i dH₂O. Resultater fra analysene er justert for dette i etterkant.

Tørrvekt

For å finne andel tørrstoff i smuss ble det gjennomført gravimetrisk analyse (analyse basert på veiing) for hver av disse. Ved gjennomføring ble prosedyre fra NMKL 23 fulgt (NMKL 1991).

Fettinnhold

Fettinnhold ble bestemt ved kjernemagnetisk resonans-spektroskopi (Maran Ultra LF-NMR, Oxford Instruments, Oxfordshire, England)

Så mye prøvemateriale som mulig ble veid inn i en teflonbeholder og lokket ble skrudd på. Teflonbeholder med prøvemateriale ble plassert i termostat ved 41 °C i 30 minutter. Når prøven var temperert ble teflonbeholderen overført til måleapparatet og fettinnhold målt.

Protein

Proteininnhold ble funnet ved bruk av Kjeldahls analyse (A01, Råprotein, Kjeldahl, N*6,25) og ble gjennomført av Nofima Biolab (Nofima As, Fyllingsdalen, Norge).

Saltinnhold

5 gram homogenisert prøve ble veid inn i MSE-homogenisator Kolbe (Edmund Bühler, Hechingen, Tyskland). Det ble tilsatt omtrent 50 ml 80 °C dH₂O. Prøvene ble homogenisert i en MSE-homogenisator (Edmund Bühler, Hechingen, Tyskland) i 30 sekunder. Prøven ble deretter overført til en 100 ml Erlenmeierkolbe (E-kolbe). Målekolben med prøve ble kjølt ned til romtemperatur og etterfylt med dH₂O til 100 ml merket. Målekolben ble ristet godt før innholdet ble filtrert gjennom et sortbåndsfiler over i en 100 ml E-kolbe.

Saltinnhold ble målt med ved at 100 µl permeat ble overført til titreringskaret til en Corning 926 Chloride Analyzer (Corning limited, Essex, England).

pH

pH ble målt med Standard pH Meter (PHM210, Radiometer Analytical SAS, Villeurbanne Dcedex, Frankrike).

3.12.3. *L. monocytogenes* blandingskultur

Det ble laget 5 forskjellige overnattkulturer av 5 stammer *L. monocytogenes*.

For å lage overnattkulturene ble bakteriestammer plukket fra BHI-agar med steril podeøse (1 µl) og inokulert i 4,5 ml TSB ved 30 °C over natt. For å nå omtrent 10⁸ kde ml⁻¹ ble overnattkulturene fortynnet 1:10 i dH₂O. *L. monocytogenes* blandingskultur ble laget ved å pipettere 3 ml fra hver 1:10 overnattkultur i 50 ml sterile rør.

3.13. Utføring av biofilmforsøk

ATP-målinger i biofilmforsøk ble utført med Systemsure luminometer og Ultrasnap svabertester. Forsøkene ble utført i flere omganger med små variasjoner. Tabell 3-6 gir en oversikt over forsøkene. For å gjøre pipetteringen mulig ble det laget 25 % løsning av fettrand og 16,5 % løsning av muskelhomogenat i dH₂O. Begge suspensjoner var i utgangspunktet fortynnet 1:1 i dH₂O.

Tabell 3-6: Oversikt over omfang av biofilmforsøk.

Forsøk	Suspensjoner	Materialer	Temperatur (°C)	Uttak (t)	Paralleller (stk)
Hovedforsøk	B, M, F, V	Rustfritt stål og Polyuretan	7 og 12	2 og 24	2
Celletall dråpe	B, M, F, V	Rustfritt stål	7 og 12	24	2
ATP kuponger	B, M, F, V	Rustfritt stål	7 og 12	24	2

B=blod, M=muskelfraksjon, F=fettrand og V=vann

Hovedforsøk

Sterile og rene kuponger av rustfritt stål og polyuretan ble plassert i sterile petriskåler (fire i hver). Deretter ble 100 µl smuss pipettert på hver kupong i sterilskap. Skålene med kuponger fikk stå i 1 time med lokk i romtemperatur, før de ble tørket i sterilbenk/avtrekkskap uten lokk til smusset var tørket (1,5-2 timer). Når suspensjonene var tørket ble 100 µl *L. monocytogenes*-kultur med omtrent 10⁸ kde ml⁻¹ påført oppå de tørkede suspensjonene. Petriskålene (uten lokk) med kuponger ble fordelt i lufttette bokser med omtrent 50 ml dH₂O (100 % relativ fuktighet) etter inkubasjonstid og -temperatur og inkubert.

Etter inkubasjon ble suspensjon og løse celler skylt vekk med 10 ml rennende dH₂O som ble påført med 10 ml engangspipette (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Tyskland) i overkant av smusset (ikke direkte på). Skylte kuponger ble plassert i rør med 6 ml dH₂O og sonikert (Branson 3510-DTH, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA) i 10 min. Celletall ble målt ved utplating på RLM med WASP og avlesning med Acolyte.

Celletall dråper og ATP i biofilm

Det ble satt opp ekstra forsøk for å finne celletall i suspensjonene som blir skylt vekk før sonikeringen, og for å måle ATP-innhold på overflaten til kuponger hvor *L. monocytogenes*-kulturene hadde festet seg.

Med små modifikasjoner (Tabell 3-6) ble prosedyrene fra hovedforsøket fulgt frem til skylling av kuponger. Før skylling ble 10 µl av hver suspensjon pipettert i 4,5 dH₂O. Celletall ble målt ved utplating på RLM med WASP og avlesing med Acolyte. De samme kupongene ble så skylt og sonikert. Det ble målt celletall i henhold til prosedyren i hovedforsøket.

For å måle RLU-utslag i biofilmene ble overflaten av kupongene svabret etter skylletrinnet og ATP ble målt. Det ble ikke målt celletall på disse kupongene.

3.14. Statistiske metoder

Til å behandle rådata, samt beregninger av gjennomsnitt, standardavvik og log-verdier, ble det benyttet Microsoft Excel 2013. MINITABTM ble benyttet til statistiske analyser. Det ble brukt Tukeys test og t-tester, og signifikansnivå ble satt til 5 % ($P < 0,05$). I statistiske analyser ble det i hovedsak benyttet log-transformerte verdier.

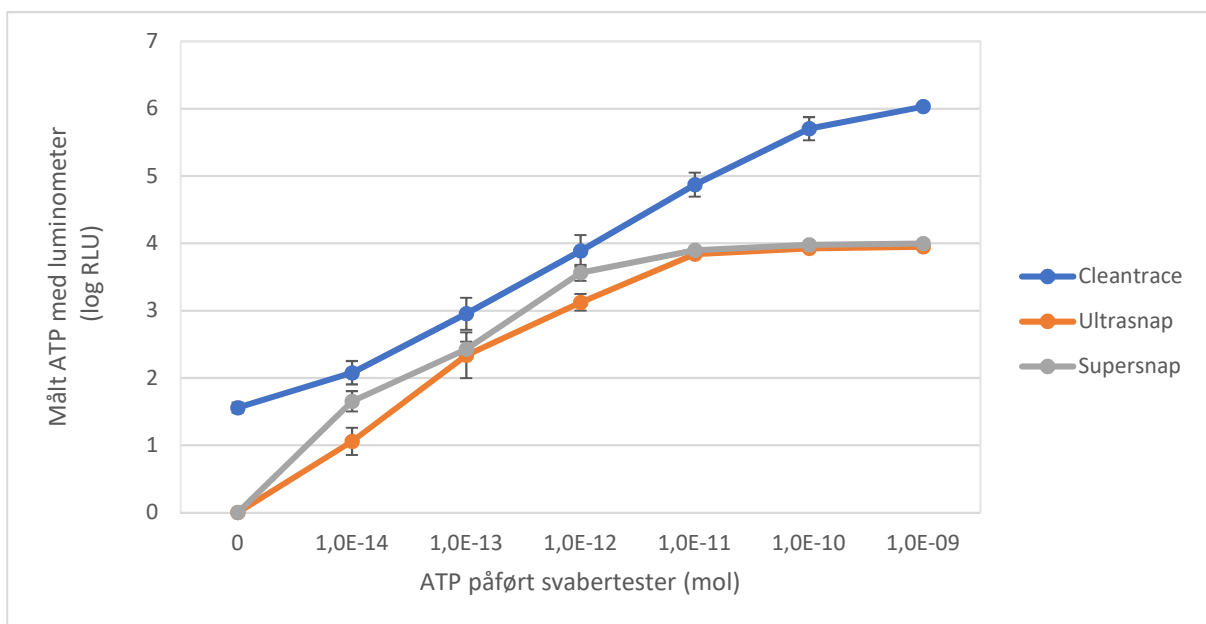
4. Resultater

I alle forsøk ble svabertesten Cleantrace benyttet for Cleantrace luminometer og Ultrasnap eller Supersnap med Systemsure luminometer.

4.1. Sammenligning av ATP-luminometre og -svabertester

Sensitivitet og lineært måleområde til Cleantrace luminometer med tilhørende svabertest (Cleantrace) og Systemsure luminometer med to tilhørende svabertester (Ultrasnap og Supersnap) ble undersøkt ved å påsette ulike kjente mengder ATP direkte på svabertester og måle utslag i RLU (Figur 4-1).

Det var lineær sammenheng mellom RLU og ATP (logaritmiske verdier) opptil en ATP-mengde på 10^{-10} mol ATP for Cleantrace ($R^2=0,99$). For Ultrasnap ($R^2=0,98$) og Supersnap ($R^2=0,98$) var det lineær sammenheng opptil 10^{-11} mol ATP. Høyere konsentrasjoner enn 10^{-11} mol ATP ga ikke høyere utslag i RLU for Ultrasnap og Supersnap. I det lineære området ga Cleantrace omlag tifold høyere RLU-verdier enn Systemsure, også når det ikke var tilsatt ATP på svabertesten.



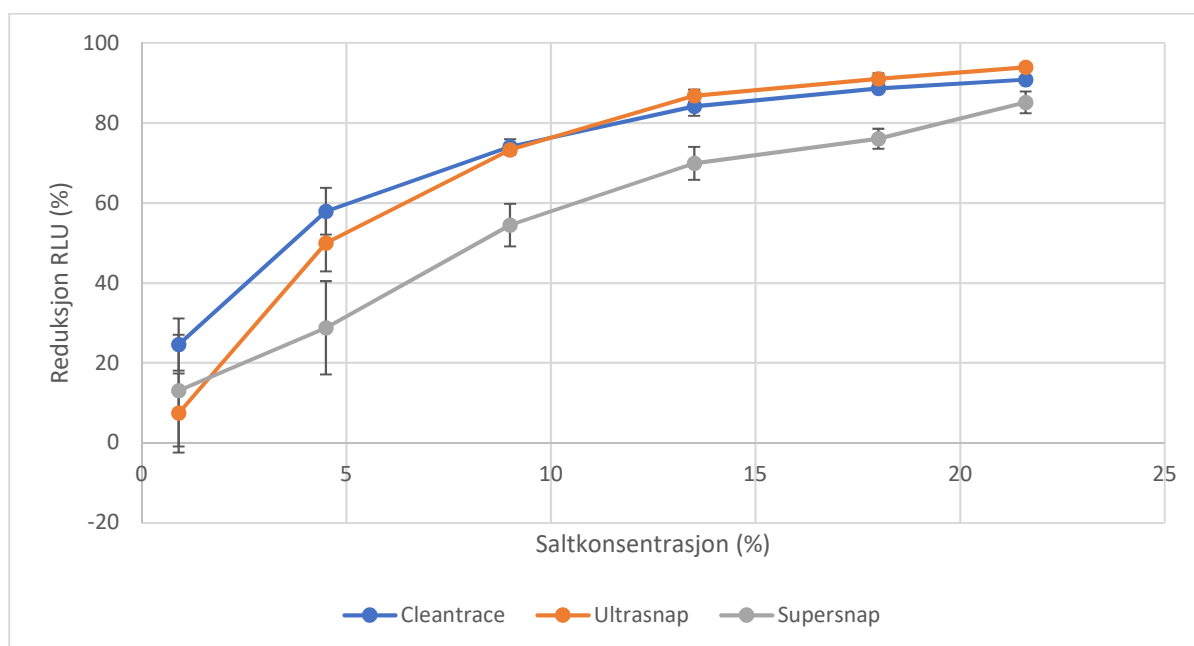
Figur 4-1: Sammenheng mellom ATP påført svabertest og ATP (log RLU) målt med luminometer. Hvert punkt er gjennomsnitt av tre målinger. Standardavvik er markert med feilfelt.

4.2. Innvirkning av natriumklorid, røykaroma, lakseolje og vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden.

4.2.1. Innvirkning av natriumklorid på ATP-metoden

For å undersøke hvordan ATP-metoden blir påvirket av natriumklorid (NaCl), ble det laget 6 løsninger med en konsentrasjon på 10^{-7} M ATP, men med ulike konsentrasjoner NaCl, fra 0,9 % (fysiologisk saltvann) til 21,6 % saltløsning. Løsningene ble påført svabertester og ATP ble målt.

Figur 4-2 viser at NaCl reduserte RLU-utslag sammenlignet med kontrollprøve (uten NaCl) for alle svabertestene. For Cleantrace var det signifikant reduksjon i målt RLU ved konsentrasjoner helt ned til 0,9 % ($P=0,017$). Ved konsentrasjoner på 4,5 % eller høyere hadde NaCl negativ innvirkning på avlest RLU for Cleantrace ($P=0,003$), Ultrasnap ($P=0,005$) og Supersnap ($P=0,037$). Testene var i ulik grad påvirket av natriumklorid. Ved 4,5 % NaCl var det større reduksjon i RLU for Cleantrace enn for Supersnap ($P<0,05$). Ved høyere konsentrasjoner (≥ 9 %) var reduksjon større for både Cleantrace og Ultrasnap enn for Supersnap ($P<0,05$).

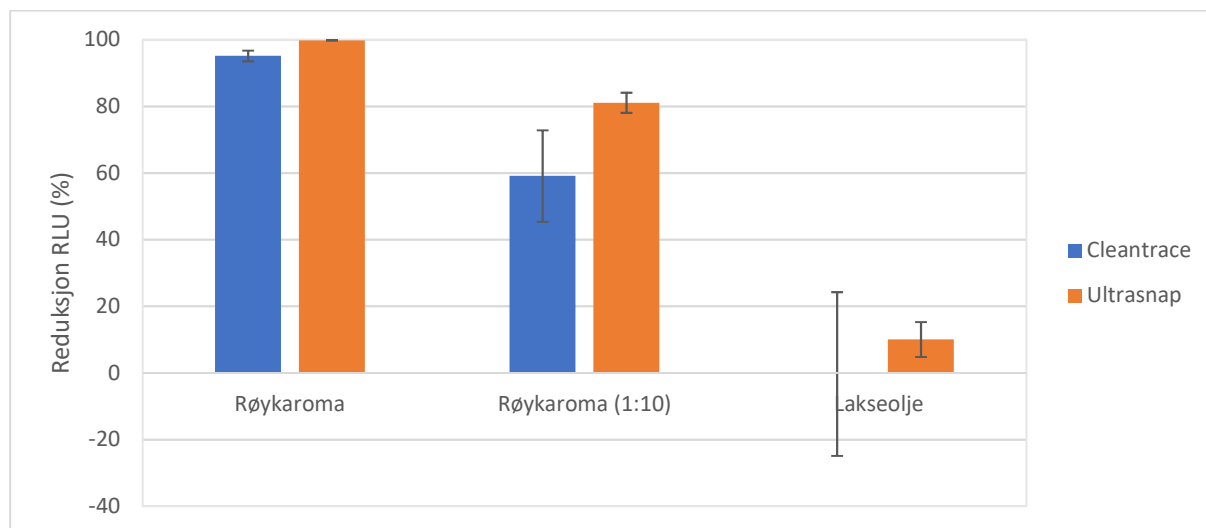


Figur 4-2: Innvirkning av NaCl på ATP-metoden. RLU-utslag som prosent av kontroll (Ikke tilsatt NaCl) er plottet mot NaCl-konsentrasjon. Testene ble gjennomført med en tilsatt ATP-mengde på 10^{-12} mol ATP. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist.

4.2.2. Innvirkning av røykaroma og lakseolje på ATP-målinger

For å undersøke hvordan røykaroma og lakseolje påvirker ATP-metoden ble det laget 3 løsninger med 10^{-12} mol ATP. To av løsningene inneholdt røykaroma i konsentrert form og i 1:10 fortykning, mens den siste inneholdt lakseolje.

Figur 4-3 viser at røykaroma hadde negativ innvirkning på ATP-målinger både for Cleantrace og Ultrasnap. Lakseolje hadde ikke negativ innvirkning på ATP-målinger.



Figur 4-3: Innvirkning av røykaroma og lakseolje på ATP-metoden. RLU-utslag som prosent av kontroll (Ikke tilsatt røykaroma eller lakseolje) er plottet mot løsninger tilsatt lakseolje og konsentrasjoner av røykaroma. Testen ble gjennomført med en tilsatt ATP-mengde på 10^{-12} mol ATP. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist.

Tabell 4-1 viser at røykaroma (uten ATP tilsatt) ikke ga høyere RLU-utslag enn kontrollen (dH_2O), men at lakseolje ga en liten økning på målinger med Cleantrace ($P=0,037$).

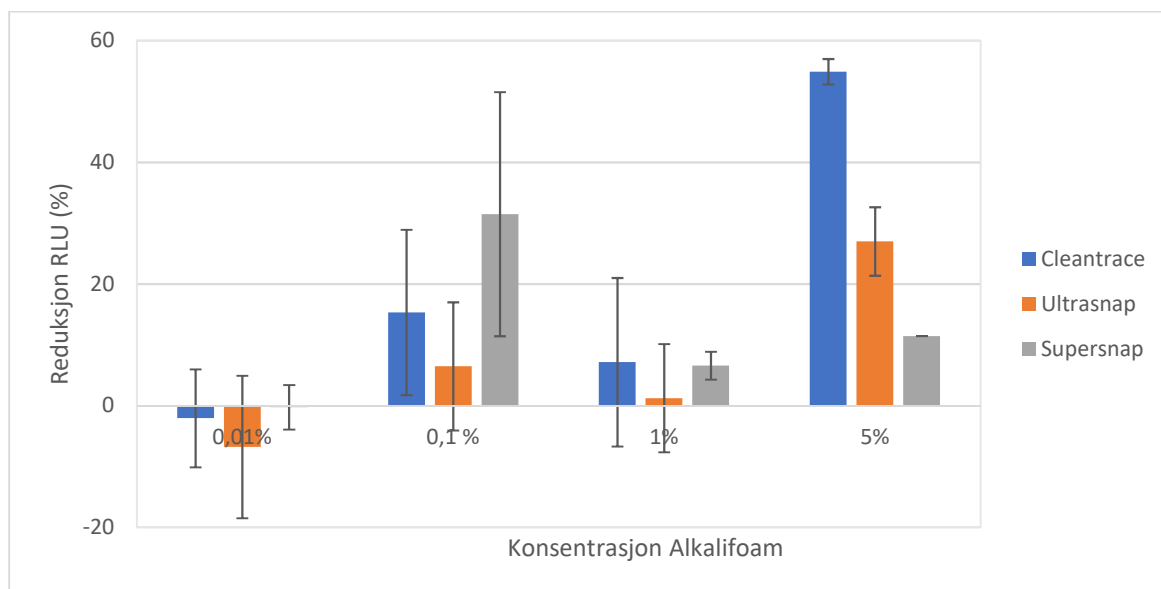
Tabell 4-1: ATP (målt med Cleantrace og Ultrasnap), saltinnhold og pH til røykaroma og lakseolje. Alle ATP-verdier er et gjennomsnitt av 3 målinger. Standardavvik er markert med feilfelt

	Cleantrace (RLU)	Ultrasnap (RLU)	NaCl (%)	pH
Røykaroma	19 (\pm 6)	0	0	2,2
Lakseolje	63 (\pm 10)	0	-	2,7
Kontroll (dH_2O)	38 (\pm 6)	0	-	-

4.2.3. Innvirkning av vaske- og desinfeksjonsmidler på ATP-metoden

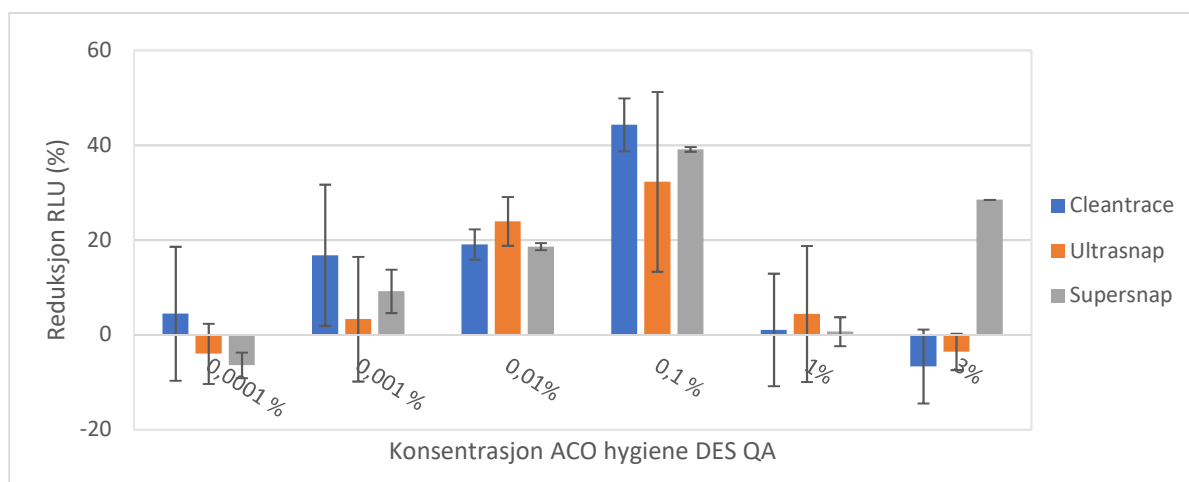
For å undersøke hvordan vaske- og desinfeksjonsmidler som ofte brukes i fiskeindustrien påvirker ATP-metoden ble det laget løsninger med lik mengde ATP, men med forskjellige vaske-/desinfeksjonsmidler av ulike konsentrasjoner. Det ble benyttet et sterkt alkalisk rengjøringsmiddel (Alkalifoam), et desinfeksjonsmiddel med kvartære ammoniumforbindelser (ACO hygiene DES QA) og et pereddiksyrebasert desinfeksjonsmiddel (Diverfoam).

Ved høyeste brukerløsning (5%) hadde det alkaliske vaskemidlet negativ innvirkning på RLU-utslag målt med Cleantrace (P=0,015), med en gjennomsnittlig reduksjon på 54,9 % (Figur 4-4). Ingen signifikant reduksjon ble målt med Supersnap og Ultrasnap (P=0,066 ved 5 %), eller på Cleantrace ved lavere konsentrasjoner.



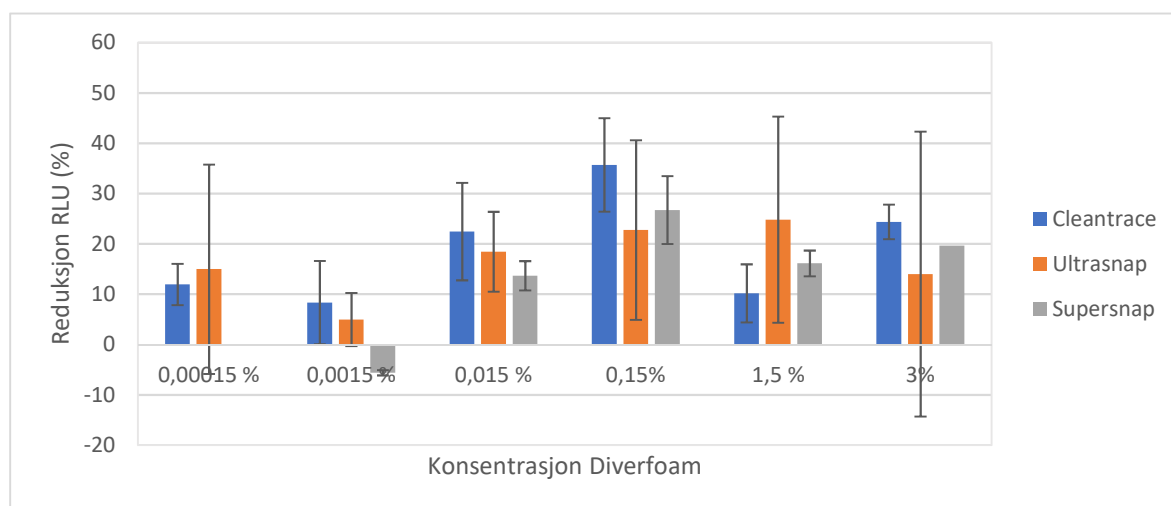
Figur 4-4: Innvirkning av vaskemiddelet Alkalifoam på ATP-metoden. RLU-utslag som prosent av kontroll (ikke tilsatt Alkalifoam) er plottet mot konsentrasjon Alkalifoam. Testen ble gjennomført med en tilsatt ATP-mengde på 10^{-12} mol ATP. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist.

Ved de anbefalte brukerkonsentrasjonene (1% og 3%) hadde ikke desinfeksjonsmiddelet basert på kvartære ammoniumforbindelser (ACO hygiene DES QA) negativ innvirkning på svabertestene (Figur 4-5). Ved konsentrasjon på 0,01 % var det signifikant redusert RLU-utslag for alle svabertestene og for Cleantrace (P=0,004) og Supersnap (P=0,004) ved 0,1 % konsentrasjon. Den største observerte effekten for alle testene var ved 0,1 % konsentrasjon, med observert reduksjon på 44 % for Cleantrace, 32 % for Ultrasnap og 39 % for Supersnap.



Figur 4-5: Innvirkning av desinfeksjonsmiddelet ACO Hygiene Des QA på ATP-metoden. RLU-utslag som prosent av kontroll (Ikke tilsatt ACO Hygiene Des QA) er plottet mot konsentrasjon ACO Hygiene Des QA. Testen ble gjennomført med en tilsatt ATP-mengde på 10^{-12} mol ATP. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist.

Som vist i Figur 4-6 hadde det pereddiksyrebaserte desinfeksjonsmiddelet (Diverfoam Active) negativ innvirkning i størrelsesorden 15-30 % på alle ATP-svabertester i konsentrasjonsområdet 0,015-3 % (høyeste anbefalte brukerkonsentrasjon).

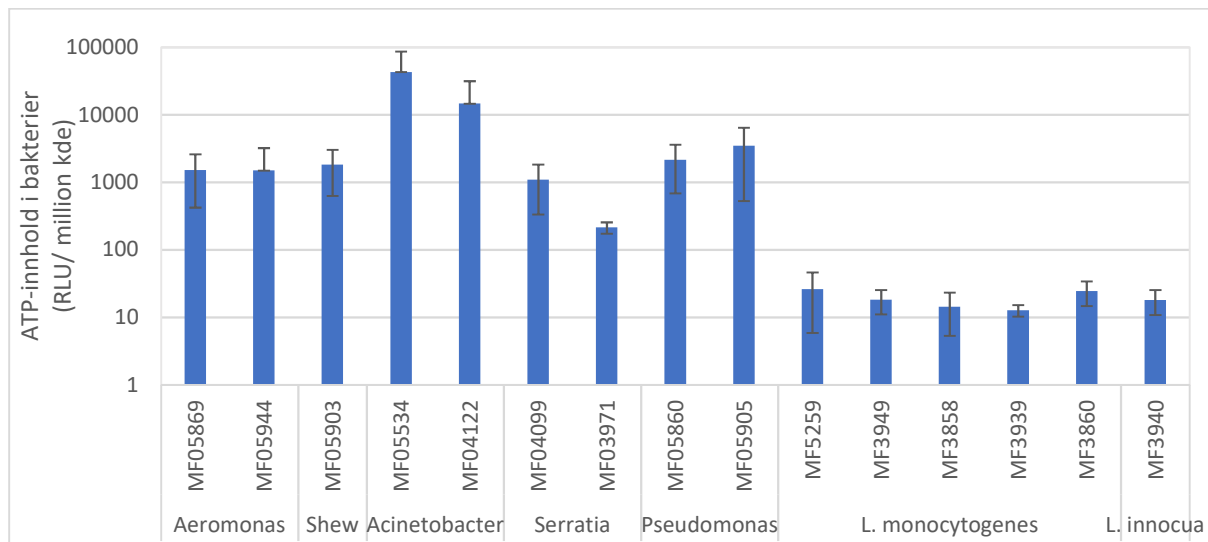


Figur 4-6: Innvirkning av desinfeksjonsmiddelet Diverfoam Active på ATP-metoden. RLU-utslag som prosent av kontroll (Ikke tilsatt Diverfoam) er plottet mot konsentrasjon Diverfoam. Testen ble gjennomført med en tilsatt ATP-mengde på 10^{-12} mol ATP. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist.

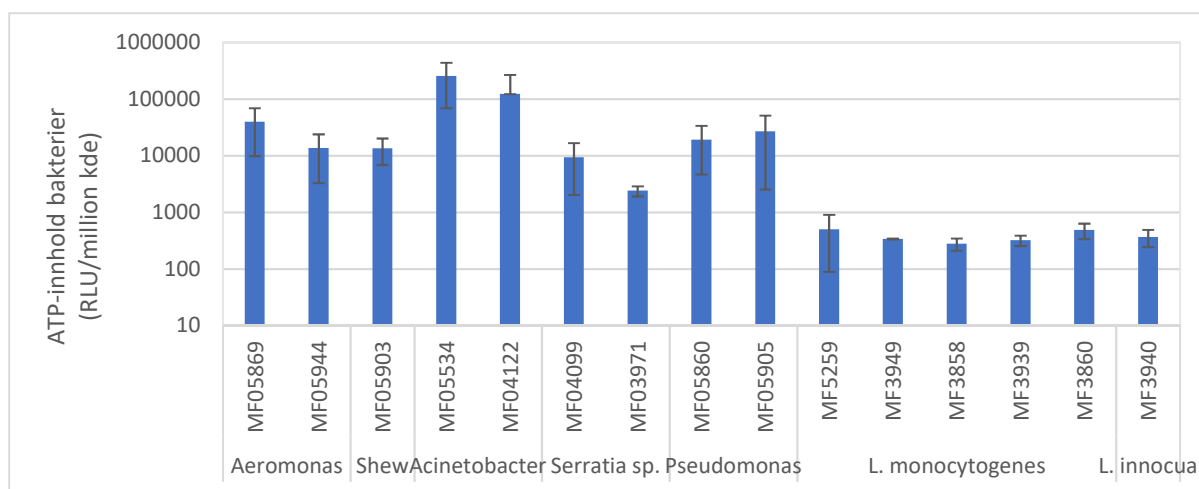
4.3. Mengde ATP i bakterier sultet i 2 døgn

Det kan tenkes at bakterier som ligger igjen på overflater etter renhold har begrenset tilgang på næringsstoffer og dermed er i en sultet metabolsk tilstand. For å undersøke hvilke utslag bakterier i en slik tilstand gir på ATP-målinger, og om det er forskjell mellom ulike stammer, ble 15 bakteriestammer sultet i to dager og ATP ble målt.

Som vist i Figur 4-7 var det store forskjeller i ATP-innhold mellom bakteriene på Ultrasnap svabertester. Ytterpunktene i ATP-nivå var *Acinetobacter* (MF05534) som ga et utslag på 43 000 RLU per million kde og *L. monocytogenes* (MF3939) som ga et utslag på 13 RLU per million kde. Alle de gramnegative bakteriestammene inneholdt mer ATP enn *Listeria*-stammene ($P < 0,05$). ATP-målinger med Cleantrace ga liknende resultater og er vist i Figur 4-8.



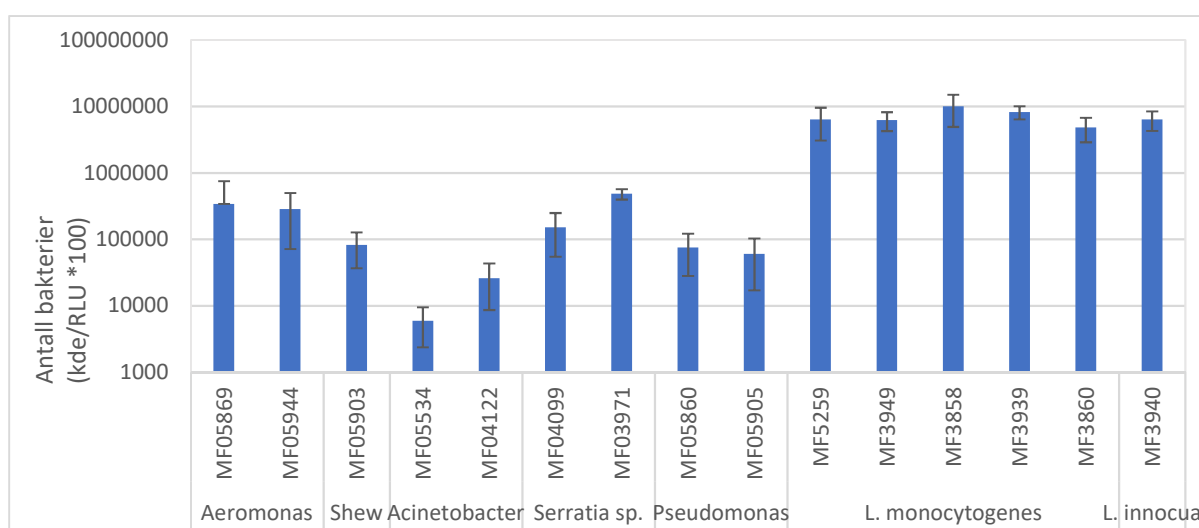
Figur 4-7: ATP-innhold (RLU) per million bakterier for ulike bakteriestammer sultet i 2 døgn i fysiologisk saltvann, målt med Ultrasnap. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist. Shew=Shewanella



Figur 4-8: ATP-innhold (RLU) per million bakterier for ulike bakteriestammer sultet i 2 døgn i fysiologisk saltvann, målt med Cleantrace. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist.

Bedrifter som bruker ATP-metoden for kontroll av renhold opererer ofte med grenseverdier for hva som er akseptabelt og ikke akseptabelt. Grenseverdiene varierer fra bedrift til bedrift og er ofte basert på bedriftens erfaringer (Trond Møretrø, personlig kommunikasjon). En av bedriftene involvert i prosjektet denne oppgaven er tilknyttet bruker Systemsure luminometer med Ultrasnap svabertester og har satt grenseverdi på 100 RLU som godkjent, fra 100 til 500 som «caution» og > 500 som ikke godkjent. Hvor mange bakterier som skal til for å gi utslag på 100 RLU med Ultrasnap, er vist i Figur 4-9.

Figur 4-9 viser at nesten 10^7 kde *L. monocytogenes* (MF3858) som var sultet i 2 dager kan være tilstede og likevel gi godkjent resultat med ATP-metoden.

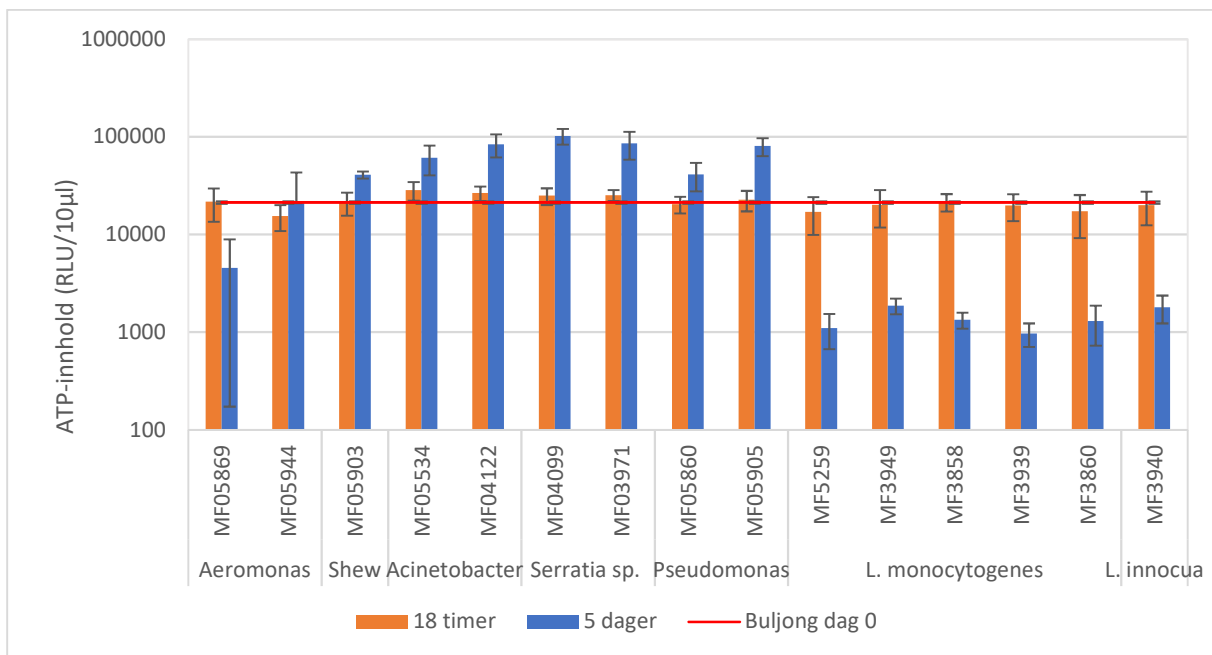


Figur 4-9: Antall bakterier som gir et utslag på 100 RLU med Ultrasnap. Gjennomsnitt av tre målinger og standardavvik er vist. Shew=Shewanella.

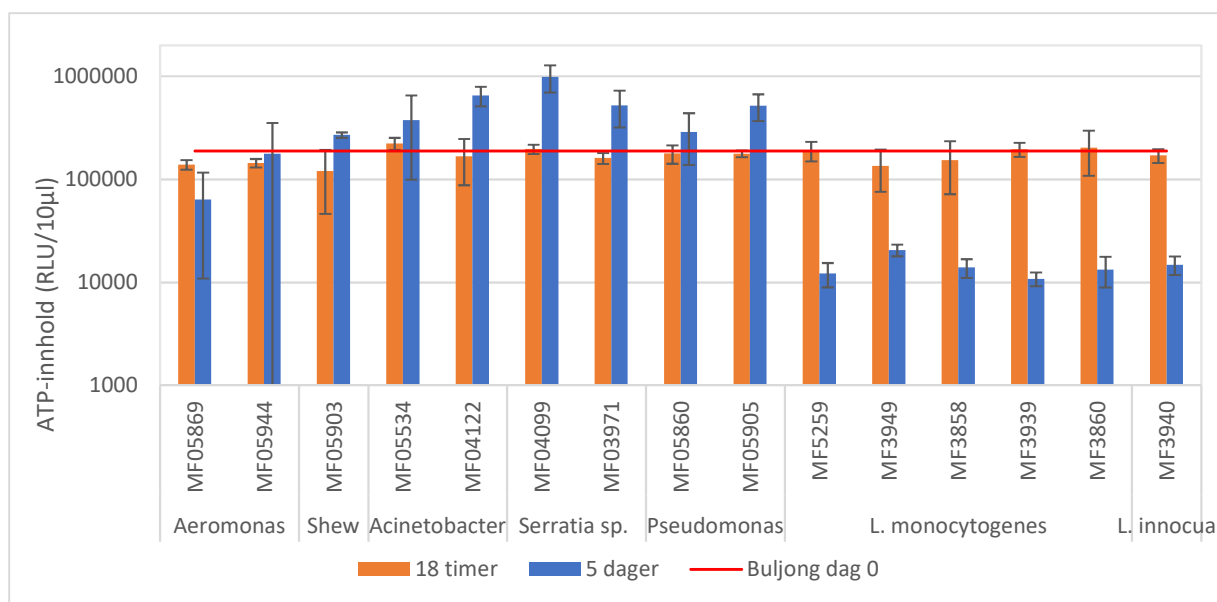
4.4. Innvirkning av bakterier på ATP-innhold i laksebuljong

For å undersøke hvordan ATP-innholdet i smuss påvirkes av ulike bakterier, ble 15 bakteriestammer dyrket i laksebuljong. ATP ble målt etter inokulering i 18 timer og 5 dager.

Figur 4-10 og 4-11 viser at det var liten forandring i ATP-innhold i kulturen etter 18 timer. Etter 5 dager hadde ATP-innholdet i laksebuljong inokulert med *L. monocytogenes* avtatt omtrent tifold, mens det for de gram-negative bakteriene i enkelte tilfeller hadde økt. De fleste gram-negative bakteriene hadde høyere vekst etter 5 dager enn *L. monocytogenes*, som vist i Tabell 4-2. Generelt sett var det mer vekst etter 5 dager enn 18 timer ($P=0,00$).



Figur 4-10: ATP-innhold i laksebuljong inokulert med ulike bakteriestammer etter 18 timer og etter 5 dager, målt med Ultrasonap. Gjennomsnitt av 3 målinger og standardavvik er vist.



Figur 4-11: ATP-innhold i laksebuljong inokulert med ulike bakteriestammer etter 18 timer og etter 5 dager, målt med Cleantrace. Gjennomsnitt av 3 målinger og standardavvik er vist.

Tabell 4-2: Antall bakterier påført svabertest ved ATP-målinger av laksebuljong. Gjennomsnitt av 3 målinger og standardavvik er vist.

Bakteriestammer	Bakterier påført svabertest etter 2 dager (log kde) *		Bakterier påført svabertest etter 5 dager (log kde) *	
		(SA)		(SA)
MF05869 <i>Aeromonas</i> sp.	2,9	(± 0,4)	3,9	(± 0,6)
MF05944 <i>Aeromonas</i> sp.	2,5	(± 0,7)	4,4	(± 0,4)
MF05903 <i>Shewanella</i> sp.	4,5	(± 0,3)	5,6	(± 0,1)
MF05534 <i>Acinetobacter</i> sp.	4,3	(± 0,4)	4,4	(± 0,1)
MF04122 <i>Acinetobacter</i> sp.	3,8	(± 0,4)	5,2	(± 0,6)
MF04099 <i>Serratia</i> sp.	4,7	(± 0,3)	5,9	(± 0,2)
MF03971 <i>Serratia liquefaciens</i>	4,5	(± 0,8)	5,4	(± 0,6)
MF05860 <i>Pseudomonas</i> sp.	3,6	(± 0,7)	5,4	(± 0,2)
MF05905 <i>Pseudomonas</i> sp.	3,8	(± 0,6)	5,6	(± 0,1)
MF5259 <i>Listeria monocytogenes</i>	3,9	(± 0,6)	4,6	(± 0,1)
MF3949 <i>Listeria monocytogenes</i>	3,4	(± 0,5)	4,7	(± 0,0)
MF3858 <i>Listeria monocytogenes</i>	3,4	(± 0,4)	4,6	(± 0,1)
MF3939 <i>Listeria monocytogenes</i>	4,2	(± 0,6)	4,6	(± 0,0)
MF3860 <i>Listeria monocytogenes</i>	3,6	(± 0,4)	4,6	(± 0,0)
MF3940 <i>Listeria monocytogenes</i>	3,6	(± 0,2)	4,7	(± 0,1)

*Det ble påført 10 µl kultur på svabertester.

4.5. Etablering av *Listeria monocytogenes* til kuponger av rustfritt stål og polyuretan med rester av smuss fra ørret.

I anlegg hvor fisken slaktes og bearbeides, kan forskjellige fraksjoner av fisken ligge igjen på steder som er vanskelig å nå ved renhold. Det ble tillaget ulike fraksjoner for å se på festing og biofilmdannelse av *L. monocytogenes* på overflater. Tabell 4-3 viser ATP-innhold i slike fraksjoner når de påsettes ATP-tester, og deres kjemiske sammensetning.

Fettprosenten varierte fra 1,8 % i blodet til 70,9 % i fettrand. Andelen tørrstoff var også størst i fettrand (87,9 %) og minst i blodet (11,4 %). Blod ga mye høyere RLU-utslag enn fettrand, muskel og slo.

Tabell 4-3: Kjemiske analyser av smuss fra ørret.

	Cleantrace (RLU/10 µl)	Ultrasnap (RLU/10 µl)	Fett (%)	Protein (%)	Tørrstoff (%)	NaCl (%)	pH
Muskel	4,2x10 ³ (± 1,5x10 ³)	313 (± 114)	11,0*	22,8	35,2*	0,13	6,2**
Fettrand	227 (± 76)	26 (± 14)	70,9*	6,6	87,9*	0,15	6,4**
Blod	5,3x10 ⁶ (± 3,9x10 ⁶)	4,8x10 ⁵ (± 2,2x10 ⁵)	1,8	5,1	11,4	1,18	7,1
Slo	74 (± 10)	14 (± 3)	61,4	5,3	60,0	0,15	6,1
Vann	38 (± 6)***	0	-	-	-	-	-

*Fettprosent og prosent tørrstoff ble målt i 50 % vannløsninger. Resultatene presentert i tabellen derfor resultatene fra analysene ganget med 2.

**pH av muskel og fettrand ble målt i 50 % vannløsninger.

*** Verdien fra kalibreringskurve (Kap. 4.1)

Det var store forskjeller i ATP-innhold i laksebuljong og rått smuss. For å undersøke om varmebehandling fører til økt RLU-utslag ble smuss varmebehandlet ved 80 og 121 °C og ATP ble målt.

Varmebehandling av fett og muskel førte til økte RLU-utslag sammenlignet med smuss som ikke var varmebehandlet (kontroll), som vist i Tabell 4-4. Varmebehandling av blod ga ikke økte RLU-utslag.

Tabell 4-4: ATP-innhold i varmebehandlet smuss. Muskel er fortynnet 1:3 i dH₂O og fett 1:2. Blod er ikke fortynnet. For blod varmebehandlet ved 80 °C er det gjort en måling, for resterende er gjennomsnitt av 2 målinger er vist.

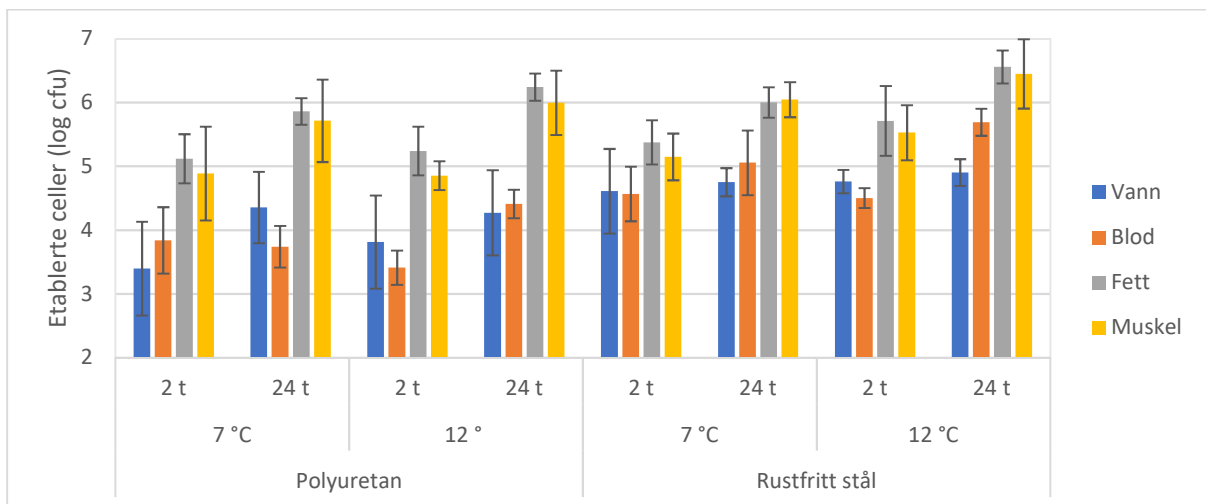
	Muskel 1:3 (RLU/10 µl)	Fett 1:2 (RLU/10 µl)	Blod (RLU/10 µl)
<i>Kontroll</i>	4	1	2415
<i>Varmebehandlet ved 80 °C i 30 min</i>	8176	7667	706*
<i>Varmebehandlet i ved 121 °C i 30 min</i>	4363	917	._**

*Blodet ble tyktflytende ved varmebehandling og derfor vanskelig å pipettere. Målt volum er derfor noe usikkert.

**For tykt til å pipettere.

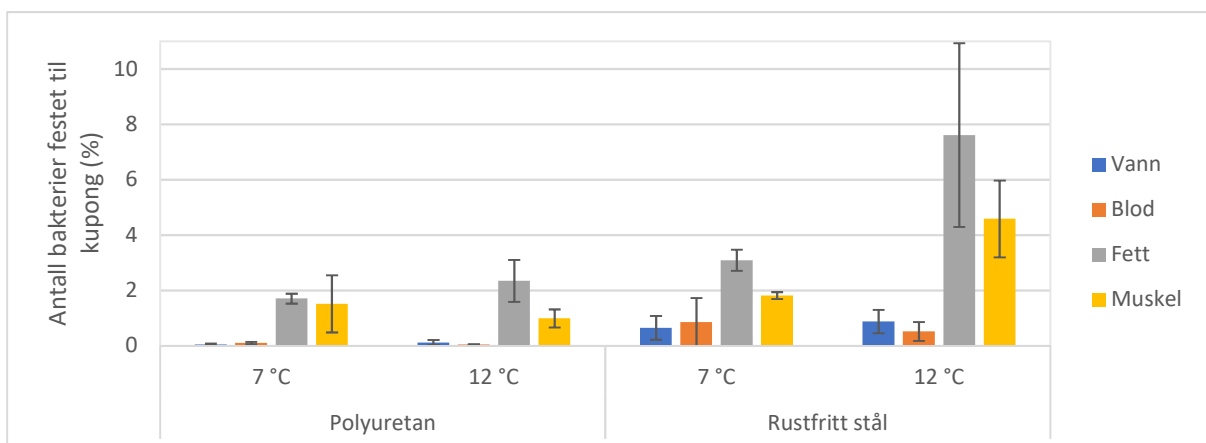
For å undersøke hvordan ulike typer smuss påvirker etablering av *L. monocytogenes*-biofilm, ble en blandingskultur med fem *L. monocytogenes*-stammer applisert på kuponger av rustfritt stål og polyuretan med tørket smuss.

Figur 4-12 viser at fettrand og muskelfraksjoner bidro til økt etablering av biofilm på overflater av rustfritt stål og polyuretan ($P < 0,05$) sammenliknet med kontrollprøver uten smuss. Økt inkubasjonstid førte til at flere bakterier festet seg ($P < 0,05$), mens forskjell i temperatur ikke har spilt en stor rolle. Et større antall *L. monocytogenes* festet seg til kuponger av rustfritt stål enn polyuretan ($P < 0,05$).



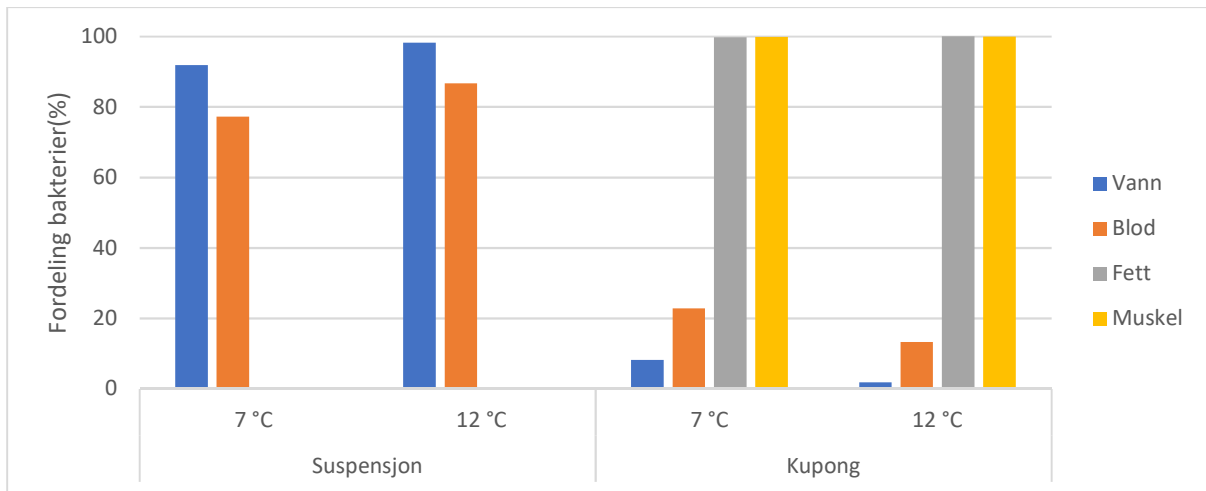
Figur 4-12: *L. monocytogenes* etablert på kuponger med smuss. Vann er benyttet som referanse/kontroll. Gjennomsnitt av 3 målinger med 2 paralleller og standardavvik er vist.

Figur 4-13 viser at mindre enn 10 % av *L. monocytogenes* som ble påført kuponger festet seg i løpet av 2 timer. Festingen var størst (7,6 %) ved 12 °C til kuponger av rustfritt stål med rester av fett.



Figur 4-13: Prosentandel *L. monocytogenes*, av antall bakterier påført kuponger med ulik type smuss, som festet seg i løpet av 2 timer inkubasjon ved 7 og 12 °C. Gjennomsnitt av 3 målinger og standardavvik er vist.

Det ble undersøkt sammenhenger mellom celletall på kuponger og i suspensjonen rundt kupong. Figur 4-14 viser at flertallet av bakteriene festet seg til kuponger med muskel og fett, mens på kuponger med vann og blod forble flesteparten i suspensjonen.



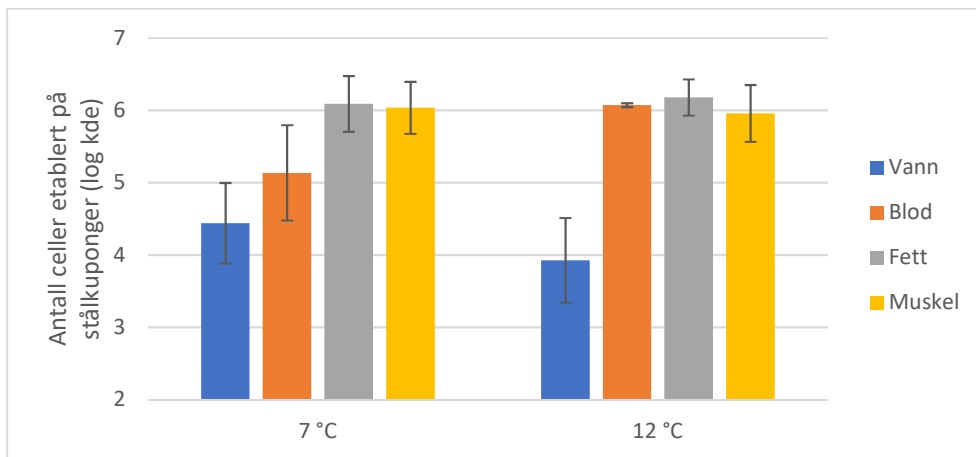
Figur 4-14: Prosentvis fordeling av bakterier i suspensjon og stålkupong etter 24 timer inkubasjon. Venstre halvdel viser andelen bakterier i prosent, av det totale antall bakterier målt i suspensjon og på kupong, som forble i suspensjonen ved inkubasjon ved 7 og 12 °C. Høyre halvdel viser andelen bakterier i prosent, av det totale antall bakterier målt i suspensjon og på kupong, som festet seg til kupong ved inkubasjon ved 7 og 12 °C.

4.6. ATP-nivå for biofilm med ulike smuss

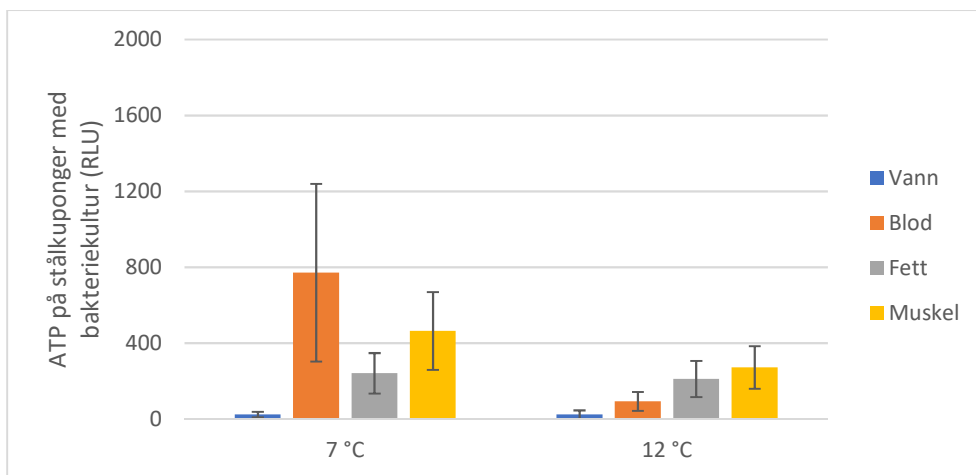
For å finne ATP-innhold på kuponger hvor *L. monocytogenes* er etablert ble de inkubert med smuss og bakteriekultur ved 7 og 12 °C. For å finne forskjeller i utviklingen av ATP-innhold bakteriene fører til, ble det også inkubert kuponger uten bakteriekultur, men med smuss, ved samme tid og temperatur.

På kuponger med fett og muskel var ATP-innholdet høyere ($P < 0,05$) når det var bakterier tilstede. Selv om resultatene ikke er statistisk signifikante ($P > 0,05$), tyder Figur 4-14 (a-c) på at tilstedeværelse av bakterier førte til lavere ATP-innhold på kuponger med blod. Dette fordi målt ATP var høyere på kuponger uten kultur enn med kultur, og at ATP-innholdet var høyere ved 7 enn 12 °C, mens celletall var høyere ved 7 enn 12 °C.

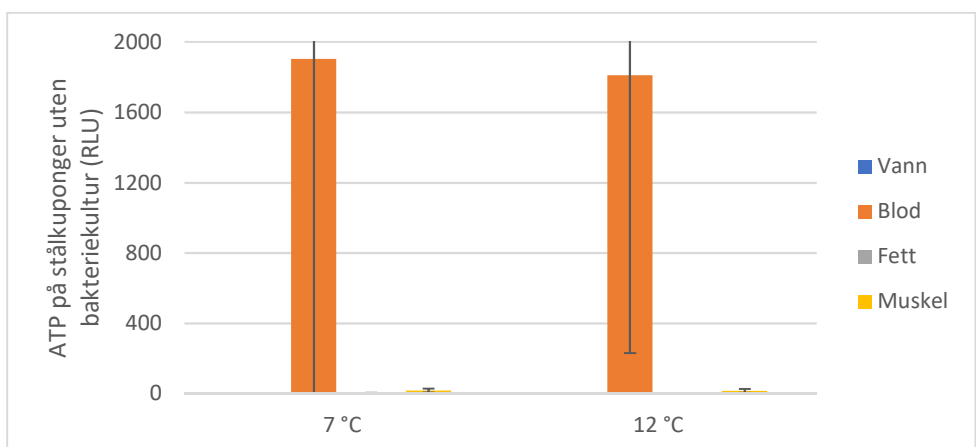
a)



b)



c)



Figur 4-15: ATP innhold på kuponger med og uten bakteriekultur og antall etablerte *L. monocytogenes* på stålkuponger. a) Etablering av *L. monocytogenes* på kuponger av stål, b) ATP på stålkuponger med *L. monocytogenes* og c) ATP på stålkuponger uten bakteriekultur.

5. Diskusjon

Hensikten med overvåking av renhold er å kunne sette inn korrigerende tiltak dersom renholdet ikke i tilstrekkelig grad har fjernet bakterier som kan smitte produktet eller smuss som kan gi grobunn for bakterier. Da man ved ATP-metoden måler ATP som RLU bør en ha kunnskap om sammenhengen mellom tilstedeværelse av smuss og bakterier og RLU-utslag. Metoden må også være sensitiv nok til å måle smuss- og bakteriemengder ned til det man mener er godt nok renhold. En metode som brukes til å overvåke renhold må også være robust mot komponenter som kan være tilstede dersom renhold ikke er utført tilstrekkelig.

5.1. Kalibrering av ATP-luminometer og -svabertester

Dersom ATP-metoden skal kunne benyttes til å overvåke renhold bør det være en lineær sammenheng mellom ATP som påføres svabertestene og RLU-utslag på luminometeret. Det ble vist lineær sammenheng mellom ATP og RLU for begge luminometer og alle svabertester. Begge luminometre hadde lineær sammenheng for et stort ATP-intervall. Selv om Cleantrace hadde lineær sammenheng i et større intervall enn Systemsure, spiller det liten rolle for luminometerets funksjon til å overvåke renhold. Grenseverdier for akseptabelt renhold bør være mye lavere enn 9999 RLU, som var maksimalt RLU-utslag for Systemsure luminometer. Kupski et al. (2010) har også vist at det er lineær sammenheng mellom ATP og RLU for samme luminometer og svabertester.

Begge luminometre ga RLU-utslag høyere enn 10 når de ble påført 10^{-14} mol ATP. Dette tyder på at deteksjonsgrensene ligger omtrent tifold lavere (10^{-15} mol ATP). Liknende funn er gjort av Kupski et al. (2010) som viste at Cleantrace luminometer med Cleantrace svabertester har en deteksjonsgrense på $1,3 \times 10^{-15}$ mol ATP, og at Systemsure med Ultrasnap og Supersnap har deteksjonsgrenser på henholdsvis 10^{-15} og $1,7 \times 10^{-16}$ mol ATP. Lavere ATP-mengder enn 10^{-14} mol ble ikke forsøkt målt i denne oppgaven.

Av de to instrumentene var det bare Cleantrace luminometer som hadde noe bakgrunnsstøy (38 ± 6 RLU) i dH₂O uten tilsatt ATP. Liknende funn er gjort i en studie av Kupski et al. (2010), hvor målinger med Cleantrace har utslag på 4 RLU i kontroller uten ATP. I det samme studiet har ikke målinger med Systemsure Plus med Supersnap og Ultrasnap svabere bakgrunnsstøy. Bakgrunnsstøy i luminometeret kan gjøre det vanskelig å avgjøre om en overflate er helt ren eller ikke ved lave målinger.

Målinger med samme mengde ATP, men forskjellige svabertester, ga forskjell i RLU-utslag. Målinger med Cleantrace ga målinger omtrent tifold høyere enn Ultrasnap. Dette betyr ikke at Cleantrace luminometer er mer sensitivt da RLU ikke er en standardisert måleenhet, men er unikt

for hvert system. Det er opp til produsenten å velge verdien for en lysenhet. Dersom forskjellige anlegg bruker ulike luminometer eller svabertester, bør en være forsiktig med å sammenligne resultatene. (Kupski et al. 2010)

5.2. Innvirkning av forbindelser assosiert med lakseproduksjon på ATP overvåkningssystemer.

Et system som brukes som kontroll på hygiene bør være robust mot forbindelser som ofte er tilstede på overflater i fiskeindustrien. Målet var derfor å undersøke hvilken innvirkning slike komponenter har på ATP-metoden, og om ulike svabertester påvirkes i ulik grad.

Natriumklorid hadde en negativ innvirkning på ATP-målinger. Dette stemmer overens med funn fra Ishida et al. (2003) som har vist at kloridet binder seg til det aktive sete til enzymet (luciferase) som reagerer med ATP slik at lysenheter frigjøres. I likhet med Ishida et al. (2003), som fant at natriumklorid i konsentrasjoner lavere enn 1 % reduserte luciferaseaktivitet, ble det i dette forsøket funnet at natriumklorid hadde negativ innvirkning på ATP-målinger med Cleantrace ved konsentrasjoner lavere enn 1 %. Ved produksjon av røkt laks benyttes store mengder salt, og selv om mesteparten av dette blir fjernet ved vask, kan en ikke utelukke at ATP målinger i slike områder viser kunstig lave RLU-verdier når testene er såpass sensitive. Nofima har i et annet prosjekt målt RLU lavere enn 10 med Cleantrace i områder med salt der celletallet har vært omtrent $4 \log/\text{cm}^2$ (Solveig Langsrud, personlig kommunikasjon). Dersom større mengder salt ligger igjen etter vask kan en i verste fall risikere at en skitten overflate blir karakterisert som ren ved ATP-målinger.

Ved NaCl konsentrasjoner høyere enn 9 % ble ikke RLU-utslaget redusert i like stor grad for Supersnap svabertester som for Ultrasnap og Cleantrace. Supersnap er 50 % dyrere enn de andre svabertestene, så selv om den er noe bedre egnet i slike prosessområder hvor det brukes mye salt, må bedriftene vurdere om det er verdt en økning på 50 % i utgifter til overvåking av hygien. I og med at ATP-metoden hemmes av NaCl, bør det vurderes å bruke mikrobiologiske metoder for å overvåke renhold i prosessområder hvor laks saltes.

Røykaroma hadde negativ innvirkning på ATP-målinger. Røykaromaen inneholdt ikke NaCl, men hadde lav pH. Bioluminescensaktivitet påvirkes ifølge et studie av Muthukumaran et al. (2014) negativt på økt eller senket pH. Det kan tyde på at væsken i testen (0,4-0,5 ml) ikke har nøytralisert den lave pH-en i røykaromaen. En tidels fortynning av røykaromaen reduserte også RLU-utslag. Det er typisk for flytende røykaroma å inneholde 2-29 mg ml^{-1} (0,2-2,9 %) fenolderivater (Montazeri et al. 2013). Omidbakhsh et al. (2014) viste at et fenolbasert

desinfeksjonsmiddel (Sporicidin, Contec Inc, Spartanburg, SC, USA) som inneholdt 15,8 mg ml⁻¹ (1,58 %) fenoler, reduserer RLU-utslag. Det kan derfor tenkes at det er fenoler som er årsaken til reduksjonen. I lys av dette er det et behov for videre undersøkelser for å finne hvilke stoffer i røykaroma som reduserer ATP-utslag. Fenoler, organiske syrer, alkoholer og karbonylforbindelser er stoffer i røykaroma (Fellows 2009) som bør undersøkes videre. I røykeprosessen vil det i tillegg være mye salt, som også har påvirket ATP-metoden negativt. I og med at RLU-utslag ble redusert av røykaroma, bør man ta hensyn til dette dersom ATP-metoden brukes i prosessområder hvor laks røykes, og eventuelt vurdere om mikrobiologiske metoder er mer hensiktsmessig.

Det **alkaliske** vaskemidlet hadde negativ innvirkning på ATP-målinger ved høyeste anbefalte brukerkonsentrasjon. Velazquez og Feirtag (1997) viste også at alkaliske vaskemidler har negativ innvirkning på ATP målinger med luminometer ved høye konsentrasjoner. De fant også at lavere konsentrasjoner (0,01 %) forsterket RLU-utslag. En slik forsterkende effekt ble ikke observert i dette forsøket. Studier har vist at bioluminescensaktiviteten reduseres av høy pH (Calvert et al. 2000; Muthukumaran et al. 2014). Dette kan være en mulig årsak til reduksjon da vaskemidlet har en pH på omtrent 12 i 1 % brukerløsning. Det er imidlertid lite sannsynlig at konsentrasjoner høye nok til å påvirke ATP-målinger vil være på overflatene når ATP-målinger gjennomføres, da eventuelle rester av middelet vil fortynnes i senere skylletrinn i renholdprosessen. Det er dermed lite sannsynlig at rester av alkaliske vaskemidler vil påvirke ATP-metoden ved hygienekontroll.

Desinfeksjonsmidlet basert på **kvartære ammoniumforbindelser** hadde mer reduserende effekt på ATP-målinger ved konsentrasjoner lavere enn brukerkonsentrasjoner. Det er gjort studier som viser at vaske- og desinfeksjonsmidler påvirker ATP-metoden ved enten å blokkere eller forsterke signalet (Shama & Malik 2013). Resultatene i denne oppgaven kan tyde på noen virkestoffer i ACO Hygiene Des QA blokkerer signalet, mens andre forsterker det, og at de som blokkerer bli mer fremtredende ved lavere konsentrasjoner. Et studie av Velazquez og Feirtag (1997) viste derimot at et desinfeksjonsmiddel basert på kvartære ammoniumforbindelser reduserte utslagene ved høye konsentrasjoner (1-5 %) og forsterket utslag ved lavere konsentrasjoner (0,01 %). I et studie av Omidbakhsh et al. (2014) ble effekten av 2 desinfeksjonsmidler basert på kvartære ammoniumforbindelser testet på 4 forskjellige luminometre, blant annet Cleantrace luminometer (eldre utgave) med Cleantrace svabere og en annen versjon fra Hygiene (EnSURE med Supersnap ATP3000 svabere).

Desinfeksjonsmidlene hadde negativ innvirkning på alle overvåkningssystemer, men reduksjonene var størst for Cleantrace (84 og 52 % for respektivt Cleantrace og Hygiene).

Desinfeksjonsmidlet basert på **pereddiksyre** ga en reduksjon mellom 15-30 % på alle ATP-tester i konsentrasjonsområdet 0,015-3 %. Turner et al. (2010) har også funnet at desinfeksjonsmidler basert på pereddiksyre eller kvartære ammoniumforbindelser har negativ effekt på ATP-målinger, da med overvåkningssystemer fra andre produsenter (PocketSwab Plus, Charm Sciences, Lawrence, MA) (novaLUM, Charm Sciences).

I alle områder hvor ATP-metoden brukes til å overvåke renhold bør det tas i betraktning at ulike komponenter kan påvirke RLU-målinger dersom renhold eller skylling etter renhold ikke har vært tilstrekkelig. Møretrø et al. (2017) fant at rester av desinfeksjonsmiddel med QAC helt opp til brukerkonsentrasjoner kan ligge igjen på overflater etter desinfeksjon og skylling i kjøttprosesseringsanlegg. Det er et åpenbart problem at komponenter som ligger igjen som følge av utilstrekkelig renhold kan føre til lavere utslag på en metode som skal kontrollere at renhold er tilstrekkelig utført.

5.3. ATP i bakterier og smuss

Selv om ATP metoden i hovedsak markedsføres som en metode for å detektere smuss, ville vi i denne oppgaven også undersøke hvordan bakterier direkte påvirker RLU signalet ved ATP målinger. Det ble detektert ATP i alle 15 bakteriestammer ved bruk av ATP-metodene. Flere studier er gjort hvor det er funnet ATP-innhold i mikroorganismer med ATP-metoden (Li et al. 2003; Vogel et al. 2014). Resultatene viste at ATP-innhold i sultet tilstand var lavere hos *L. monocytogenes* og *L. innocua* enn hos de andre bakteriestammene. *Acinetobacter* ga meget høyt RLU-utslag sammenlignet med *Listeria*. *Listeria* hadde det laveste utslaget av samtlige bakteriestammer. Dette stemmer overens med en sammenligningsstudie av Shama og Malik (2013), hvor flere bakteriestammer ble sammenlignet og *L. monocytogenes* hadde lavest innhold ATP per celle. *Listeria* var den eneste gram-positive arten som ble benyttet i forsøket. Det kan tenkes at gram-positive og gram-negative bakterier har ulike reaksjoner på sulting, og at forskjellen i ATP ligger der. Studier har vist at innhold av ATP reduseres i *E. coli* (Brauer et al. 2006), *Pseudomonas* sp. (Kjelleberg 2013) og *Salmonella typhimurium* (Shioi et al. 1982) ved sulting.

Mer enn 4 log kde *L. monocytogenes* sultet i 2 dager var nødvendig for å gi RLU-utslag på Ultrasnap. For de gram-negative bakteriene varierte dette fra 2-3 log kde. Selv om ATP-metoden kan detektere små mengder av enkelte bakterier, vil metoden i de fleste tilfeller ikke

være sensitiv nok til å brukes til direkte påvisning av *L. monocytogenes* i lakseindustrien. Nivået av *L. monocytogenes* er sannsynligvis ikke så høyt, f. eks er det vist at *L. monocytogenes* ikke er den dominerende arten i biofilm som overlever desinfeksjon, men representerer 0,1-0,01 % av populasjonen (Langsrud et al. 2016). Resultatene i denne oppgaven tyder på at en ikke kan si noe om bakteritall på en overflate basert på RLU-utslag. Dette støtter Larson et al. (2003) som heller ikke fant sammenheng mellom ATP-målinger og kimtall, og konkluderte med at slike målinger ikke er en erstatning for kvantifisering av mikrobielle analyser. Til tross for forskjeller mellom bakteriestammer har flere funnet sammenhenger mellom ATP målt med Luminometer og bakterietall (Aycicek et al. 2006; Cais-Sokolinska et al. 2010; Romanova et al. 2007). Cais-Sokolinska et al. (2010) påpeker at hver enkelt bedrift må bruke standard bakteriologiske metoder til å finne grenseverdier for ATP-målinger spesielt tilpasset bedrifter. Dermed vil grenseverdier som er akseptable i en bedrift ikke nødvendigvis være akseptabel i en annen.

Det var store forskjeller i ATP signalet fra ulike typer smuss. Målinger fra blod var i størrelsesorden 3 log høyere enn for muskel/fett som ikke var varmebehandlet. Det vil si at ATP metoden er mer sensitiv for deteksjon av blod enn for muskel/fett. ATP-metoden vil være sensitiv med hensyn til å påvise utilstrekkelig renhold i prosessområder hvor det er mye blod, for eksempel tidlig i slakteprosessen. Smuss fra muskel/fett vil være mer vanlig forekommende senere i foredlingsprosessen for eksempel på fileteringsutstyr, og selv om ATP metoden vil detektere slikt smuss, er metoden relativt lite sensitiv.

Laksebuljong ga vesentlig høyere RLU-utslag enn muskelfraksjoner og fettrand. For å undersøke årsaken til dette ble muskel og fettfraksjoner varmebehandlet og RLU-utslag før og etter varmebehandling ble sammenlignet. Fett og muskelfraksjoner ga vesentlig høyere RLU-utslag etter varmebehandling. En mulig årsak kan være at fett i rå muskel og fettrand hindrer at ATP frigjøres fra cellene i testen, mens ATP i smussfraksjonene blir gjort tilgjengelig ved varmebehandling. Dette kan også være årsaken til at blod, som inneholder lite fett, ga høyere RLU-utslag uten varmebehandling. Dette tyder altså på at svabertestene med ekstraksjonskomponenter som inngår der, sterkt underestimerer ATP nivået i fettrike fraksjoner. Meg bekjent er det ingen studier som tidligere har vist at ATP-metoden har problemer med å ekstrahere ATP fra celler i fettrikt smuss. Disse funnene viser at ATP-metoden har et stort forbedringspotensial når det gjelder å ekstrahere ATP fra noen typer smuss. Resultatene tyder også at ATP-metoden er bedre egnet for overvåking av renhold der laks/ørret varmebehandles, for eksempel restauranter og kantiner eller produksjonslokaler for ferdigmat.

For å kunne skille mellom bidrag fra smuss og bakterier ved en ATP-måling på en overflate må en vite hvordan bakterier påvirker ATP-nivået i smuss. For å undersøke dette ble 15 bakteriestammer inokulert til laksebuljong og ATP-innhold ble målt. Måling etter 18 timer skal illustrere en situasjon hvor smuss med bakterier har ligget på overflaten fra starten av arbeidsdagen til overvåking av renhold blir gjennomført. Inokulering av bakterier i 18 timer førte ikke til endringer i ATP-nivået i laksebuljongen for noen av bakteriestammene. Dette tyder på at frittlevende bakterier ikke endrer ATP-innholdet i laksebuljong i løpet av de 18 første timene. Det vil si at ATP-målinger i smuss etter 18 timer ikke vil påvirkes av bakterier som vokser uten å feste seg til overflaten.

På områder hvor renhold gjennomføres sjeldnere eller på steder hvor det er vanskelig å nå ved renhold kan det tenkes at suspensjoner av smuss med bakterier blir liggende over lengre tid. For å illustrere endringer i ATP i slike situasjoner ble målinger utført etter 5 dagers inkubasjon. Etter 5 dager ble det observert lavere ATP-nivå i laksebuljong med *L. monocytogenes* og *Aeromonas* sp. (MF05869), mens det ble observert høyere ATP-nivå i laksebuljong med *Shewanella* sp. (MF05903), *Serratia* sp. (MF04099) og *Pseudomonas* sp. (MF05905). For overvåking av renhold med ATP-metoden vil dette si at vekst av *L. monocytogenes* og *Aeromonas* sp. i smuss kan gjøre det vanskeligere å oppdage utilstrekkelig renhold, dersom smuss blir liggende over lengre perioder, mens det for *Shewanella* sp., *Serratia* sp. og *Pseudomonas* sp. vil være enklere å oppdage utilstrekkelig renhold når disse bakteriene vokser i smuss som blir liggende over lengre perioder.

5.4. Festing og biofilmdannelse av *L. monocytogenes* på overflater med ulike typer smuss

Det ble undersøkt hvordan ulike typer smuss påvirker festing/biofilmdannelse av *L. monocytogenes*.

Muskelfraksjoner og fettrand har bidratt til økt festing til kuponger, sammenlignet med rene kuponger. Blod bidro kun til festing på stålkuponger ved 24 timer inkubasjon ved 12 °C. Liknende funn er gjort av Gram et al. (2007), som viste at kuponger av stål senket i fiskebuljong når 5-6 log *L. monocytogenes* cm⁻² etter 2-3 dager ved 20 °C. Andre studier har vist at fiskeproteiner hemmer adhesjon av *Pseudomonas fluorescens* (Bernbom et al. 2009). Bernbom et al. (2009) fant også at belegg av flytende smuss av blant annet torsk ga redusert festing av *L. monocytogenes* til overflater av stål, sammenlignet med rene overflater. Forskjeller fra Bernbom et al. (2009) og dette forsøket kan skyldes at det ble brukt forskjellig type fisk. I tillegg

er forsøkene utført ved forskjellig temperatur. Bernbom et al. (2009) gjennomførte forsøket i romtemperatur, mens det i dette forsøket ble benyttet temperaturer som brukes i prosessområder i lakseindustrien (7 og 12 °C).

Lengre inkubasjon har som forventet ført til mer festing. Dette viser at smusset mellom 2 og 24 timer ikke har gjennomgått forandringer som hindrer *L. monocytogenes* i å feste seg. Økt festing skyldes sannsynligvis at lengre inkubasjon har gitt flere bakterieceller tid til å komme kontakt med kpongens overflate og dermed fått muligheten til å feste seg. Det var økt festing til kuponger av rustfritt stål sammenlignet med kuponger av polyuretan. Forsøkene ble gjennomført med nye polyuretan- og stålkuponger. Med tid vil overflater som brukes mye få riper og sprekker som kan bidra til festing av bakterier som danner biofilm.

Resultatene i dette forsøket tyder altså på at smuss i form av muskelfraksjoner og fettrand bidrar til økt festing av *L. monocytogenes* til overflater av rustfritt stål og polyuretan ved temperaturer som brukes i prosessområder i lakseindustrien. I prosessområder for sløyning og røyking kan det derfor være større fare for at *Listeria monocytogenes* etablerer biofilm, da dette er områder hvor det vil være muskelfraksjoner og fett.

Festing av *L. monocytogenes* til kuponger med fraksjoner fra fettrand og muskel førte til høyere utslag på ATP-metoden sammenlignet med kuponger uten bakteriekultur. Dette er det motsatte av hva som skjedde med *L. monocytogenes* i laksebuljong, hvor RLU-utslag ble lavere. Rått smuss og den varmebehandlede laksebuljongen hadde veldig forskjellige RLU-utslag i utgangspunktet. Laksebuljongen hadde et RLU-utslag på 20 000 (Ultrasnap), vesentlig høyere enn fettrand og muskel som hadde 26 og 313 RLU (Ultrasnap). Dette kan ha ført til at RLU fra ATP i bakteriene ble målbart i de sistnevnte smusstypene, slik at man observerte en økning i ATP nivå ved vekst.

Festing av *L. monocytogenes* på kuponger med blod førte til lavere RLU-utslag på ATP-målinger. Gjennomsnittlig RLU-utslag på kuponger med omtrent 6 log kde *L. monocytogenes* var 90. Dette er lavere enn grenseverdien for ikke akseptabelt renhold til en av bedriftene som er involvert i prosjektet denne oppgaven er en del av. På kuponger inkubert ved lavere temperatur var antall bakterier også mindre, mens gjennomsnittlig målt RLU var høyere. Dersom rester av blod blir liggende på utstyr og overflater som er vanskelig å nå ved renhold, kan det tenkes at *L. monocytogenes* får tid til å etablere seg. Dersom ATP-metoden brukes i et slikt område kan man selv ved høy vekst av *L. monocytogenes* risikere lave RLU tall som feilaktig indikerer godt renhold.

5.5. Sammenfattende diskusjon

Resultatene fra denne oppgaven har vist at det er mange faktorer som bør vurderes ved bruk av ATP-metoden til overvåking av renhold. Forskjellen på RLU-utslag i ulike typer smuss, og forskjellen mellom varmebehandlet og rått, smuss tyder på at næringsmiddelprodusenter bør sette grenseverdier tilpasset hvert enkelt prosessområde. ATP-metoden var godt egnet til å påvise utilstrekkelig renhold som følge av rester av blod. En kunne derfor tenkt at grenseverdier i slakteprosess, hvor det er mye blod, kunne være høye. Det er imidlertid ikke så enkelt da en også bør ta i betraktning at blodet lettere vil vaskes vekk ved renhold, og at RLU-utslagene ble lavere når *L. monocytogenes* vokste i blodet.

I filetering- og røykeprosess vil smuss i større grad bestå av fraksjoner fra muskler og fettrand. Små mengder av disse smusstypene ga også RLU-utslag, men utslagene var vesentlig lavere. I røkeri vil brukes store mengder natriumklorid, som hadde en negativ innvirkning på RLU-utslag. I tillegg tyder resultatene i denne oppgaven på at partikler fra røyk i seg selv kan redusere RLU-utslag. Smuss av denne typen vil dermed være vanskelig å påvise med ATP-metoden, spesielt i røkeri. Dette var samtidig smusstyper som førte til økt festing av *L. monocytogenes* til overflater. Det at ATP-metoden ikke er mer sensitiv overfor disse er noe lakseindustrien bør vurdere ved overvåking av renhold.

Noen bakterier førte til høyere RLU-utslag i laksebuljong, mens andre førte til redusert utslag. Noen typer smuss (muskel og fettrand) fikk høyere RLU-utslag med vekst av bakterier, mens andre (blod) fikk redusert RLU-utslag. Basert på dette kan en si at det ikke var noen generell sammenheng mellom antall bakterier i smuss og laksebuljong og RLU. RLU signal fra *Listeria* var lavere enn andre vanlige forekommende bakterier fra lakseindustri. Produsenter av ATP-metoder er tydelige på at metoden ikke har som hensikt å kvantifisere mikroorganismer, men heller gi et inntrykk av hvor ren overflatene er. Resultatene fra denne oppgaven støtter dette, men samtidig er det en utfordring for metoden at det i noen tilfeller kan være omvendt korrelasjon mellom bakterievekst og RLU signal. Aktører i lakseindustrien som bruker ATP-metoden bør ta i betraktning at *L. monocytogenes* gir et såpass svakt signal. Det skal også nevnes at *L. monocytogenes* sjelden utgjør store deler av en biofilm, men at det er *Pseudomonas* sp. som dominerer (Langsrud et al. 2016). *Pseudomonas* sp. hadde omtrent 2 tifold høyere ATP-innhold enn *L. monocytogenes* og vil derfor kunne bidra til høyere RLU-utslag.

6. Konklusjon

Alle ATP-overvåkningssystemer var godt egnet til å påvise små mengder ATP på overflater. Resultatene i denne oppgaven viser at ATP-metoden gir små RLU-utslag med fettrand og muskelfraksjoner sammenlignet med blod. Dette er en indikasjon på at ATP-metoden vil være bedre egnet til bruk i slakteri enn senere i prosesslinjen. ATP-metoden påvirkes negativt av natriumklorid og røykaroma. Dette tyder på at metoden er mindre egnet til bruk i røkeprosess og at mikrobiologisk prøvetaking vil være mer hensiktsmessig her.

Vekst i muskelfraksjoner og fettrand førte til økt festing av *L. monocytogenes* til overflater og ATP-metoden ga veldig små RLU-utslag på disse smusstypene. Dette er en indikasjon på at ATP-metoden ikke er godt egnet til å påvise forhold som fremmer festing av *L. monocytogenes* til overflater.

Denne oppgaven kan bidra til kunnskap om hvilke prosessområder i lakseindustrien ATP-metoden er best egnet. Den kan i tillegg bidra med kunnskap om hvilke typer smuss som bidrar til etablering av *L. monocytogenes*-biofilm.

7. Forslag til videre arbeid

- Undersøke ATP-innhold i bakterier i vekst og sammenligne med bakterier som sulter.
- Videre undersøkelser på hvilke komponenter i røykaroma som blokkerer RLU-utslag.
- Sammenligne ATP-målinger med bakterietall ute i industrien. Undersøke om forholdet mellom bakterietall og RLU er forskjellig i ulike deler av produksjonsmiljøet. En kan for eksempel sammenligne områder med mye blod med områder med mye fett.
- Siden *Listeria* ikke er en god biofilmdanner bør en se på RLU-utslag i blandingsbiofilm med bakteriestammer relevant for lakseindustri. En slik biofilm vil domineres av *Pseudomonas* spp.

8. Referanser

- 3M. (2015). *User Manual*. Care, M. H. (red.): 3M Health Care.
- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology*. 3 utg. Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry. 463 s.
- Andreani, N. A. F., Luca. (2017). *Pseudomonas and Related Genera*. I: Bevilacqua, A. C., Maria Rosaria
- Sinigaglia, Milena (red.) *The Microbiological Quality of Food*, s. 25-50. Foggia, Italia: Woodhead publishing.
- Aycicek, H., Oguz, U. & Karci, K. (2006). Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *International journal of hygiene and environmental health*, 209 (2): 203-206.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C. & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87 (3): 239-250.
- Bellamy, E. (2012). An audit of cleaning effectiveness using adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay following outbreaks of infection. *Journal of Infection Prevention*, 13 (5): 154-157.
- Bernbom, N., Ng, Y., Jørgensen, R. L., Arpanaei, A., Meyer, R. L., Kingshott, P., Vejborg, R. M., Klemm, P. & Gram, L. (2009). Adhesion of food-borne bacteria to stainless steel is reduced by food conditioning films. *Journal of applied microbiology*, 106 (4): 1268-1279.
- Brauer, M. J., Yuan, J., Bennett, B. D., Lu, W., Kimball, E., Botstein, D. & Rabinowitz, J. D. (2006). Conservation of the metabolomic response to starvation across two divergent microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (51): 19302-19307.
- Cais-Sokolinska, D., Pikul, J. & Wójtowski, J. (2010). Use of Bioluminescence in the Assessment of the Degree of Cleanliness of Milk Tanks in Goat Milk Processing Plants. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 61 (2): 27.
- Calvert, R. M., Hopkins, H. C., Reilly, M. J. & Forsythe, S. J. (2000). Caged ATP — an internal calibration method for ATP bioluminescence assays. *Letters in Applied Microbiology*, 30 (3): 223-227.
- Davidson, C. A., Griffith, C. J., Peters, A. C. & Fielding, L. M. (1999). Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness—ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*, 14 (1): 33-38.

- EFSA, E. F. S. (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010–2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 11 (6).
- Fellows, P. J. (2009). *Food processing technology: principles and practice*: Elsevier.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health. *Journal of Food Protection*, 77 (1): 150-70.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gyomai, P. & Vogel, B. F. (2007). Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 18 (10): 1165-1171.
- Granum, P. E. (2011). *Industrielt renhold*. Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi: Norges veterinærhøgskole.
- Hansen, C. H., Vogel, B. F. & Gram, L. (2006). Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments. *Journal of food protection*, 69 (9): 2113-2122.
- Heir, E. & Langsrud, S. (2013). Smitteveier og smittekilder for *Listeria* i produksjonskjeden for sløyd og røkt laks. Ås, Norge: Nofima As. 14 s.
- Huss, H. H., Embarek, P. K. B. & Jeppesen, V. F. (1995). Control of biological hazards in cold smoked salmon production. *Food Control*, 6 (6): 335-340.
- Hygiene. (2013). *SystemSURE Operators Manual*. LLC, H. (red.), 3. 29 s.
- Internkontrollforskriften for næringsmidler*. (2010). www.lovdatab.no: Lovdata. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/1994-12-15-1187>.
- Ishida, A., Yoshikawa, T. & Kamidate, T. (2003). Firefly bioluminescence assay of ATP using diethylaminoethyl–dextran as an enhancer in the presence of sodium chloride and ATP extranctant. *Analytical biochemistry*, 316 (1): 127-130.
- Kjelleberg, S. (2013). *Starvation in bacteria*: Springer Science & Business Media.
- Kupski, B., Caylan, E. & Stewart, C. (2010). Performance Evaluation of Various ATP Detecting Units: Silliker, Inc.
- Langsrud, S., Moen, B., Møretø, T., Løype, M. & Heir, E. (2016). Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 120 (2): 366-378.
- Larson, E. L., Aiello, A. E., Gomez-Duarte, C., Lin, S. X., Lee, L., Della-Latta, P. & Lindhardt, C. (2003). Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food microbiology*, 20 (6): 735-739.

- Li, J., Kolling, G., Matthews, K. & Chikindas, M. (2003). Cold and carbon dioxide used as multi-hurdle preservation do not induce appearance of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 94 (1): 48-53.
- Lovdata. (2017). *Forskrift om næringsmiddelhygiene; Særlige krav for prøving og prøvetaking*. www.lovdata.no.
- Løype, M. (2012). *Bakterieflora og forekomst av Listeria monocytogenes i lakseindustrien : L.monocytogenes i multi-og duokultur biofilmer under ulike betingelser*. Master thesis. Ås, Norge: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. 103 s.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. & Clark, D. (2012). *Biology of Microorganisms*. 13 utg. 1301 Sansome Street, San Francisco CA: Pearsons Education. 1150 s.
- Marques, S. M. & Esteves da Silva, J. C. G. (2009). Firefly bioluminescence: A mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB Life*, 61 (1): 6-17.
- Marriott, N. & Gravani, R. B. (2006). *Principles of food sanitation*: Springer Science & Business Media.
- Mattilsynet. (u. år). Rutiner for trygg mat; En innføring i internkontroll og HACCP.
- Milne, B. F., Marques, M. A. & Nogueira, F. (2010). Fragment molecular orbital investigation of the role of AMP protonation in firefly luciferase pH-sensitivity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12 (42): 14285-14293.
- Montazeri, N., Oliveira, A. C. M., Himelbloom, B. H., Leigh, M. B. & Crapo, C. A. (2013). Chemical characterization of commercial liquid smoke products. *Food Science & Nutrition*, 1 (1): 102-115.
- Muthukumar, T., KrishnaMurthy, N. V., Sivaprasad, N. & Sudhaharan, T. (2014). Isolation and characterization of luciferase from Indian firefly, *Luciola praeusta*. *Luminescence*, 29 (1): 20-28.
- Møretrø, T., Moen, B., Heir, E., Hansen, A. Å. & Langsrud, S. (2016). Contamination of salmon fillets and processing plants with spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 237: 98-108.
- Møretrø, T., Schirmer, B. C., Heir, E., Fagerlund, A., Hjemli, P. & Langsrud, S. (2017). Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 215-224.
- NMKL. (1991). *Moisture and ash. Gravimetric determination in meat and meat products*. www.nmkl.org. Tilgjengelig fra: <http://www.nmkl.org/index.php/en/webshop/item/listeria-monocytogenes-pavisning-i-naeringsmidler-og-for-samt-kvantifisering-i-naeringsmidler-nmkl-136-5-utg-2010>.

- NMKL. (2010). *Listeria monocytogenes. Detection in foods and feeding stuffs and enumeration in foods.* www.nmkl.org. Tilgjengelig fra: <http://www.nmkl.org/index.php/en/webshop/item/listeria-monocytogenes-pavisning-i-naeringsmidler-og-for-samt-kvantifisering-i-naeringsmidler-nmkl-136-5-utg-2010>.
- Omidbakhsh, N., Ahmadpour, F. & Kenny, N. (2014). How reliable are ATP bioluminescence meters in assessing decontamination of environmental surfaces in healthcare settings? *PloS one*, 9 (6): e99951.
- Prakash, B., Veeregowda, B. & Krishnappa, G. (2003). Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Current science*, 85 (9): 1299-1307.
- Prévost, D., Angers, D. A. & Nadeau, P. (1991). Determination of ATP in soils by high performance liquid chromatography. *Soil Biology and Biochemistry*, 23 (12): 1143-1146.
- Romanova, N. A., Gawande, P. V., Brovko, L. Y. & Griffiths, M. W. (2007). Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 71 (3): 231-237.
- Rutala, W. A., Weber, D. J. & HICPAC. (2008). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008: Center for Disease Control and Prevention.
- Rørvik, L. M. (2014). *Listeria monocytogenes*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning: Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*: Høyskoleforlaget.
- Schmidt, R. H. (2009). Basic Elements of Equipment Cleaning and Sanitizing in Food Processing and Handling Operations. University of Florida: Food Science and Human Nutrition Department. 12 s.
- Shama, G. & Malik, D. J. (2013). The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International journal of hygiene and environmental health*, 216 (2): 115-125.
- Shioi, J., Galloway, R. J., Niwano, M., Chinnock, R. E. & Taylor, B. L. (1982). Requirement of ATP in bacterial chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*, 257 (14): 7969-7975.
- Turner, D. E., Daugherty, E. K., Altier, C. & Maurer, K. J. (2010). Efficacy and limitations of an ATP-based monitoring system. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49 (2): 190-195.
- Velazquez, M. & Feirtag, J. M. (1997). Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. *Journal of food protection*, 60 (7): 799-803.
- Vogel, S. J., Tank, M. & Goodyear, N. (2014). Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence system. *Letters in Applied Microbiology*, 58 (4): 370-375.

Winkelströter, L. K., Teixeira, F. B. d. R., Silva, E. P., Alves, V. F. & De Martinis, E. C. P. (2014). Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. *Microbial Ecology*, 68 (1): 35-46.

Vedlegg

Statistiske beregninger med Minitab

Er det forskjeller mellom Cleantrace, Ultrasnap og Supersnap?

Gir Cleantrace utslag uten ATP

xOne-Sample T: Cleantrace 0 ATP

Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace 0 ATP	3	36,77	7,33	4,23	24,41	8,69	0,006

Er det forskjeller mellom Cleantrace, Ultrasnap og Supersnap ved forskjellige mengder ATP?

Tukey Pairwise Comparisons (10 femtomol)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C4	N	Mean	Grouping
Cleantrace	3	128,6	A
Supersnap	3	47,8	A B
Ultrasnap	3	12,77	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons (100 femtomol)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C4	N	Mean	Grouping
Cleantrace	3	1020	A
Ultrasnap	3	302	A
Supersnap	3	287,3	A

Tukey Pairwise Comparisons (1000 femtomol)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C4	N	Mean	Grouping
Cleantrace	3	8943	A
Supersnap	3	3780	A
Ultrasnap	3	1386	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons (10000 femtomol)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C4	N	Mean	Grouping
Cleantrace	3	80891	A
Supersnap	3	7929,7	B
Ultrasnap	3	6906	B

Means that do not share a letter are significantly different.

I oppgave: forskjell, men Hygiene har maksverdi 9999.

Hvilke svabertester påvirkes mest av natriumklorid?

Er testene påvirket ved 0,9 % natriumklorid?

One-Sample T: 3M; Ultra; Super

Test of $\mu = 0$ vs > 0 Test of $\mu =$
 0 vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace 3	24.60	8.01	4.62		11.10	5.32	0.017
Ultrasnap 3	7.45	12.11	6.99		-12.98	1.06	0.199
Supersnap 3	13.07	17.08	9.86		-15.72	1.33	0.158

Er testene påvirket av 4,5 % natriumklorid?

One-Sample T: 3M; Ultra; SuperTest of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace3	57,92	7,16	4,13		45,86	14,02	0,003
Ultrasnap 3	49,95	8,66	5,00		35,36	9,99	0,005
Supersnap 3	28,76	14,30	8,25		4,66	3,48	0,037

Påvirkes testene i ulik grad av natriumklorid?

Tukey Pairwise Comparisons 0,9% NaCl

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C4	N	Mean	Grouping
Cleantrace	3	24,60	A
Supersnap	3	13,07	A
Ultrasnap	3	7,45	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons 4,5 % NaCl

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

3m/U/S	N	Mean	Grouping
Cleantrace	3	57.92	A
Ultrasnap	3	49.95	A B
Supersnap	3	28.76	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons 9 % NaCl

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C4	N	Mean	Grouping
Cleantrace	3	74,04	A
Ultrasnap	3	73,273	A
Supersnap	3	54,44	B

Tukey Pairwise Comparisons 13,5 % NaCl

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C13	N	Mean	Grouping
Ultrasnap	3	86,79	A
Cleantrace	3	84,15	A
Supersnap	3	69,90	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons 18 % NaCl

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C13	N	Mean	Grouping
Ultrasnap	3	91,043	A
Cleantrace	3	88,590	A
Supersnap	3	76,02	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons 21,6 % NaCl

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C13	N	Mean	Grouping
Ultrasnap	3	93,890	A
Cleantrace	3	90,817	A
Supersnap	3	85,14	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Hvilke svabertester påvirkes av Alkalifoam?**One-Sample T: 5 %**Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	2	54,90	3,63	2,57	38,67	21,36	0,015
Ultrasnap	2	27,00	7,97	5,64	-8,58	4,79	0,066
Supersnap	1	11,42	*	*	*	*	*

One-Sample T: 1 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	7,1	19,6	11,3	-25,9	0,63	0,296
Ultrasnap	3	1,23	10,90	6,29	-17,14	0,19	0,432
Supersnap	2	6,55	3,25	2,29	-7,94	2,86	0,107

One-Sample T: 0,1 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	15,3	19,2	11,1	-17,1	1,38	0,151
Ultrasnap	3	6,45	12,91	7,45	-15,31	0,87	0,239
Supersnap	2	31,5	28,4	20,1	-95,2	1,57	0,181

One-Sample T: 0,01 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	-2,09	11,38	6,57	-21,28	-0,32	0,610
Ultrasnap	3	-6,80	14,35	8,29	-31,00	-0,82	0,751
Supersnap	2	-0,29	5,18	3,66	-23,42	-0,08	0,525

Hvilke svabertester påvirkes av ACO Hygiene DesQA?**One-Sample T: 3 %**Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	2	-6,70	11,04	7,80	-55,97	-0,86	0,726
Ultrasnap	2	-3,59	5,42	3,83	-27,77	-0,94	0,740
Supersnap	1	28,50	*	*	*	*	*

One-Sample T: 1 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	1,05	14,54	8,39	-23,46	0,12	0,456
Ultrasnap	3	4,4	17,6	10,1	-25,2	0,44	0,353
Supersnap	2	5,97	11,83	8,37	-46,84	0,71	0,303

One-Sample T: 0,1 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	44,33	6,84	3,95	32,80	11,23	0,004
Ultrasnap	3	32,3	23,2	13,4	-6,9	2,41	0,069
Supersnap	2	39,125	0,686	0,485	36,063	80,67	0,004

One-Sample T: 0,01 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	19,06	3,92	2,26	12,46	8,43	0,007
Ultrasnap	3	23,95	6,32	3,65	13,30	6,57	0,011
Supersnap	2	18,610	1,047	0,740	13,938	25,15	0,013

One-Sample T: 0,001 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	16,8	18,2	10,5	-13,9	1,60	0,126
Ultrasnap	3	3,30	16,11	9,30	-23,85	0,36	0,378
Supersnap	2	9,17	6,46	4,57	-19,68	2,01	0,147

Hvilke svabertester påvirkes av Diverfoam?**One-Sample T: 3 %**Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	2	24,38	4,88	3,45	2,60	7,07	0,045
Ultrasnap	2	14,0	40,1	28,3	-164,8	0,49	0,354
Supersnap	1	19,62	*	*	*	*	*

One-Sample T: 1,5 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	10,18	7,08	4,09	-1,76	2,49	0,065
Ultrasnap	3	24,8	25,1	14,5	-17,5	1,71	0,115
Supersnap	2	16,13	3,61	2,55	0,03	6,33	0,050

One-Sample T: 0,15 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	35,72	11,35	6,55	16,58	5,45	0,016
Ultrasnap	3	22,8	21,9	12,6	-14,1	1,80	0,107
Supersnap	2	26,74	9,55	6,75	-15,88	3,96	0,079

One-Sample T: 0,015 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	22,45	11,86	6,85	2,46	3,28	0,041
Ultrasnap	3	18,44	9,73	5,62	2,03	3,28	0,041
Supersnap	2	13,66	4,12	2,91	-4,74	4,69	0,067

One-Sample T: 3M; 0,0015 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	3	8,33	10,15	5,86	-8,78	1,42	0,146
Ultrasnap	3	4,96	6,47	3,73	-5,95	1,33	0,158
Supersnap	2	-5,620	0,735	0,520	-8,903	-10,81	0,971

One-Sample T: 0,00015 %Test of $\mu = 0$ vs > 0

Variable	N	Mean	StDev	SE Mean	95% Lower Bound	T	P
Cleantrace	2	11,95	5,82	4,11	-14,04	2,90	0,106
Ultrasnap	2	15,0	29,5	20,8	-116,5	0,72	0,302

Hvilke bakterier har påvirket ATP-innhold i laksebuljong?

Forskjell ATP i laksebuljong dag 0 og 18 timer

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
MF05534	4	28374	A
MF04122	4	26465	A
MF03971	4	25260	A
MF04099	4	24895	A
MF05905	4	22633	A
MF05869	4	21573	A
MF3858	4	21563	A
Buljong 0 dager	3	21293	A
MF05903	4	21220	A
MF05860	4	20379	A
MF3949	4	20143	A
MF3940	4	19915	A
MF3939	4	19788	A
MF3860	4	17278	A
MF5259	4	17030	A
MF05944	3	15413	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Forskjeller ATP etter 5 dager med ulike bakterier i laksebuljong

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF05869

Two-sample T for buljong vs MF05869

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF05869	3	4533	5341	3083

Difference = μ (buljong) - μ (MF05869)

Estimate for difference: 16760

95% CI for difference: (3367; 30153)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 5,38 P-Value = 0,033 DF = 2**Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF05944**

Two-sample T for buljong vs MF05944

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF05944	3	20867	27395	15817

Difference = μ (buljong) - μ (MF05944)

Estimate for difference: 427

95% CI for difference: (-67652; 68505)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 0,03 P-Value = 0,981 DF = 2

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF05903

Two-sample T for buljong vs MF05903

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF05903	3	40767	4167	2406

Difference = μ (buljong) - μ (MF05903)

Estimate for difference: -19473

95% CI for difference: (-29985; -8961)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -7,97 P-Value = 0,015 DF = 2**Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF05534**

Two-sample T for buljong vs MF05534

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF05534	3	60833	25100	14492

Difference = μ (buljong) - μ (MF05534)

Estimate for difference: -39540

95% CI for difference: (-101919; 22839)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -2,73 P-Value = 0,112 DF = 2**Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF04122**

Two-sample T for buljong vs MF04122

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF04122	3	83800	27330	15779

Difference = μ (buljong) - μ (MF04122)

Estimate for difference: -62507

95% CI for difference: (-130422; 5409)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -3,96 P-Value = 0,058 DF = 2**Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF04099**

Two-sample T for buljong vs MF04099

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF04099	3	101733	22684	13097

Difference = μ (buljong) - μ (MF04099)

Estimate for difference: -80440

95% CI for difference: (-136820; -24060)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -6,14 P-Value = 0,026 DF = 2**Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF03971**

Two-sample T for buljong vs MF03971

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF03971	3	85467	33150	19139

Difference = μ (buljong) - μ (MF03971)

Estimate for difference: -64173

95% CI for difference: (-146542; 18195)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -3,35 P-Value = 0,079 DF = 2

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF05860

Two-sample T for buljong vs MF05860

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF05860	3	41000	16253	9384

Difference = μ (buljong) - μ (MF05860)
 Estimate for difference: -19707
 95% CI for difference: (-60123; 20710)
 T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -2,10 P-Value = 0,171 DF = 2

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF05905

Two-sample T for buljong vs MF05905

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF05905	3	80250	20594	11890

Difference = μ (buljong) - μ (MF05905)
 Estimate for difference: -58957
 95% CI for difference: (-110149; -7765)
 T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -4,96 P-Value = 0,038 DF = 2

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF5259

Two-sample T for buljong vs MF5259

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF5259	3	1100	529	306

Difference = μ (buljong) - μ (MF5259)
 Estimate for difference: 20193
 95% CI for difference: (18525; 21861)
 T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 38,53 P-Value = 0,000 DF = 3

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF3949

Two-sample T for buljong vs MF3949

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF3949	3	1867	416	240

Difference = μ (buljong) - μ (MF3949)
 Estimate for difference: 19427
 95% CI for difference: (17870; 20983)
 T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 39,73 P-Value = 0,000 DF = 3

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF3858

Two-sample T for buljong vs MF3858

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF3858	3	1333	306	176

Difference = μ (buljong) - μ (MF3858)
 Estimate for difference: 19960
 95% CI for difference: (17977; 21943)
 T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 43,30 P-Value = 0,001 DF = 2

Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF3939

Two-sample T for buljong vs MF3939

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF3939	3	967	321	186

Difference = μ (buljong) - μ (MF3939)

Estimate for difference: 20327

95% CI for difference: (18328; 22325)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 43,76 P-Value = 0,001 DF = 2**Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF3860**

Two-sample T for buljong vs MF3860

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF3860	3	1300	700	404

Difference = μ (buljong) - μ (MF3860)

Estimate for difference: 19993

95% CI for difference: (18125; 21862)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 34,05 P-Value = 0,000 DF = 3**Two-Sample T-Test and CI: buljong; MF3940**

Two-sample T for buljong vs MF3940

	N	Mean	StDev	SE Mean
buljong	3	21293	738	426
MF3940	3	1800	700	404

Difference = μ (buljong) - μ (MF3940)

Estimate for difference: 19493

95% CI for difference: (17625; 21362)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 33,20 P-Value = 0,000 DF = 3

Hvilke faktorer påvirker festing av bakterier i overflater?

Festing av bakterier ved ulik smuss/temperatur/materiale/inkubasjonstid

ANOVA: Log kde versus Blod (1)/Mus, Plast (1)/St, Temperatur, Tid, Gjentak

Factor	Type	Levels	Values
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann	fixed	4	1, 2, 3, 4
Plast (1)/Stål (2)	fixed	2	1, 2
Temperatur	fixed	2	7, 12
Tid	fixed	2	2, 24
Gjentak	fixed	3	1, 2, 3

Analysis of Variance for Log

Source	DF	SS	MS	F	P
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann	3	40.4757	13.4919	83.41	0.000
Plast (1)/Stål (2)	1	10.3726	10.3726	64.12	0.000
Temperatur	1	1.4100	1.4100	8.72	0.004
Tid	1	11.9480	11.9480	73.86	0.000
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann* Plast (1)/Stål (2)	3	2.4115	0.8038	4.97	0.004
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann* Temperatur	3	0.1201	0.0400	0.25	0.863
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann*Tid	3	0.9058	0.3019	1.87	0.145
Plast (1)/Stål (2)*Temperatur	1	0.1414	0.1414	0.87	0.353
Plast (1)/Stål (2)*Tid	1	0.0578	0.0578	0.36	0.552
Temperatur*Tid	1	0.4223	0.4223	2.61	0.111
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann* Plast (1)/Stål (2)*Temperatur	3	0.0649	0.0216	0.13	0.940
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann* Plast (1)/Stål (2)*Tid	3	0.6936	0.2312	1.43	0.243
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann* Temperatur*Tid	3	1.0204	0.3401	2.10	0.109
Plast (1)/Stål (2)*Temperatur*Tid	1	0.0050	0.0050	0.03	0.862
Blod (1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann* Plast (1)/Stål (2)*Temperatur*Tid	3	0.1811	0.0604	0.37	0.773
Gjentak	2	8.8460	4.4230	27.34	0.000
Error	62	10.0292	0.1618		
Total	95	89.1055			

S = 0.402195 R-Sq = 88.74% R-Sq(adj) = 82.75%

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Blod	(1)/Muskel(2)/Fett(3)/vann	N	Mean	Grouping
3		24	4.986	A
2		24	4.800	A
1		24	3.623	B
4		24	3.579	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Plast	(1)/Stål	(2)	N	Mean	Grouping
2			48	4.576	A
1			48	3.918	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Temperatur	N	Mean	Grouping
12	48	4.368	A
7	48	4.126	A

Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Tid	N	Mean	Grouping
24	48	4.600	A
2	48	3.894	B

Means that do not share a letter are significantly different.

ATP i bakterier sultet i 2 døgn

Er det forskjell mellom gram-negative og gram-positive bakterier?

Two-Sample T-Test and CI: logcfu/mill RLU_1, C54

Two-sample T for logcfu/mill RLU_1

C54	N	Mean	StDev	SE Mean
1	27	3.214	0.726	0.14
2	18	1.211	0.239	0.056

Difference = μ (1) - μ (2)

Estimate for difference: 2.003

95% CI for difference: (1.696, 2.309)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 13.29 P-Value = 0.000 DF = 33

MTB > TwoT 'logcfu/mill RLU_2' C57;

SUBC> Confidence 95.0;

SUBC> Test 0.0;

SUBC> Alternative 0.

Reduksjon i RLU med røykaroma og H-oil

Er det forskjell i målt ATP mellom prøvene med Ultrasnap?

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Vann (2)/RA (3)	/ra-1 (4)	/H-oil (5)	N	Mean	Grouping
2	2	667.0	A		
5	2	600.0	A		
4	3	126.0	B		
3	2	1.000	C		

Means that do not share a letter are significantly different.

Er det forskjell i målt ATP mellom prøvene med Cleantrace?

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

vann/RA/ra-1/H-oil_	N	Mean	Grouping
5	3	4716	A
2	3	4700	A
4	3	1922	B
3	3	228.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Er det forskjellig antall bakterier på kupong og i suspensjon for ulike typer smuss?**Two-Sample T-Test and CI: Log cfu blod, Dråpe (1)/kupong (2)**Two-sample T for Log cfu **blod**

Dråpe

(1)/kupong

(2)	N	Mean	StDev	SE Mean
1	8	7.70	1.44	0.51
2	12	5.588	0.701	0.20

Difference = μ (1) - μ (2)

Estimate for difference: 2.112

95% CI for difference: (0.871, 3.352)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 3.85 P-Value = 0.004 DF = 9**Two-Sample T-Test and CI: Vann, Dråpe (1)/kupong (2)**Two-sample T for **Vann**

Dråpe

(1)/kupong

(2)_1	N	Mean	StDev	SE Mean
1	8	7.512	0.406	0.14
2	12	4.344	0.596	0.17

Difference = μ (1) - μ (2)

Estimate for difference: 3.168

95% CI for difference: (2.696, 3.641)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = 14.15 P-Value = 0.000 DF = 17**Two-Sample T-Test and CI: Muskel, Dråpe (1)/kupong (2)**Two-sample T for **Muskel**

Dråpe

(1)/kupong

(2)_2	N	Mean	StDev	SE Mean
1	12	4.25	1.49	0.43
2	12	5.985	0.381	0.11

Difference = μ (1) - μ (2)

Estimate for difference: -1.734

95% CI for difference: (-2.704, -0.764)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -3.90 P-Value = 0.002 DF = 12**Two-Sample T-Test and CI: Fett, Dråpe (1)/kupong (2)**Two-sample T for **Fett**

Dråpe

(1)/kupong

(2)_3	N	Mean	StDev	SE Mean
1	12	4.793	0.593	0.17
2	11	6.137	0.337	0.10

Difference = μ (1) - μ (2)

Estimate for difference: -1.345

95% CI for difference: (-1.765, -0.924)

T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -6.75 P-Value = 0.000 DF = 17