



Euroopa Maaelu Arengu
Põllumajandusfond:
Euroopa investeringud
maapiirkondadesse

Mikrobioloogilised ohud toiduainetööstuses Biokile

Epp Songisepp, PhD

OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus

Biokile / katt /bakteriaalne saastelima biokirme...

- Limakihiga ümbritsetud mikroorganismide kooslus, mis tekib piirpindadele (*vesi vs tahke, õli vs tahke, õli vs vesi...*)

85...96% biokilest koosneb veest, kuivadel pindadel ca 2...5%

- Biokile vs planktoonilised rakud,
- Boikile: mikroobi ellujäämise strateegia, stabiilsem elukeskkond kui vabalt ujuval üksikul mikroobirakul

- Biokile fosiilid: 3,2 miljardit aastat tagasi
- Enamik mikroorganisme elab keskkonnas biokilede koosseisus (*k.a. n. veealused vulkaanilised lõõrid*)
- Biokilet moodustavad nii patogeenid kui saprofüüdid
- Biokile võib koosneda erinevatest mikroobiliikidest.
- Faagid suudava biokiles eksisteerida koos bakteritega!

Biokile inimese vaatepunktist

Elu-olu vaatepunktist tüütu /potentsiaalselt ohtlik

Tervise vaatepunktist kahjulik, infektsiooni allikas

- hambakatt (*Anton van Leeuwenhoek "animalculi"*)
- tekib kõikidele niisketele kehapiindadele
 - tampoonid vs toksilise šoki sündroom
- haiglainfektsioonide põhjus: patogeenide kinnitumine kateetritele jm implantaatidele

Tööstuse vaatepunktist

Kasulik: teatud toidutoodete valmistamisel oluline
annab maitset, soodustav proteolüüsi (n. Limburger)

Kahjulik:

- Mõjutab negatiivselt torustiku tehnilisi näitajaid, ummistused
- Põhjustab süsteemide kulumist ja riknemist saastab terve tootmisliini
- Negatiivne mõju toidutoote kvaliteedile :
- Potentsiaalne oht pakkematerjalil /toidus: toidumürgituse puhangud sageli seotud biokilega

Kõik tuntumad toidupatogeenid oskavad biokilet moodustada:

Bacillus cereus,
Staphylococcus aureus,
L. monocytogenes,
Mycobacterium paratuberculosis,
Clostridium perfringens,
Escherichia coli O157:H7,
Salmonella Typhimurium,
Campylobacter jejuni,
Yersinia enterocolitica

Biokile areng

(1) Planktooniliste rakkude esmane, pöörduv kinnitumine (rakud log – faasis, nihkepinge, Van der Waalsi jõudude ületamine):

kestab sekundeid

(2) pöördumatu kinnitumine : kestab minuteid

(3) küpsemine I, (mikrokolooniade moodustumine) :

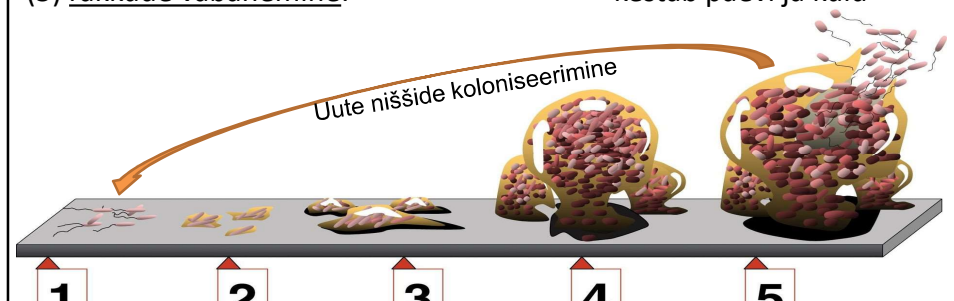
kestab tunde/päevi

(4) küpsemine II (struktuuride moodustumine ja kanalid toitainete liikumiseks) :

kestab tunde/päevi

(5) rakkude vabanemine:

kestab päevi ja kuid



Biokile küpsemise (3) faasis muutub 40% pinnavalkudest + limakapsli teke (EPS geenide aktivatsioon)+ DNA vahetus koloonias leiduvate mikroobide vahel = resistentsuse tugevnemine stressile ja biotsiididele

Quorum sensing ehk hulgatunnetus: signaal kinnitumiseks tugevneb, metabolismi koordineerimine koloonias olevate mikroobirakkude vahel, käitub nagu hulkrakne organism keerukam kohastumislik stressivastus

Kui palju mikroobe võib olla biokiles?

„kohev, heas toonuses“ mitmekihiline biokile: 10^8 cfu/cm²

keskmine: 10^1 - 10^5 cfu/cm²

Kas biokile maatriks on alati sama koostisega?

Ei

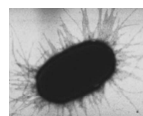
Isegi sama mikroobiliik ehitab biokile üles erinevalt, sõltuvalt olemasolevast „materjalist“ ja tingimustest

Biokile moodustumist mõjutavad faktorid 1

- Adhesioon: rakkude seostumine pinnaretseptorite kaudu teiste rakkude või maatriksiga

– fimbriad

– adhesiinid (*virulentsufaktor*)



- *ica* operon, 5 geeni : geeniklaster mis kodeerib rakkudevahelist polüsahhariidset adhesiini (PIA): seostumine nii orgaanikale kui n klaasile

- Agregatsioon

– aggr+ geenid

E. coli



Biokile moodustumist mõjutavad faktorid 2

Keskkond: oluline faktor biokile tekkeks muutused keskkonnas (pH, osmolaarsuse tõus, pinnakeemia) mõjutavad mikroobi ainevahetust ja pinnastruktuure, aktiveerivad geene

Temperatuur: mõjutab mikroobiraku pinna struktuure
C. jejuni: elujõulisem biokiles 12° ja 23...32°C juures

Biokile moodustumist mõjutavad faktorid 2

Materjal:

Pinna füüsikalised-keemilised omadused,

- pinnalaeng,
- Hüdrofoobsus : *Salmonella* ja *Listeria* eelistavad hüdrofoobsemat (teflon)
- kare pind vs sile pind (NB! vuugid, keermed, keevituskohad, nurgad, kriimud)

meeldivad pinnad on plastik, klaas, metall, puit, toit

Aeg n. *Campylobacter* suudab biokile moodustada 2 päevaga

Biokile moodustumist mõjutavad faktorid 3

Kombinatsioon eelmistest:

n. *Listeria* eelistus klaaspinna suhtes +4°, 12° ja 22°C juures
teras ja klaas +37°C juures:
Happe-resistentne *E coli* nakkub meelsasti terase külge

Toitained ümbritsevas keskkonnas:

Salmonella eelistab toitaineterikast keskkonda,
listeria toitainetevaest

Staph moodustab biokile paremini soola ja suhkru juureolekul

suhkrute metabolism kindlasti biokile tekkega

Orgaanilised osakesed pinnal soodustavad biokile teket

Halvast ühendatud tootmisliinid+ vilets hügieen

Biokile moodustumist mõjutavad faktorid 4

Erinevad mikroobiliigid erineva biokile moodustamise võimega

- *Listeria monocytogenes* tööstuses persisteerivad tüved moodustavad väga vastupidava biokile. Seega biokile listeria ellujäämiseks oluline!
- *Gram – (Pseudomonas , Aeromonas)* soodustavad listeria jt adhesiooni, biokile teket ja resistentsust desinfektantidele
- *Salmonella agona / S. montevideo tugevad, S typhimurium* nõrgem biokile moodustaja

Biokile moodustumist mõjutavad faktorid 4

Erinevad patogeenide serotüübid erineva võimega moodustada biokilet (karvakeste arv erinev)

- *Salmonella enterica* serovar Tennessee, Thompson, Braenderup, Negev, Newport
- *Listeria monocytogenes* erinevate tüved Scott A, 3990, YM96, 303, 17
- Erinevat päritolu tüvede võime biokilet tekitada? –nii ja -naa

Tööstusepõhised biokile moodustajad

Levinud igas tööstuses:

Enerobakterid, listeeria, pseudomonas
Bacillus spp.

Tööstusepõhiseid spetsiifilisi „tegijaid“

Kala/mereannitööstus: *Vibrio spp*, *Aeromonas spp*,
Linnuliha: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*
Vaakumpakendatud lihatooted: LAB (*L. sakei*,
Leuconostoc gelidum)

Biokile: raske eemaldada,
vastupidav vesikeskkonnas,
ei karda UV, kuivamist, desinfektante

Biotsiidid biokile vastu 1

Naatriumhüpokloriid (NaClO):

- Puhasti ja desoaine ühes isikus
- Antimikroobne toime tõhusam madalate pH väärtustel
- Tõhusus põhineb hüpokloorishappel (HOCl) mis laguneb klooriks ja hapnikuks
$$\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{NaOH}$$
- *Staph. aureus*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus miros*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum* ja *E. faecalis*
- *L. monocytogenes*: madal toime
- Tekitab lenduvaid ühendeid (VOC) , kartsinogeen

Klooriühendid/ kloordioksiid:

Reklaam (Dutrion):

Kloordioksiid tungib sügavale biokile sisse, reageerimata polüsahhariididega, ning lõhustab mikroorganismide rakud.

Biokilest vabanemine kloordioksiidi abil kestab tavaliselt 7–12 päeva.

Biotsiidid biokile vastu 2

Kvaternaarsed ammooniumiühendid (QAC) ,

- membraan-aktiivsed antimikroobsed ühendid
- Mõju nii gram+ kui gram- vastu
- Toime tugevus sõltub konkreetsest molekulist ja selle alküülrühma pikkusest
- Toime tugevus suureneb temperatuuri ja pH tõustes („kuum ja aluseline“)

N: Cocoalkylmethyl [polyoxyethylene (15)] ammonium chloride (AKZONobel, Amsterdam)

Peroksüaadikhape PAA, (CH₃CO₃H)

- Tekib: äädikhappe ja H₂O₂ reaktsioonil või atsetaldehyüdi oksüdeerumisel
- Ohutus: laguneb tagasi äädikhappeks ja H₂O₂
- Happeline tugev oksüdant, saadaval 5 ja 15%.
- *L. monocytogenes* hävib biokiles ka orgaaniliste jääkide juuresolekul
- *S. aureus* ja *P. aeruginosa*,



Biotsiidid biokile vastu 3

Vesinikperoksiid (H₂O₂):

- Toime: agressiivne vabade radikaalite tekitaja
- Valdavalt ohutu, ei mõjuta toote kvaliteeti
- Kasutusel kalatööstuse *Vibrio* spp vastu
- 5% 15 min . Mõju olemas 0.05% (500 mg/l)

Osoon

- Osoneeritud veega biokile hävitamine
- Ohutu, tõhus ja kiire: lõhub rakukesta (mikroobirakud lüüsuvad), ei pea sisenema mikroobirakku

Biotsiidid biokile vastu 4

Ensüümid

- Valgulised ühendid (amülaasid, proteaasid, depolümeraasid...)
- Vähetõhus: biokile heterogeense koostisega, erinevad mikoobiliigid tundlikud erinevate ensüümide suhtes, biokile vanusest sõltuvad erinevused = eeldab mitme aine /ensüümi kombineeritud toimet

Ultrasonikatsioon

- Heli (>20 kHz) kasutamine osakeste eemaldamiseks pindadelt
- Lõhub rakumembraane
- Ultraheli aktiveerib mikroobirakke, soodustades O₂ sissepääsu biokillesse
- Meetod sobib kombineerituna antimikroobsete ainetega k.a. osoon

Bakteriofaagid

- GMO, kandmas EPS lagundavaid ensüüme kodeerivaid depolümeraasigene
- Väidetav tõhususe %: **99,997% !!**

Biotsiidid biokile vastu 5

Kombineeritud tehnoloogiad = sünergistiline toime

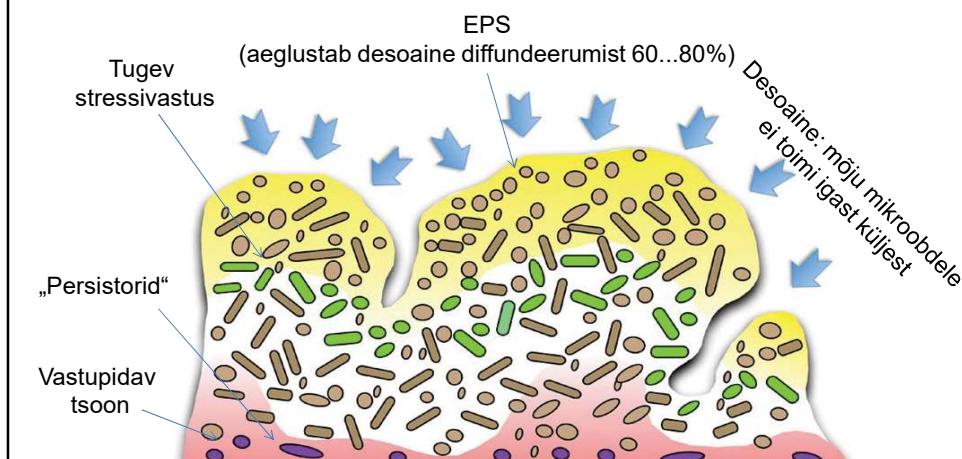
- NaClO + UV
- NaClO +H₂O₂
- Ultraheli+O₃
- Faag+AB
- PAA +H₂O₂
-

CIP: väikesed mahud, madal t^o, ensümaatiline puhastus + leelis

Clean-in-place (CIP): tsirkulatsioon ja pihustusmeetod, seadmete, torustike jm pesu ilma lahti monteerimata, pesu automatiseeritud.

Pesusõlm ettevõttes

Tõhusust mõjutavad mitmed tegurid (biokile olemus, t°, desoaine ja selle voolukiirus, kontaktaeg, sagedus...)



Mehaaniline pesu kõrgematel temperatuuridel

1. nõuab nühkimiseks vähem füüsilist jõudu
2. vigastab biokiles olevaid mikroobirakke

NB! Ainult biokile lõhkumine

- vabastab 90% mikroobidest,
- viib need planktoonilisse vormi ja
- võimaldab uue biokile tekke mujal

Olemasoleva biokile mehaaniline lõhkumine tagab biotsiidile/desoainele ligipääsu biokile sügavamatsesse kihtidesse

Desoaine kontaktaeg!

Igasugused desoained/biotsiidid kogustes, mis mõjuvad planktoonilises vormis mikroobile surmavalt, vajavad sama liigi arvukuse vähendamiseks biokiles 100 ...>1000x doose ja oluliselt pikemat mõjuaega

Tõhusus madalam, ellujääjad tugevamad
Orgaaniliste osakeste (rasv, suhkrud, valk) esinemine pindadel vähendab desoaine mõju

NB!

Eelnevale stressile allutatud mikroobirakud on täiendavale stressile vastupidavamad

Subletaalne temperatuur, desoaine alakontsentratsioonid...

Tulemuseks on ettevõttespetsiifilised tüved

Biokile ebatõhus keemiline mõjutamine → uus ja „parem“ biokile

Puhastamise põhiprintsiibid

1. Pea silmas puhastatava seadme ehituslikke eripärasid, puhastatava pinna iseärasusi
2. Hinda „vaenlast“ : biokile olemus
3. Vali vastav desoaine
4. Loo tõhus kontakt desoaine ja puhastatava pinna vahel, pidades silmas
 1. temperatuuri,
 2. voolujoa tugevust,
 3. desoaine õige kontsentratsiooni,
 4. mõjutusaega

NB! Liiga märg pind lahjendab desoainet!
5. Põhjalik loputus
6. Vii puhastus alati läbi võimalikult kiiresti pärast tootmise lõpetamist
7. Puhasta-desinfitseeri seade peale pikemat seismist ja enne uueti kasutamist



"Stay back, you guys! This stuff has killed 99.99% of our fellow germs!"