



Euroopa Maaelu Arengu  
Põllumajandusfond  
Euroopa investeeringud  
maapiirkondadesse



# BIOKIRMED

Biokirmed toidutootmise keskkonnas

Toidukäitlemisruumide pinnad on soodne koht biokirmete tekkeks, mistõttu on teadmised biokirmete olemusest, olulisusest, ennetamisest ja hävitamisest toiduohutuse tagamisel eriti olulised

Mati Roasto

EMÜ Toiduhügieeni ja rahvatervise professor

## Rahastatud Euroopa Maaelu Arengu Põllumajandusfondist (EAFRD)



Euroopa Maaelu Arengu  
Põllumajandusfond:  
Euroopa investeringud  
maapiirkondadesse

Autor: Mati Roasto

Maaeluministeeriumi ning Põllumajanduse Registrate ja Informatsiooni Ameti (PRIA) tellimusel koostanud Eesti Maaülikooli toiduhügieeni ja rahvatervise õppetool.  
Varalised õigused kuuluvad materjali tellijale.  
Kõik autoriõigused on kaitstud.

ISBN 978-9916-669-14-3 (pdf)

Tartu, 2021

## SISSEJUHATUS

Mikroskoobi avastaja A. van Leeuwenhoek, kasutades oma algelist mikroskoopi, kirjeldas juba aastal 1684 oma uurimustöö tulemusi järgmise lausega "Uuringutele toetudes tegin järelduse, et äädikas, millega ma oma hambaid pesin, tappis üksnes neid "Loomi", mis paiknesid hammaste välimises kestas, kuid ei suutnud läbida kogu kesta" (Dobell, 1932). Tegemist on biokirme esmakordse dokumenteeritud kirjeldusega.

Biokirmete teooriat kirjeldas 1978. aastal esimest korda J. W. Costerton.

Tänaseks on teada, et biokirmeid esineb looduses kõikjal ning, et paljud mikroorganismid on võimelised kinnituma nii eluta kui elusatele pindadele, kleepuma üksteise külge ja moodustama polümeeridel põhineva kaitsekihi. Sobilike tingimuste olemasolul on enamik mikroorganismide võimelised moodustama biokirmeid, kusjuures mikroobide omadust moodustada biokirmit võib pidada nende ellujäämisstrateegiaks, mille abil nad optimeerivad vee ja toitainete kasutust. Biokirme näol on tegemist immobiliseeritud rakkude loodusliku vormiga, kusjuures ökosüsteemides võib biokirmeid leida praktiliselt kõikidel pindadel, kus on piisavalt mikroorganismide kasvuks vajalikku niiskust ja toitaineid (Kim ja Frank, 1995; Pometto ja Demirci, 2015).

### **Biokirme olemus ja teke**

Biokirme on bakterirakkude struktureeritud kooslus, kus bakterirakud on põimitud nende endi poolt toodetud polümeersete ainete maatriksisse (tekstis edaspidi EPS, *extracellular polymeric substances*) (Flemming ja Wingender, 2010). Biokirmit ümbritsev kaitsekiht ehk EPS-maatriks koosneb põhiliselt eksopolüsahhariididest, valkudest ja nukleiinhapetest (Agle, 2007). Biokirme teket ja arengut mõjutavad paljud tegurid, sealhulgas bakteritüvi, materjali pinna omadused ja keskkonnaparameetrid, nagu pH ja toitainete tase ning temperatuur (Donlan, 2002). Reeglina biokirme ei koosne ühest bakteriliigist, vaid on erinevate mikroobiliikide ja nende poolt toodetud ainete kooslus. Biokirme teket võib kirjeldada mikroorganismide kihtide tekkena pindadele, millele nad eelnevalt on kinnitunud. Mikroobide kinnitumist pindadele, mis on eeltingimuseks biokirme tekkele, soodustab vee, orgaanilise ja anorgaanilise mustuse ning kahjustunud pindade olemasolu. Bakterid on võimelised koloniseerima nii siledaid kui kareid pindasid. Samuti on teada, et biokirmed tekivad kiiremini hüdrofoobsetele mittepolaarsetele pindadele (nt plast) ja aeglasemalt hüdrofiilsetele pindadele (klaas või metall). Täielikult kuivadele pindadele biokirmed ei teki.

Biokirme teke on järkjärguline, mis tavapäraselt algab üksikute rakkude pindadele kinnitumisega ning nende poolt rakuväliste polümeersete ainete, nt eksopolüsahhariidide, tootmisega. Seda nimetatakse biokirme tekke esimeseks faasiks ning see on pöörduv, st bakterid on tavapärase sanitatsiooniga veel pindadelt kergesti eemaldatavad ja hävitatavad.

Biokirme arenedes tekib aga juurde üha uusi bakterite mikrokolooniaid, biokirme maatriksisse tekivad veekanalid ja muutub bakterirakkude füsioloogia ning geeniekspressioon. Ka selles faasis on pindade nõuetekohase puhastamisega võimalik bakterirakke veel edukalt eemaldada, kuid biokirme edasise arengu võimaldamisel tekivad biokirmes dipool-dipool, vesinik-, ioon- ja kovalentsed sidemed; toimub rakkude tugev kinnitumine pinnale, mistõttu on bakterirakkude pindadelt eemaldamine oluliselt raskendatud ning eeldab toidukäitlemise ettevõtetes süvapuhasmeetodite rakendamist (Watnick ja Kolter, 2000). Välja kujunenud biokirme on viskooselastne, kummitaoline ning ilma mehaanilise energia rakendamiseta väga raskesti pindadelt eemaldatav (Donlan ja Costerton, 2002). Terviklikus biokirmes on mikroobirakud tugevalt seondunud EPS maatriksisse, mis aitab hoida biokirmit n.ö. ühes tükis ning kinnituda pinnale. EPS tagab ka biokirme suurema vastupidavuse selle eemaldamise ja hävitamise

toimingute suhtes, k.a. biokirme mikroobide suurema vastupanuvõime antimikroobsete ainete suhtes.

### **Väljakutsed toidu tootmisel**

Kaasaegne toiduainetööstus on sobiv keskkond biokirmete tekkeks, seda eelkõige ettevõtete kompleksuse, pikkade tootmisperioodide, masstoodangu ja toiduga kokkupuutuvate pindade suure pindala tõttu (Lindsay ja Holy, 2006).

Biokirmed on toidukäitlemise ettevõtetele tõsiseks väljakutseks, sest võimaldavad mikroobidel (eriti bakteritel) seostuda erineva koostisega pindadele, nt kumm, polüpropüleen, klaas, roostevaba teras. Bakterite pindadele kinnitumisele järgneb biokirme välja kujunemine, mis sõltuvalt ettevõtte tootmiskeskonna tingimustest võtab aega vaid mõni tund kuni mõni päev (Hall-Stoodley jt. 2004).

Biokirmeid võivad moodustada nii patogeensed kui ka toidu riknemist põhjustavad mikroorganismid; nii spore moodustavad kui ka vegetatiivsed rakud. Biokirmete olulisus toiduainetööstusele on suurem toitude puhul, mille puhul võib ristsaastumise kaudu aset leida toidu saastumine patogeenidega, sealhulgas *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus* ja *Echerichia coli* O157: H7 (Anand jt., 2014).

Toidukäitlemise ettevõtetes võivad biokirmed põhjustada mikroobide suuremat vastupanuvõimet tootmiskeskonnast tulenevate stressorite suhtes, nt pesukemikaalide ja desinfitseerimisainete suhtes, põhjustada töötlemisjärgset toidu saastumist, seeläbi toidutekkelisi haiguspuhanguid (Costerton, 1995; Kumar ja Anand, 1998).

Mitmed uuringud on leidnud, et mikroorganismide väiksem tundlikkus puhastusainete suhtes oli tingitud sellest, et nende mikroorganismide poolt toodetud eksopolüsahhariididest, valkudest ja nukleiinhapetest koosnev kest võimaldab kaitset pesu- ja desinfitseerimise kemikaalide toime(te) suhtes. Antud kest toimib mitte ainult biokirmit koos hoidva „liimina“, vaid ka kaitsva kattena, mis piirab toitainete ja/või antimikroobsete ainete difusiooni biokirme struktuuri kinnitunud bakterirakkudesse.

Arvatakse, et koguni 80% bakteriaalsetest toiduinfektsioonidest inimestel on tingitud biokirmete kaudu levivatest toidupatogeenidest (Srey jt., 2013). Wirtanen jt. (2003) leidsid, et toidu riknemist põhjustavad *Pseudomonas* spp. bakterid olid biokirme olemasolul märkimisväärselt vastupidavamad kloorilahusega töötlemisele ning tavapärasest suurem kloori kontsentratsioon (2,0 mg/l) ei hävitanud biokirmes elutsevat *Escherichia coli*'t. Samuti leiti, et biokirmed ei põhjusta probleeme mitte üksnes toiduainetööstuse hügieeniga seonduvalt, vaid torustikes tekkinuna põhjustavad nad ummistusi ja energiakadusid kondensaatorites, veeringlussüsteemides ja tööstusseadmete jahutussüsteemides (Wirtanen et al., 2003).

Biokirmes elutsevaid bakterirakke iseloomustab ka muutunud fenotüüp ja geeniekspressioon, mis võimaldab biokirme moodustanud mikroobirakkudel toota erinevaid aineid, mis EPS-i koostises võimaldavad omakorda tõsta nende vastupidavust (toidutootmis)keskkonnast tulenevate stressorite suhtes.

Oluliseks tuleb pidada fakti, et biokirme arengu viimases etapis on mikroobirakud võimelised biokirmest kergesti eralduma ja levima, mistõttu kujutab biokirme ettevõtetele patogeenide potentsiaalset püsisaasteallikat (Reis-Teixeira jt., 2017). Eraldunud biokirme osade, k.a. seonduvate patogeenide ja toiduriknemist põhjustavate mikroorganismide, levitajateks on eelkõige töötajad (nt nende jalanõud või tööriistad), liikuvad töövahendid, nt transportkärude rattad, transportööriidid jms.

Lisaks bakterite perekonnale ja liikidele mängivad biokirmete tekkes olulist rolli ka välised tegurid, nt toiduga kokkupuutuvate pindade materjalid, mis omavad suurt mõju nii bakterite kinnitumisele kui ka biokirme moodustumisele. Toiduga kokkupuutuvate pindade materjalid on eelkõige roostevaba teras, klaas, kumm, polüuretaan, teflon, nitriilbutüülkumm jt (Storgards

jt., 1999; Chia jt., 2009). On tõestatud, et *Salmonella* spp. ja *L. monocytogenes* võivad toidutööstuse plastpindadel toota biokirmeid (Stepanovic jt., 2004).

Toiduainetööstuses on enim kasutatav toiduga kokkupuutuv materjal roostevaba teras (tüüp 304), kuna see on keemiliselt inertne, kergesti puhastatav ja väga korrosioonikindel. Samas arvestades selle pidevat kasutamist, näitab selle materjali topograafia sageli pragude ja kriimustuste esinemist, mis kaitsevad baktereid nii mehaaniliste puhastusmeetodite kui ka desinfitseerimiskemikaali bakteritsiidse toime eest. On leitud, et polüesteruretaanist konveierilindi pinnakaredus avaldas olulist mõju *L. monocytogenes*'e biokirme moodustamise võimele. Isegi nõrgad *Listeria* tüved näitasid biokirme moodustamise võimet ja neid ei saanud tavapärase sanitatsiooniga täielikult pindadelt kõrvaldada (Chaturongkasumrit jt., 2011). Pindade poleerimine võib mõjutada biokirmete moodustumise võimet, nt leiti uuringus (Arnold jt., 2004), et elektropoleeritud roostevaba terase külge oli kinnitatud oluliselt vähem bakterirakke võrreldes töötlemata roostevabast terasest pinnaga.

Enamasti on puidust materjalide kasutamine toidukäitlemisel keelatud v.a tehnoloogilisest protsessist tulenevalt mikroettevõttes toidu väikesemahulisel käitlemisel (maaeluministri 25.02.2021. a määrus nr. 21). Puidu kasutamise keeld on õigustatud, sest puidul on pinnamaterjalina suur poorsus ja imavus, mistõttu võib sinna kinni jääda nii orgaanilist materjali kui ka baktereid (Adetunji ja Isola, 2011). Viimane tähendab seda, et puidust pindasid on piisava hügieenitaseme saavutamiseks väga raske või praktiliselt võimatu puhastada.

Lisaks pinnamaterjalile võivad biokirme moodustumist mõjutada ka muud hügieeni mõjutavad elemendid, nt keevitused, liitekohad, nurgad ja seadme üldine disain (Guðbjörnsdóttir jt., 2005). Bakterite kinnitumist mõjutavad ka ettevõttes käideldava toidu maatriks, nt piima ja liha jäägid soodustavad *E. coli* ja *S. aureus*'st koosneva biokirme teket (Dutra jt., 2018). Samuti mikroobirakkude omadused, eriti hüdrofoobsus ja rakumembraani koostis (nt valgud ja lipopolüsahhariidid), rakuvälised kiud (nt pilid ja flagellad) ja bakterite poolt toodetav EPS mängivad samuti võtmerolli biokirmete tekkes (Tang jt., 2011). Biokirme koostises olevates mikroorganismides võivad toimuda geneetilised muutused, mis mõjutavad biokirmete arengut ning juhul kui need mikroorganismid satuvad uutele pindadele, siis toimub biokirme kiire teke (Wang jt., 2015). Biokirmete tekkes on mõned patogeenid toidu käitlemisel olulisemad kui teised ning nende olemus (perekind, liik, Gram-värvumine) võivad mõjutada ka pesu- ja desoainete valikut.

Tänaseks on piisavalt teaduslikke tõendeid, et biokirme on muutunud toiduainetööstuse oluliseks probleemiks, kuna see muudab selle bakterid resistentseks antimikroobsete ainete ja puhastamise suhtes (Srey jt., 2013).

### **Biokirmete tuvastamine**

Biokirmed saavad tekkida vaid pindadele, mis ei ole piisavalt kuivad ja puhtad. Pindade puhtust on võimalik kontrollida ka meeleorganite abil, nt hea valgustuse korral on võimalik määrdunud pindasid ära tunda visuaalselt. Samuti on võimalik lõhnatajuga ära tunda mustadest pindadest tingitud ebameeldivat haisu. Korrigeeriva tegevusena saab koheselt rakendada tootmisele eelnevat täiendavat koristamist. Tootmispindade mikrobioloogilise kontrolliga saab tuvastada koristamistoimingute vastamist ettevõtte mikrobioloogilistele puhtusstandarditele. Juhul kui pinnaproovide mikrobioloogilised analüüsid tuvastavad hügieeni standarditele mitte vastavate pindade olemasolu, tuleb analüüsida ebahügieenilise põhjuseid ning vajadusel teha sanitatsiooni toimingutes muudatusi (Holah jt., 2002).

Hügieeni hindamine toiduainetetööstuses põhineb eelkõige konventsionaalsetel mikrobioloogilistel meetoditel, kasutades tamponiproove ehk tamponiga proovivõtmisel põhinevat uhtemeetodit, erinevaid agar-kontaktpladimeetodeid või käsnameetodit. Sellised mikrobioloogilised proovivõtumeetodid sobivad hästi sanitatsiooni efektiivsuse regulaarseks hindamiseks. Meetodi valik sõltub uuritavast pinnast ning proovivõtu eesmärgist, nt

mikroobide üldarvude uurimiseks sobivad hästi tamponimeetod ning agar-kontaktplaadi meetod, kusjuures mõlemal juhul on vaja fikseerida uuritava pinna suurus. Patogeenide tuvastamiseks tasub pinnaproove võtta käsnameetodil. Viimast saab vajadusel kombineerida tamponimeetodiga.

Toidukäitlemise pindadelt biokirmete tuvastamiseks sobivad meetodid, mille puhul on võimalik rakendada mehhaanilist energiat ehk füüsilist survet uuritavale pinnale. Sellisteks meetoditeks on ATP-tamponimeetod, konventsionaalne tamponimeetod ning käsnameetod. Tegemist on tavapäraste pinnaproovide võtmise meetoditega, mis sobivad hästi ka olukordades, kus pindadele võivad olla tekkinud biokirmed. Nimetatud meetodid eeldavad proovivõtmisel pindade proovivõtuvahendiga hõõrumist, mistõttu enamikel juhtudel suudetakse lõhkuda biokirme EPS-maatriks ning jõuda biokirmes elutsevate mikroobideni. Tulemuseks on väga kõrged mikroobide arvud uuritava pinna kohta, kui mikroobide üldarvude määramisel kasutatakse tamponiproove, või uuritava patogeeni tuvastamine proovivõtupinnal, kui patogeenide tuvastamisel kasutatakse käsnaproove (Roasto, 2021).

Kui läheneda biokirmete uurimisele spetsiifilisemalt, siis nende uurimiseks on kasutatud nii mikrobioloogilisi, füüsikalisi, keemilisi kui ka mikroskoopimise meetodeid. Biokirme koosneb 85–96% ulatuses veest, mis tähendab, et vaid 2–5% biokirme üldmassist on avastatav kuival pinnal. Kindlasti ei sobi biokirmete tuvastamiseks agar-kontaktplaadimeetodid, sest need ei võimalda piisavat mehaanilist survet proovivõtmisel ehk EPS-katte lõhkumist ja mikroobideni jõudmist. Seega saab agar-kontaktplaadimeetodeid mikrobioloogilise puhtuse hindamiseks kasutada vaid pindadel, millel ei eeldata biokirmete esinemist.

Molekulaarmikrobioloogia kiire areng pakub uusi meetodeid, mille kasutamisel on tootmispindadelt võimalik tuvastada ka spetsiifilisi mikroorganisme, mis sageli võivad peituda biokirmetes. Kogu genoomi sekveneerimise meetod (WGS) suudab määrata mikroobitüvede geneetilist sarnasust. Sel põhjusel saab seda meetodit edukalt kasutada toidupatogeenide tüvede püsivuse uurimiseks toiduainetööstuses, nt. saasteallikate ja levikuteede kindlaks tegemisel ja tüvede püsivusega seotud molekulaarsete mehhanismide uurimisel (Colagiorgi jt., 2017; Mäesaar jt., 2021).

Uhtemeetodil (tamponimeetod) esile tulevate bakterite arv korreleerub suhteliselt hästi pinna tegeliku mikrobioloogilise puhtusega. Siiski saadakse ka antud meetodil pindadelt kätte vaid osa mikroobidest ning see sõltub suuresti uuritava pinna omadustest, nt materjalist ja pinna seisukorrast.

Mikroobide poolt moodustatud biokirme EPS-maatriksit saab tamponimeetodiga piisavalt lõhkuda ning seega määrata ka mikroobide ligikaudset kontsentratsiooni uuritaval pinnal, mis ligikaudu vastab ka tegelikkusele. Väikeste töövahendite, käänuliste kohtade ja ebatasaste pindade uurimiseks sobib tamponimeetod kindlasti kõige paremini. Tamponimeetodi tulemused olenevad väga palju proovivõtja oskustest ja kogemustest. Tamponi tuleb suruda pinnale jõuga  $0,1 \text{ kg/cm}^2$  ja tamponi ots tuleb asetada  $30^\circ$  nurga all testitavale pinnale. Tamponi hoitakse pöidla ja nimetissõrme vahel. Pinnalt proovi võttes tuleb tamponi keerutada nii, et kogu tampon puutuks vastu uuritavat pinda. Hõõruda tuleb aeglaselt, kuid kindlalt kolm korda üle uuritava pinna, muutes iga korra järel hõõrumisliigutuste suunda jne. Alginaadi- või sötetamponide (kõvemad tamponid) kasutamine võib vähendada proovivõtjast sõltuvaid vigu (Roasto, 2011). Kuigi eelnimetatud meetodid toovad pindadelt kaasa vaid ainult osa mikroobidest, on need mikroobid enamasti just sellised, mis kokkupuutel kanduksid tootele. Hoolimata arvukatest katsetest töötada välja usaldusväärseid kontrollmeetodeid toiduainetööstusele hügieenitaseme praktiliseks hindamiseks, pole see veel seni täiel määral õnnestunud. Konventsionaalset tamponiproovi protseduuri seadmete pinnalt proovi võtmiseks tuleks modifitseerida, nt saaks biokirme mikroobirakkude vabastamist parandada teatud keemiliste ühenditega, mis ei kahjusta bakterirakke ja mille toime on suunatud eeskätt biokirme maatriksi lõhustamisele. Soome teadusasutuses (*Technical Research Centre of Finland*, Espoo,

VTT) töötati välja pinna töötlemise juhend biokirmega kaetud roostevabast terasest pinnalt hügieeniproovide võtmiseks. Proovivõtukomplekti kuulus ka kemikaalide segu, mida kasutati tootmispindade töötlemiseks enne hügieeniproovide võtmist. Kemikaalisegu aitas lagundada biokirme EPS-maatriksit, mistõttu olid ka tampooniproovide mikrobioloogilised analüüsitulemused tegelikkusele rohkem vastavad (Wirtanen ja Salo, 2007).

Biokirme olemasolu kindlaks tegemiseks on kasutusel ka keemilised meetodid, mis põhinevad spetsiifiliste ühendite kontsentratsiooni määramisel. Adenosiintrifosfaadi ehk ATP (raku energiaallikas) kontsentratsiooni mõõtmine on võimalik luminescentsmeetodiga, mis põhineb lutsiferiin-lutsiferaas reaktsioonil. Biokirme ATP-sisaldus korreleerub biokirmes elutsevate bakterirakkude arvuga ja annab infot nende ainevahetuse aktiivsusest.

Mikroskoopimise tehnikad, nagu epifluorestsentsmikroskoopia, skaneeriv elektronmikroskoopia (SEM) ja transmissioonelektronmikroskoopia (TEM), on väga informatiivsed tööriistad biokirmete ja sanitatsiooni efektiivsuse teadusuuringuteks, kuid piiratud võimalustega tööstuslikes tingimustes kasutamiseks. Elektronmikroskoopiat on kasutatud biokirme struktuuri uurimisel (Wirtanen ja Salo, 2007).

### **Olulisemad biokirmeid moodustavad toidupatogeendid**

Järgnevalt on esitatud toiduainetööstustes mõned kõige olulisemad biokirmeid moodustavad patogeendid ning nende biokirmete teket soodustavad omadused (Carrascosa jt., 2021).

#### *Bacillus cereus*

*B. cereus* on grampositiivne anaeroobne või fakultatiivne anaeroobne eoseid tekitav bakter, mis võib kasvada erinevates keskkondades laias temperatuurivahemikus (4-50 °C). Ta on vastupidav kemikaalidele, kuumtöötlemisele ja kiirgusele. *B. cereus*'t on sagedamini tuvastatud roostevabast terasest torude, konveierilintide ja mahutite pindadelt.

#### *Campylobacter jejuni*

*C. jejuni* on grampositiivne, spiraalne, pulgakujuline või kõverdunud bakter, mis on varustatud bipolaarsete flagelladega, mistõttu on liikuv. Võib moodustada biokirmeid nii mikroaeroobsetes kui ka aeroobsetes tingimustes ning teda seostatakse eelkõige liha (eriti linnuliha) käitlemise pindade ja vee saastamisega.

#### Enterohemorraagiline *Escherichia coli* (EHEC)

*E. coli* on gramnegatiivne ja pulgakujuline bakter ning enamik tema tüvedest ei kujuta ohtu inimese tervisele, kuid EHEC on tuntud toidupatogeen ning põhjustab tõsise kuluga infektsioone. *E. coli* laialdane levik looduses on suuresti tingitud tema biokirme tekitamise võimest, mis on tingitud pilide, flagellade ja membraani proteiinide võimest kinnituda pindadele. *E. coli* baktereid võib leida toorpiimast, joogiveest, värskest lihast, puu- ja köögiviljadelt, nt melon, tomat, petersell, koriander, spinat, salat. EHEC on suuteline moodustama biokirmeid erinevatel toiduainetööstuse pindadel.

#### *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* on grampositiivne bakter ja üldlevinud toidu kaudu leviv patogeen, mis võib esineda mullas, toidus ja vees. *L. monocytogenes* on suhteliselt resistentne erinevate keskkonnategurite suhtes, võimeline kasvama madalatel temperatuuridel ja happelises keskkonnas ning moodustama biokirmeid ka hapnikuvabades (anaeroobsetes) tingimustes.

Patogeeni on leitud väga erinevatest toitudest nagu piimatooted, mereannid, liha, puuviljad, valmistoidud, jäätis, pehmed juustud, pastöriseerimata piim, külmutatud köögiviljad, suhkrustatud õunad ja linnuliha. *L. monocytogenes* on eriti oluline valmistoitude töötlemisel, sest biokirmete esinemisel on ta üks olulisemaid valmistoitude (rist)saastumise põhjustaja.

Piisavalt on tõendeid selle kohta, et biokirmes elutsevad listeria bakterid on suurema vastupanuvõimega nii desinfektantide kui ka teiste antimikroobsete ainete suhtes (Bridier jt., 2011).

#### *Salmonella enterica*

Salmonellad on gramnegatiivsed pulgakujulised fakultatiivselt aeroobsed bakterid, mis võivad põhjustada gastroenteriite ja septitseemiat. Bakterit on sageli tuvastatud linnuliha, kuid ka paljudest teistest toitudest. *Salmonella* raku pinnal on kiulised moodustised, mis on seotud pinna- ja rakk-raku kontaktide tekkega, mistõttu aitavad oluliselt kaasa ka salmonellade tootmispindadele kinnitumisele. Salmonellad võivad kasvada roostevabast terasest pindadel ning toidutööstuse torustikes tekkinud biokirmed on põhjustanud ulatuslikke toidutekkelisi haiguspuhanguid.

#### *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* on grampositiivne spore mitte-moodustav, liikumatu, fakultatiivselt anaeroobne bakter, mis on temperatuuril 10 – 46 °C võimeline moodustama enterotoksiine. *S. aureus*'e bakterid on võimelised kasvama kõrge soola- või suhkruisaldusega toitudes, millel on vähene veeaktiivsus, ning nad võivad sageli esineda toidukäitlejate nahapinnal ja limaskestadel, mistõttu kujutavad ka suurt ohtu paljudes toidukäitlemise ettevõtetes. Toidumürgistusi sageli põhjustanud toitudeks on liha ja lihatooted, linnuliha ja munatooted, piim ja piimatooted, pagaritooted, salatid ning eriti kooretäidisega koogid ja saiakesed. *S. aureus* on võimeline moodustama biokirmeid.

#### *Pseudomonas* spp.

Pseudomoonased on gramnegatiivsed liikuvad kepikujulised bakterid. Pseudomoonased on üldlevinud psühhrotoorsed toidu riknemist põhjustavad mikroorganismid, mida sageli leitakse toiduainete töötlemise keskkondadest, sealhulgas põrandatelt ja kanalisatsioonist, samuti puu-, köögiviljadel ja lihapindadel ning madala happesusega piimatoodetes, kusjuures pseudomoonaste flagellad ja pilid võimaldavad bakterirakkude kinnitumist pindadele. Pseudomoonased toodavad suurel hulgal EPS-i ning kinnitavad ja moodustavad roostevabast terasest pindadele biokirmit.

#### *Geobacillus stearothermophilus* (varasemalt *Bacillus stearothermophilus*)

*G. stearothermophilus* on grampositiivne, termofiilne, aeroobne või fakultatiivselt anaeroobne bakter, mis võib kinnituda roostevabast terasest pindadele nt töötlemisliinide aurustites ja plaatsoojusvahetites, mis võimaldab neil omakorda kasvada ja toota biokirmit ning vabastada sellest üksikuid rakke või rakkude mikrokolooniaid piimatoodetesse (nt piimapulbrid), seeläbi põhjustada olulist majanduslikku kahju piimatööstusele.

#### *Anoxybacillus flavithermus*

*A. flavithermus* on grampositiivne, termofiilne, eoseid-moodustav, fakultatiivselt anaeroobne mitte-patogeenne bakter, mis võib potentsiaalselt esineda piimatoodetes põhjustades eelkõige probleeme piimapulbritööstuses. *A. flavithermus*'e eosed on väga kuumuskindlad ja nende vegetatiivsed rakud võivad kasvada kuni 65 °C temperatuuril ning lõssi piima olemasolu soodustab tema roostevabast terasest pindadele kinnitumist.

#### *Pectinatus* spp.

*Pectinatus* spp. on gramnegatiivsed, eoseid mitte moodustavad anaeroobsed bakterid, mis sanitatsiooniprobleemidest tingituna on põhjustanud probleeme eelkõige õlletööstuses.



*P. cerevisiophilus* on isoleeritud paljudest õlletehastest Saksamaal, Hispaanias, Norras, Jaapanis, Hollandis, Rootsis ja Prantsusmaal.

#### *Sünergistilised patogeenid*

Erinevad patogeenid võivad koos moodustada biokirmeid, kusjuures biokirme koostisesse võivad samaaegselt kuuluda ka toidu riknemist põhjustavad mikroorganismid. Kalatööstuses võivad värsked kalatooted biokirmete tõttu saastuda erinevate patogeensete liikidega (*Aeromonas hydrophila*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* või *Vibrio* spp.). Sellised biokirmed võivad põhjustada olulist majanduslikku kahju ning ka rahvatervise probleeme (Carrascosa jt., 2021).

Eeltoodu kinnitab, et paljud patogeenid on võimelised moodustama biokirmeid või kuuluma biokirme mikrobioota kooslusse. Mikroorganismide sattumine tootmiskeskonnas aladele/niššidesse, mis on raskesti ligipääsetavad ja võivad seetõttu jääda korralikult puhastamata, toimub paljude vektorite kaudu, nt õhk, vesi, töövahendid, töötajad, veokid jms. Patogeenide kinnitumine tootmiskeskonna pindadele võib toimuda rakumembraanide struktuuride kaudu, nt proteiinid, polüsahhariidid, glükoproteiinid. Juhul kui on piisavalt kontaktaega ning eksisteerivad muud sobilikud tingimused, siis moodustub biokirme suhteliselt lühikese aja jooksul.

Biokirmete teket soodustavad pindadel esinevad kriimustused, mikropraod ja muud vigastused. Sellest tulenevalt on seadmete ja ehitusmaterjalide omadustel väga suur tähtsus. Kasutatavad materjalid peavad olema tugevad, korrosioonikindlad, siledad, kergesti pestavad ja desinfitseeritavad. Metallpindadel, kaasa arvatud roostevabateras, võib biokirme soodustada rooste teket, mille tulemusel tekivad väikesed mikroskoopilised augud ja praod. Sellised pinnavigastused võimaldavad mikroobide sattumist niššidesse/peitekohtadesse, seal püsimist, seeläbi toidukäitlemispindade perioodilist saastamist.

Biokirmeid moodustava patogeeni heaks näiteks on *L. monocytogenes*, sest ta on võimeline kinnituma paljudele toiduga kokku puutuvatele pindadele, nagu roostevaba teras, polüstüreen ja klaas ning on vastupidav tootmiskeskonnast tulenevate stressorite suhtes (Di Bonaventura jt., 2008). Toidukäitlemisruumide niššides on *L. monocytogenes* võimeline püsima pikka aega, mõnikord isegi aastaid, põhjustades korduvaid toiduohutuse probleeme, eriti valmistoitude saastumist (Ferreira jt., 2014; Leong jt., 2014; Fagerlund jt., 2016; Harrand jt., 2020). *L. monocytogenes*'e püsivus on tingitud tema omadustest, nt kiire kohanemisvõime, biokirme moodustamise võime, madalatel temperatuuridel paljunemine ja pesukemikaalide ning muude keskkonnategurite talumine. Tingituna asjaolust, et *L. monocytogenes* on keskkonnas levinud ja seda leidub mullas, vees, loomade ja lindude soolestikus ja toidu toorainetes, võivad *Listeria* bakterid jõuda toidutootmisruumidesse ja seal levida. *L. monocytogenes* võib kergesti moodustada biokirme, mis aitab bakteritel kinnituda põranda, kanalisatsiooni ja seadmete pinnale, muutes nende puhastamise raskemaks ja kaitseb baktereid kuivamise, kuumuse ning tavapäraste puhastamis- ja desinfitseerimiskemikaalide eest. *L. monocytogenes*'e biokirme on sageli kuumtöötlemise protsessi läbinud toitude ristsaastumise allikas. *L. monocytogenes* võib paljuneda ka jahedas (külmkapi temperatuuridel) keskkonnas ja talub hästi ka külmutamist. Neid tingimusi kasutatakse sageli mikroobide kasvu kontrollimiseks, kuid *Listeria* kontekstis antud tingimused pärsivad eelkõige konkureeriva mikrobioota kasvu, seeläbi pigem soodustavad *L. monocytogenes*'e ellujäämisvõimet ja püsivust, eriti jahutatud ja külmutatud toitudes.

## **Pinnad, mis võivad enim põhjustada biokirmete probleeme, *L. monocytogenes*'e näitel**

### *Põrandad*

Sobimatutest materjalidest ehitatud või halvasti paigaldatud põrandatel võivad tekkida vee kogunemiskohad ning see võib põhjustada veeimavust. Halvasti ehitatud põranda ja seina liitekohad ning äravoolu ja põranda liitekohad põhjustavad sageli vee ja niiskuse püsima jäämist. Probleemiks on põrandad, millel on praod, augud või vahed. Patogeeni leviku ning biokirmete tekke minimeerimiseks tuleks põrandad hoida võimalikult kuivad. Vee kasutamine nii toidu töötlemisel kui ka ruumide puhastamisel peab olema põhjendatud ning seda (vee kasutamist) tuleb võimalusel piirata. Veeloigud tuleb kaabitsa abil viivitamatult eemaldada ja veelekked tuleb kõrvaldada nii kiiresti kui võimalik. Põrandad peavad olema dreanaaži poole kaldu, et hõlbustada vee eemaldamist ja hoida ära seisva veega loikude tekkimist põrandatel.

Vältimaks patogeeni võimalikku levikut erinevate hügieenitsoonide (eriti madala ja kõrge riski tsoonide) vahel, tuleb need alad füüsiliselt eraldada, et piirata või koguni vältida erineva riskitasemega tsoonide vahel vee, aerosoolide, töövahendite ning inimeste liikumist.

Erinevates hügieenitsoonides võib kasutada ainult selles konkreetses hügieenitsoonis töötamiseks mõeldud jalanõusid. Toiduga kokku puutuvaid seadmeid ja töövahendeid ei tohi kunagi asetada põrandale ning kui see kogemata juhtub, siis tuleb need enne uuesti kasutamist hoolikalt puhastada ja vajadusel ka desinfitseerida.

### *Kanalisatsioon ja trapid*

Kui *L. monocytogenes* on tootmisruumides tuvastatud, on teda suure tõenäosusega ka kanalisatsioonis. Äravoolud toimivad *L. monocytogenes*'ga saastunud vee kogumispunktidenä ning tagavad patogeeni kasvamiseks vajalike toitainete ja niiskuse olemasolu. Kuigi kanalisatsiooni puhastamine on ebameeldiv ja keeruline ülesanne, on see *Listeria* tõrje jaoks ülioluline. Rämpne kanalisatsioon võib olla *L. monocytogenes*'e saasteallikaks ja kanalisatsioonist heitvee tagasivoolamine levitab listeriaid põrandale ja põrandalt kantakse nad omakorda edasi, nt jalanõude, transportööri ja muul viisil. Kanalisatsiooni, k.a. trappe, puhastatakse ja desinfitseeritakse koristustoimingute ajal tööpäeva lõpus. Pärast äravoolualade/kanalisatsiooni/trappide pesemist ja desinfitseerimist tuleb oodata, et tekkinud aerosoolid maha langeksid, seejärel loputatakse ning desinfitseeritakse toiduga kokku puutuvad pinnad. Kergesti puhastatav dreanaž võimaldab minimeerida mikroobide kasvu ning vältida biokirmete teket. *L. monocytogenes* võib saastunud põrandate ja kanalisatsiooni kaudu kergesti edasi kanduda teistesse tootmisruumidesse, k.a. toitu. Kandjateks on enamasti töötajate jalanõud, töövahendid, kärurattad ning ka puhastusseadmed. Parim viis vältida põrandate ja kanalisatsiooni saastumist listeriatega on nende korrapärane puhastamine ja desinfitseerimine. Seejuures on oluline, et puhastamise käigus minimeeritaks teiste pindade saastumist. Kõrgsurve ning ettevaatamatu mehaanilise puhastamise kasutamine suurendab listeriatega sattumist aerosooliosakeste külge, mistõttu võib patogeeni levida ka õhu kaudu. Põrandate ja äravoolutrappide puhastamiseks tuleb kasutada eri värvikoodiga käsikoristusvahendeid, sest neid koristusvahendeid ei tohi kasutada nt seadmete ja otseselt toiduga kokku puutuvate pindade puhastamiseks. Eeltoodud reeglitest tuleb rangelt kinni pidada.

### *Toidu töötlemise seadmed*

Sarnaselt põrandatele ja äravoolualadele, võivad ka toidutöötlemisseadmete raskesti puhastatavad alad võimaldada vee ja orgaaniliste ainete kogunemist, mis omakorda soodustab pindade koloniseerimist listeriatega, k.a. nende paljunemist, ning ettevõtte spetsiifiliste *L. monocytogenes*'e tüvede teket.

Riskide minimeerimiseks tuleb kasutada toidu töötlemise seadmeid, mida on disainitud tingituna lihtne puhastada, vajadusel osadeks lahti võtta ning mis on valmistatud kergesti puhastatavast ja desinfitseerimisainetele vastupidavast materjalist. Puhastamise ja desinfitseerimise sagedus

peaks põhinema ettevõtte poolt läbiviidud riskihinnangul, kuid jahutatud valmistoitude töötlemiseks kasutatavate seadmete puhul peab see toimuma vähemalt üks kord päevas. Igapäevast koristust tuleks täiendada regulaarse seadmete osadeks lahti võtmise ja sellele järgneva sügavpuhastusega, et tagada igapäevase puhastamise ajal raskesti ligipääsetavate kohtade puhastamine. Ka süvapuuhastuse sagedus peaks põhinema ettevõtte poolt läbiviidud riskide hindamisel. Puhastamisel ja desinfitseerimisel tuleb erilist tähelepanu pöörata seadmete raskesti ligipääsetavatele aladele. Need on alad/pinnad, kus *L. monocytogenes* võib esineda ning kasvada, eriti kui on piisavalt niiskust. Nende alade/pindade hulka võivad kuuluda halvasti kuivavad seadmete tugiraamid, nišid, õõnsad tihendamata rullikud, vigased keevisõmblused, viilutamismasinade sisemised alad ning kaitsekorpuste all olevad alad. Määrdeained ja suruõhusüsteemide niiskust koguvad alad võivad samuti olla mikroorganismide allikaks, mistõttu tuleb neid regulaarselt kontrollida ning vajadusel hooldada.

#### *Koristusvahendid*

Töövahendid, mida kasutatakse koristamiseks (nt harjad, kaabitsad), võivad olla üheks kõige olulisemaks listeeriatega saastumise allikas. Hiljutises uuringus leiti, et kalatöötlemistehastes olid listeeriatest enim saastunud mõned spetsiifilised töötlemismasinad (nt naha eemaldamise masinad), transportöörid, töövahendid, soolvesi, põrandad, kanalisatsioon ja personali tööriistad (Aalto-Araneda jt., 2019). Koristusvahendid peavad olema sobiva hügieenilise disainiga/kujundusega, et hõlbustada nende puhastamist ja vältida mikroobide paljunemist. Koristusvahendite pinnad peavad olema siledad, ilma pragude ja vigastusteta. Kui tegemist on mitmest korpusest koosneva tööriistaga, siis peab neid olema võimalik kergesti osadeks lahti võtta. Eelistada võiks töövahendeid, millel on üheosaline konstruktsioon, sest erinevad osad (eriti nende liitekohad) võivad olla mikroobide peitekohtadeks ja kasvukohaks. Kõik koristusvahendid tuleb pärast kasutamist korralikult puhastada ja desinfitseerida ning hoida sobivates seinakinnitustes või puhastes kappides.

#### *Jahutid, sügavkülmikud ja õhupuuhastussüsteemid*

Jahutid ja sügavkülmikud on külmad ja niisked. Madalatel temperatuuridel on võimalised kasvama vaid psührotroofsed (külmalembesed) mikroorganismid, k.a. *L. monocytogenes*. Antud tingimustes on listeeriatel madalast temperatuurist tingituna vähem kokkupuutumist muu konkureeriva mikrobiotaga, mistõttu need seadmed on heaks listeeriate kasvunišiks. Jahutusseadmetes ja sügavkülmikutes olevad aurustamisplaadid ja ventilaatorid peavad olema puhtad ja desinfitseeritud. Jahutussüsteemide kondensaad tuleb suunata kanalisatsiooni või vastavatesse kogumisnõudesse, mida tuleb regulaarselt tühjendada, puhastada ja desinfitseerida. Kunagi ei tohi jahutus- või külmutussüsteemi alt toodetega läbi minna ehk liikumisteed peavad olema planeeritud nii, et need välistavad antud süsteemide kaudu toodete/taara jms. võimaliku saastumise. Paljudes õhupuuhastussüsteemides on olemas ka aurustid, mida tuleb puhastada. Vältida tuleb vee kondensaadi teket ja selle kogunemist.

#### **Biokirme ennetamine ja hävitamine**

Kõige olulisem on vältida biokirme moodustumist korrapärase puhastamise ja desinfitseerimisega, et mikroobide rakud ei saaks tugevalt kinnituda kontaktpindadele (Simões jt., 2006). Efektive puhastusprotsess, mis eemaldab kõik toidujäägid ja muud ühendid, mis võivad soodustada bakterite kasvu ja biokirme moodustumist, on eriti tõhus meetod biokirmete tekke vältimiseks (Simões jt., 2010). Teadmine, et biokirmed võivad toidukontaktpindadele tekkida suhteliselt lühikese aja jooksul, teeb toiduohutuse tagamisel igapäevase kõrgel tasemel ehk nõuetekohase puhastamise ja desinfitseerimise (sanitatsiooni) eriti oluliseks. Kõige olulisem on biokirmete teket ennetada, sest juba välja kujunenud biokirmete tuvastamine ja hävitamine ei ole lihtne. Biokirmete tuvastamine eeldab süsteemse proovivõtuplaani olemasolu

ning õigete proovivõtutehnikate ja analüüsimeetodite kasutamist.

Biokirmete teket saab minimeerida standardsete puhastamis- ja desinfitseerimismeetodite ehk õigete töövõtete hoolika rakendamisega, kusjuures sanitatsiooni efektiivsust tuleb ettevõtte enesekontrolli verifitseerimise tegevuste raames regulaarselt tõendada. Pinnahügieenile kehtestatud piirmäärade korduvad ületamised viitavad ka biokirmete tekke võimalusele. Erilist tähelepanu tuleb pöörata olukordadele, kus sanitatsiooni järgselt tuvastatakse pindadelt patogeeni(de) esinemine. Sellised olukorrad eeldavad koheste korrektiivmeetmete rakendamist, nt probleemsel alal/seadmel süvakoristuse teostamist, rakendades võimalusel erinevate energialiikide kombineeritud kasutamist, nt mehhaaniline (harjade kasutamine) ja keemiline (biokirmete vastase toimega desinfektandid).

Biokirme tekke ennetamisel omavad tähtsust ka pinnamaterjalide omadused, nt korrosioonikindlus, siledus ning muude pinnadefektide puudumine. Seadmete tihendid võivad olla biokirme tekke kohtadeks, sest tihenditele koguneb kergesti mustust ja toitaineid. Kumm ei ole kunagi küllalt sile, et takistada biokirme teket. Tihendite korrasolekut on vaja regulaarselt jälgida ning nende töökindluse vähenedes välja vahetada. Tihendid tuleb välja vahetada regulaarselt ning see tegevus peab olema kirjutatud ettevõtte enesekontrolliprogrammi dokumentidesse (Roasto, 2011).

Desinfitseerimisainete valikul tuleb lähtuda pinnamaterjalist ja kinnitunud mikroobidest. Desinfitseerimisaine toime efektiivsus väheneb oluliselt aine kokkupuutumisel biokirme EPS maatriksiga, mis tähendab seda, et töölahus ei pruugi hävitada pindadel esinevaid kõiki mikroobe. Analoogne olukord tekib, kui desinfitseeritakse liigniiskeid pindasid, mistõttu desinfitseerimisaine töölahuse efektiivne kontsentratsioon lahjeneb juba enne, kui see puutub kokku mikroobidega. Tagajärjeks võib olla mikroobide resistentsuse välja kujunemine antud kemikaali(de) suhtes ning aja jooksul ettevõtte spetsiifiliste patogeentüvede teke. Eeltoodust tulenevalt on oluline, et puhastamisprotsess suudaks lõhkuda või lahustada EPS- maatriksi, mis võimaldaks desinfitseerimisaine jõudmist bakterirakkudesse ja need hävitada (Simões jt., 2006). Kõrgete temperatuuride kasutamine puhastamisel võib vähendada vajalikku füüsilist jõudu, näiteks vee turbulentsi ja küürimist ning võimaldab teatud määral ka biokirme rakkude inaktiveerimist. Samas liiga kõrge temperatuuriga pesuvesi võib põhjustada teatud tüüpi mustuse kinnitumist pindadele. Eriti raske on eemaldada kuumuse tõttu denatureeritud ning pindade külge liimunud valgulist mustust. Reeglina kasutatakse eelpesuks vett, mille temperatuur jääb vahemikku +50 °C kuni 60 °C. Desinfitseerimisele eelnev puhastamine võimaldab pindadelt eemaldada vaid ligikaudu 90% bakteritest ega tapa neid. Korralik eelpesu on siiski väga oluline, sest liiga mustadele pindadele jäänud orgaaniline materjal (rasvad, süsivesikud ja valgupõhine mustus) vähendab oluliselt desinfitseerimisvahendite tõhusust, võimaldades seeläbi biokirmete teket. Olulised tegurid, mis mõjutavad desinfitseerimisvahendite tõhusust, on pH, temperatuur, vee karedus, keemilised inhibiitorid ning nende kontsentratsioon ja kokkupuuteaeg (Maukonen jt., 2003; Gram jt., 2007; Kuda jt., 2008). Ettevõtte spetsiifiliste patogeentüvede tekkimine ja püsivus on tingitud teguritest, mis põhjustavad desinfitseerimisainete töölahuste kontsentratsioonide langemist, nt patogeeni jaoks keskkonna niššide/peitekohtade olemasolu ja juba tekkinud biokirmed ning biokirme koostises olevate bakteritüvede resistentsus desinfitseerimiseks kasutatavate kemikaalide suhtes.

### **Efektiivse puhastuse ja desinfitseerimise etappideks on:**

1. Kuivkoristamine ehk tahkete toiduosakeste eemaldamine seadmetelt, põrandalt, konveierilintidelt ja muudelt tööpindadelt. Mõned seadmed, näiteks viilutus- ja tükeldamismasinad, tuleb efektiivselt kuivkoristamiseks osadeks lahti võtta, et lahti monteeritud osi saaks seejärel põhjalikult puhastada ja desinfitseerida;
2. Põranda loputamine ja pesemine;

3. Seadmete eelputust tuleb teostada sooja või külma veega. Veetemperatuur peab olema madalam kui 60 °C, sest liiga kuum vesi võib koaguleerida valke või muud tüüpi mustust. Eelpesu alustatakse seadmete ülemistest osadest ja liigutakse allapoole, st pöranda suunas;
4. Põhipesu (nt vahupesu), k.a. pindade harjamine/hõõrumine. Mehaanilise energia rakendamisel tuleb enam tähelepanu pöörata raskesti puhastatavatele seadmete osadele. Vajadusel tuleb need puhastamiseks ja desinfitseerimiseks osadeks lahti võtta. Tagada tuleb pesukemikaalide vähemalt minimaalne kontaktaeg pindadega ja rangelt järgida kemikaalide tootjate poolt antud soovitusi;
5. Seadmete ja tööpindade loputamine;
6. Seadmete ja tööpindade puhtuse visuaalne kontroll. Vajadusel täiendav puhastamine;
7. Desinfitseerimine. Esmalt tuleb desinfitseerida pörand ja alles seejärel seadmed, et vältida pöranda puhastamisel tekkivate aerosoolide kandumist seadmetele ja muudele tööpindadele. Vältida tuleb kõrgsurvepesu (tekkitab rohkelt pritsmeid). Veetemperatuur peab olema vähemalt 82 °C ning kontaktaeg vähemalt 10 sekundit, et tekitada kuumast aurust tulenev mikroobide hävitamise efekt. Desinfitseerimisained, nt happelised kvaternaarsed ammooniumiühendid, võivad olla biokirme hävitamiseks kuumast veeaurust tõhusamad.
8. Desinfitseerimisainete regulaarne rotatsioon. Erinevate kemikaalide kasutamisest tingitud pH-muutused takistavad mikroobide kohanemist tootmiskeskonnaga. Leeliseliste ja happeliste pesukemikaalide vaheldumine aitab vältida nii biokirme kui ka mineraalse sademe (anorgaanilise mustuse) teket pindadel.
9. Liigniiskuse tekke vältimine. Võimalusel pinnad kuivatada. Kuivatamisel (nt õhku kuivatus meetod) tuleb vältida ristsaastumist, nt aerosoolsete osakeste ja pritsmete kaudu. Liigse vee eemaldamiseks kasutatavad vahendid peavad olema hügieenilised (Roasto, 2021).

### **Desinfitseerimisained**

Desinfitseerimisele eelnevad puhastusetapid peavad tagama toidu jääkide ja muu mustuse täieliku eemaldamise. Desinfitseerimine peab hävitama kõik patogeensed mikroorganismid. Pesu- ja desinfitseerimisainete valimisel tuleb arvestada mitmete teguritega, nt kemikaalid peavad sobima ettevõtte pinnamaterjalide ning mustuse tüüpide ja seonduvate mikroobidega. Uuringud on leidnud, et biokirmete eemaldamiseks on vajalik keemilise ja mehaanilise töötlemise sünergistlik toimet ning mõlemad mängivad olulist rolli biokirme ja selle bakterirakkude eemaldamisel ja hävitamisel (Exner jt., 1987).

Resistentsuse vältimiseks tuleb sanitatsiooni skeemides kasutada erinevaid (erineva toime mehhanismiga) desinfitseerimisaineid. Viimane tähendab, et teatud nädalapäeval (kord nädalas) või isegi harvem (nt kord kahe nädala jooksul) kasutatakse põhidesinfitseerimisainest erineva toime mehhanismiga desinfitseerimisainet. See takistab mikroobidel resistentsuse välja kujunemist.

Pesu- ja desinfitseerimisainete märgistusel peab olema vähemalt toote kasutamisel info, nt kemikaali töölahuse kontsentratsioon, kasutamiskiik, kokkupuuteaeg, temperatuur, kemikaali muud olulised omadused ning ohutusala info.

Oluline on tarnijalt nõuda ka täiendavat info, nt töölahuse patogeenide hävitamise efektiivsuse kohta. Mõned pesu- ja desinfitseerimisained omavad efektiivsemat toimet gramnegatiivsete bakterite suhtes, kuid teised hävitavad pigem grampositiivseid baktereid.

Toimeainete tõhusus biokirmetes elutsevate mikroorganismide hävitamisel, eriti roostevabast ja plastist pindadel (FSIS, 2014):

- tõhusama biokirmete vastase toimega kemikaalid on olnud happelised kvaternaarsed ammooniumiühendid, peräädikhape ja klooridioksiid;

- vähem efektiivseteks on osutunud halogeenide segud ja happelised anioonsed desinfitseerimisained;
- kõige ebatõhusama biokirme vastase toimega on olnud kloor, jodofoorid (joodiühendid, mis omavad bakterite, viiruste, seente ja eoste vastast toimet) ja neutraalsed kvaternaarsed ammooniumiühendid.

Seega, mitmed desinfitseerimisained ei ole võimelised läbima biokirme polüsahhariididest ja glükoproteiinidest koosnevat kesta, mistõttu ei suudeta puhastamise ja desinfitseerimise käigus hävitada kogu biokirmit, k.a. selles paiknevaid mikroorganisme. Toidukäitlemisettevõttes, kes toodavad *L. monocytogenes*'e suhtes nn tundlikke toite (valmistoidud, milles patogeen võib kasvada ohtliku määraneni), peavad pesukemikaalide ja desinfitseerimisainete valikul arvestama kemikaalide listeritsiidsete omadustega, ehk nõudma kemikaalide tarnijatelt dokumenteeritud listeritsiidset toimet. Tegelikult on juba välja kujunenud biokirmit väga raske eemaldada/hävitada vaid keemilise energiaga, kusjuures korrosiooni aspektist lähtuvalt ei tohi oluliselt tõsta ka töelahuse kontsentratsiooni. Desinfitseerimisainete liiga kõrged kontsentratsioonid võivad kahjustada pinnamaterjale, mis omakorda võib luua soodsad tingimused biokirme tekkeks.

Kvaternaarseid ammooniumiühendeid (edaspidi lühend QAC), nt bensalkooniumkloriid, kasutatakse toidutöötlemiskeskonnas mikrobioloogilise puhtuse tagamiseks suhteliselt laialdaselt (Martínez-Suárez jt, 2016). Resistentus QAC-de suhtes tekib eelkõige läbi geneetilise mehhanismi (genotüüpiline resistentus), kuid võimalik on ka mikroobide rakusiseste nn *efflux* pumpade (viivad kemikaalid rakkudest välja) esinemine, mis võivad aja jooksul tekitada QAC-de suhtes resistentsuse, eriti liiga madalate QAC kontsentratsioonide kasutamisel desinfitseerimisel (Martínez-Suárez jt, 2016).

QAC-de sobimatu kasutamine, näiteks töelahuse liiga madal kontsentratsioon ja ebapiisav pindade loputamine pärast desinfitseerimist, võivad põhjustada ellujäänud patogeensete mikroorganismide kohanemist desinfitseerimisainega. Viimane võib omakorda soodustada biokirme teket. Yu jt. (2018) leidsid, et pikaajaliseks bensalkooniumkloriidi toime säilimiseks on desinfitseerimise skeemides vaja täiendavalt kasutusele võtta ka etanooli ja vesinikperoksiidipõhised desinfitseerimisained, sest erinevate toimemehhanismidega desinfitseerimisainete kasutamine takistab resistentsete mikroobitüvede välja kujunemist.

Naatriumhüpoklorit (NaClO) on keemiline ühend, mida kasutatakse pleegitamiseks või pindade desinfitseerimiseks. Tegemist on ühendiga, mis on efektiivselt võimeline inaktiveerima biokirmeid. NaClO on tõhusam madala pH-ga kui leeliselises keskkonnas (Araújo jt., 2011; da Silva jt., 2011).

Vesinikperoksiid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on üks laialdaselt kasutatavatest desinfitseerimisvahenditest, kuna on kõrge oksüdatsioonivõimega, mis põhineb vabade radikaalide tootmisel. Viimased omakorda on võimelised biokirme maatriksit hävitama (de Carvalho, 2007).

Peräädikhape tekib vesinikperoksiidi ja äädikhappe vahelise reaktsiooni või atsetaldehyüdi oksüdatsiooni tulemusena. Segul on tugev spetsiifiline lõhn ja madal pH (2,8) ning seda toodetakse tavaliselt kontsentratsioonides vahemikus 5–15%. Peräädikhape laguneb ohututeks ja keskkonnasõbralikeks jääkaineteks (äädikhape ja vesinikperoksiid) toidus, seega saab seda kasutada ilma loputamiseteta ja selle efektiivsust ei mõjuta oluliselt ka proteiini jääkide olemasolu. Uuringutega on tõestatud peräädikhappe *L. monocytogenes*'e biokirme vastane toime roostevabas terasest pindadel, eriti kombineerituna osoneerimise ja ultrahelitöötusega (Baumann jt., 2009).

Biokirmete vastane toime on ka teatud ensüümidel. Kuna EPS on heterogeenne maatriks, on selle lagundamiseks vaja siiski kasutada ensüümide kombinatsiooni. On leitud, et biokirmete vastaseid ensüüme saaks tänu nende mittetoksilistele omadustele kasutada keskkonnasõbraliku alternatiivina kemikaalide kasutamisele (Sokunrotanak jt., 2013). Ensüümidele sarnaselt oleks

keskkonnasõbralik variant kombineeritud bakteriofaagide kasutamine. Faagipreparaatide kasutamine ei põhjustaks ka pindade korrosiooni. Antud preparaatide (ensüümid, faagid) kasutamine eeldab siiski veel ulatuslikku uurimistööd.

Sanitatsiooni efektiivsust biokirmete suhtes uuriti põhjalikult Aryal ja Muriana (2019) uurimustöös, mille tulemusena leiti:

1. **Hüpoklorit** (10-Chlor), kontsentratsiooniga 200 ppm, ei olnud efektiivne biokirmete hävitamisel. Hüpokloritid kuuluvad oksüdeeriva toimega kemikaalide hulka ning kaotavad suuresti oma toime tänu biokirme orgaanilistele kihtidele. Toimeaine inaktiveerimist ei toimunud 1000 ppm kontsentratsiooni juures, kuid biokirmete vastane toime oli siiski väike;
2. **Kvaternaarsed ammooniumi ühendid (QAC)** on stabiilsed, aktiivsed ja madala toksilisusega ühendid ning on efektiivsemad grampositiivsete bakterite, pärmide, hallitusseente ja lipiide sisaldavate viiruste vastu. Nende toime on väiksem gramnegatiivsete bakterite, endosporide ja bakteriofaagide vastu. Teatud tüüpi QAC-d on efektiivsemad. Bi-Quat on näide varase põlvkonna QAC puhastusvahenditest, mida on toiduainetööstuses laialdaselt kasutatud. Antud uuringus oli 200 ppm Bi-Quat efektiivne *L. monocytogenes*'e vastu, kuid näitas piiratud efektiivsust *E. coli* ja *Salmonella* vastu;
3. **Peroksüaadikhape ehk peraadikhape (PAA)** on oksüdeerivatelt omadustelt klooriga võrreldes märkimisväärselt efektiivsem. Müüdav PAA on reeglina tasakaalustatud segu aadikhapest, vesinikperoksiidist, peraadikhapest ja veest. PAA kui desinfitseerimisaine populaarsus tuleneb kemikaali laias toimeulatuses (lai toimespekter), sest ta toimib nii bakterite, pärmide kui seente vastu. PAA laguneb samuti kahjututeks ühenditeks, mis toimivad laias temperatuuri (0-40 ° C) ja pH (3-7,5) vahemikus. Üldiselt ei tohiks kasutada peraadikhape üle 200 ppm kontsentratsioone. Antud uuringus vähendas PAA (KC-610) väga tõhusalt *L. monocytogenes*'e ja *E. coli* O157: H7 arvukust praktiliselt tuvastamatule tasemele, s.t., et mõlema patogeeni kontsentratsioon vähenes rohkem kui 6,5 log ühikut. *Salmonella* kontsentratsioon vähenes 5 minuti jooksul ligikaudu 3 log ühikut. NB: 1 log ühiku võrra langus tähendab 10-kordset (90%) bakterite arvukuse langust;
4. **Vesinikperoksiid** on selge, värvitu vedelik ja keskkonnasõbralik (mittetoksiline) - desinfitseerimisaine, mida kasutatakse laialdaselt meditsiinivaldkonnas ja toiduainetööstuses. See on efektiivne paljude mikroorganismide, sealhulgas viiruste, bakterite, bakteriaalsete endosporide ja pärmseente vastu. Efektiivsus on veelgi suurem koos uue põlvkonna QAC-ga (nt sellised tooted nagu Sterilex ja Decon7), mis ühendavad multi-kvaternaarse ammooniumiühendite efektiivsuse vesinikperoksiidiga. Antud uuringu tulemused näitasid, et biokirmete olemasolul oli Sterilex väga efektiivne *L. monocytogenes*'e vastu (>6 log vähenemine 2,5 minuti jooksul, 5% töölahus), mõõdukalt efektiivne *E. coli* O157: H7 F4546 biokirme vastu (<3 log vähenemine 2,5 min 10% töölahusega) ning vähem efektiivne *Salmonella* Montevideo vastu (~ 1 log vähenemine 10 minuti jooksul 10% töölahusega). Decon7 on sarnane Sterilex'ga, kuid see sisaldab kiirema toime saavutamiseks diatsiini (glütseriindiatsetaati), mis annab täiendava biokirmete vastase toime efektiivsuse. Seda tõendas ka antud uuring, kus *L. monocytogenes* ja *E. coli* O157: H7 saadi >6 log arvukuse vähenemine juba ühe minuti jooksul (10% töölahus) ja >7,5 log vähenemine salmonellade puhul 2,5 minuti jooksul.

Kõigi kolme patogeeni biokirmete vastu toimis efektiivselt modifitseeritud QAC-i, vesinikperoksiidi ja glütseriindiatsetaati kombinatsioon. Kõige vähem efektiivseteks osutusid kvaternaarse ammooniumkloriid (QAC) ja klooripõhised desinfitseerimisained. Happelised

modifitseeritud kvaternaarsed ammooniumiühendid on siiski võimelised biokirmeid hävitama märkimisväärselt efektiivsemalt (Aryal ja Muriana, 2019). Ka USA-s läbiviidud uuringute tulemusena järeldati, et neutraalsed kvaternaarsed ammooniumiühendid on nõrga biokirmete vastase toimega, kuid märkimisväärselt efektiivsemad on happelised modifitseeritud kvaternaarsed ammooniumiühendid (FSIS, 2014).

Põhitoimeainena aktiivkloori sisaldavad desinfitseerimisained on tugeva mikroobe hävitava toimega, kuid kahjuks ei ole need efektiivsed biokirmete hävitamisel. Seevastu klooridioksiid (0,6 – 1,0 mg/L) eemaldas biokirme isegi väga raskesti puhastavates seadmetes. Nimelt, klooridioksiid ei reageeri biokirme EPS katte koostisosadega ning on seetõttu võimeline tungima biokirme kestast läbi ning hävitama biokirme koostises olevad bakterirakud (Simpson jt., 1993).

Mõned ettevõtted kasutavad parema puhastusefekti saavutamiseks osoneeritud vett. Osoon on tugev antimikroobne aine, mida saab kasutada bakterite, seente, viiruste, algloomade ning bakterite ja seente eoste vastu (Khardre jt., 2001). Osoon on võimeline hävitama üksikuid kinnitamata spoorideta mikroobirakke, kuid biokirmete vastane toime ei pruugi olla sama efektiivne. Siiski on mitmeid uuringuid, mis kinnitavad osooni, k.a. osoneeritud vee, võimet hävitada nii mikroobirakke kui ka biokirmeid (Dosti jt., 2005; Tachikawa jt., 2009).

Pesu- ja desinfitseerimisaine koos kasutamisel on mikroobide vastane toime reeglina madalam, võrreldes sanitatsiooni skeemiga, kus pesuaineid kasutatakse esmalt põhipesu teostamisel, järgnevalt toimub pesuaine maha loputamine, seejärel eraldi sanitatsiooni viimase etapina pindade desinfitseerimine.

## JÄRELDUSED

Välja kujunenud biokirme(te) hävitamiseks ei piisa üksnes patogeeni(de) suhtes toimivate pesu- ja desinfitseerimiskemikaalide kasutamisest. Biokirme eemaldamisel on vaja täiendavalt rakendada ka füüsikalist/mehaanilist energiat, nt pesuskeemides käsiharjade kasutamist. Samas ei tohi nn mehhaaniline puhastamine põhjustada mustuse osakeste, k.a. biokirme osakeste, õhu kaudu või muul viisil levimist. Viimane võib toimuda, kui mehhaanilist puhastust viiakse läbi liiga jõuliselt, mis võimaldab mustuse osakeste paiskumist õhku ja uute pindade saastumist. Äärmiselt oluline on kasutatavate koristusvahendite tööjärgne korralik puhastamine ja desinfitseerimine, sest vastasel juhul võivad koristusvahendid osutada pigem pindade saastajateks. Lisaks eeltoodule on oluline varajane patogeeni peitekohtade kindlaks tegemine. Desinfitseerimisainete töölahuste kontsentratsioonid peavad olema õiged, mistõttu tuleb rangelt järgida kemikaali tootja poolset toote kasutusala informatsiooni. Vältida tuleb liigniiskete pindade desinfitseerimist, sest kemikaali töölahuse kokkupuutel veega tekib kemikaali alakontsentratsioon. Desinfitseerida võib üksnes puhtaid pindu, sest orgaanilise mustuse olemasolul väheneb desinfitseerimisainete toime. Orgaanilise ja anorgaanilise mustuse puudumine on eriti oluline kiire toimega desinfitseerimisainete mikroobide hävitamise toime tagamiseks. Pärast sanitatsiooni, eriti kui viimane etapp on pindade järeloputamine, tuleb tagada maksimaalsel viisil pesuvee eemaldamine, sest niiskus on patogeenide kasvu ning biokirmete teket soodustav tegur. Erinevate kemikaalide kasutamine sanitatsiooni skeemides tagab parima mikroobide hävitamise toime. Lisaks eeltoodule on oluline, et ettevõtte teostaksid regulaarselt süvapuhastust, mille sagedus määratakse vastavalt ettevõtte poolse riskihindamise tulemusele. Nõuetekohasuse tõendamise tegevuste raames võetavate pinnaproovide analüüsid peavad tõendama sanitatsiooni efektiivsust. Proovivõtusageduse ja pinnaproovide arvu (proovivõtupea) määrab ettevõtte vastavalt teostatud riskihindamise tulemusele.



## KOKKUVÕTE

Biokirmete tuvastamisel, ennetamisel ja hävitamisel on oluline pöörata tähelepanu järgnevatele aspektidele:

- Toidukäitlejatel peavad olema teadmised biokirme tekke põhjustest, nende tuvastamise võimalustest, hävitamisest ja tekke ennetamisest;
- Biokirme võib sobilike tingimuste (toitained, vesi, pinnakahjustused jms.) korral tekkida juba ööpäeva jooksul;
- Algselt mittepatoogensetest mikroorganismidest moodustunud biokirme pakub soodsaid võimalusi patogeensete mikroorganismide peitumiseks ja kasvuks;
- Biokirme ennetamiseks on oluline varajane (toidu)jääkide kogunemiskohtade ja kahjustunud pindade kindlaks tegemine koos vajalike korrigeerivate tegevustega;
- Puhtuse taseme kiireks määramiseks saab kasutada ATP-meetodit, mis sobib ka biokirmete kaudseks tuvastamiseks;
- Puhastamine ja desinfitseerimine peab alati olema teostatud nõuetekohaselt;
- Süvapuhasus peab olema regulaarne ning selle sagedus põhinema ettevõtte poolt läbiviidud riskihinnangul;
- Tootmisalade füüsilisel eraldamisel, kus madala riskiga hügieenitsoonid on kõrge riskiga hügieenitsoonidest selgelt eraldatud, on suur mõju nii puhtuse tasemele kui ka toodete ohutusele, eriti kuumtöötlemise järgses tootmisalas;
- Efektiivsed kemikaalid võivad olla happelised kvaternaarsed ammooniumühendid, peräädikhape ja klooridioksiid. Siiski ei piisa biokirmete hävitamiseks vaid nn keemilisest energiast, vaid kriitiliste pindade puhastamisel tuleb täiendavalt kasutada ka mehaanilist energiat;
- Täiendava mehhaanilise energia kasutamine, nt pindade harjamine, on otstarbekas eelkõige kõrge riskiga hügieenitsoonides, masinatel ja pindadel, mis otseselt toiduga kokku puutuvad;
- Koristusvahendid peavad olema värvikoodiga, ehk rakendatud vaid kindlaks määratud pindade puhastamiseks, ning koristusjärgselt tuleb tagada nende hoolikas pesu ja desinfitseerimine;
- Tagatud peab olema desinfitseerimisainete ringluses kasutamine, kus pesuskeemides kasutatakse põhitoimeainele täiendavalt teatud sagedusega ka teistel toimeainetel põhinevaid desinfitseerimisaineid;
- Desinfitseerimisaine(te) biokirmete vastane toime peab olema kemikaalitootja poolt kindlaks määratud ning tooteinfona esitatud;
- Seadmete hankimisel tuleb tähelepanu pöörata ka seadmete hügieenilisele disainile ning seadme pinnamaterjali omadustele, nagu puhastatavus ja vastupidavus pesu- ja desinfitseerimise kemikaalidele;
- Biokirmete ennetamisel on oluline kinni pidada sanitatsiooni standardsetest tövõtetest ning sanitatsiooni efektiivsust pinnaproovide analüüsimisega regulaarselt hinnata;
- Teadmine, et biokirmed võivad pindadele tekkida suhteliselt lühikese aja jooksul, peab olema aluseks ettevõtte sanitatsiooni programmide planeerimisel ja rakendamisel.

## Kasutatud kirjandus

- Aalto-Araneda, M., Lunden, J., Markkula, A., Hakola, S., Korkeala, H. 2019. Processing plant and machinery sanitation and hygiene practices associate with *Listeria monocytogenes* occurrence in ready-to-eat fish products. *Food Microbiology*, 82, 455–464.
- Adetunji, V. O., & Isola, T. O. 2011. Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp on wood, steel and glass surfaces. *Global Veterinarian*, 6(1), 6–10.
- Agle, M.E. 2007. Biofilm in the food industry, In: H.P. Blaschek, H.H. Wang, M.E. Agle (Eds.) *Biofilms in the food environment*. Blackwell Publishing. pp. 3–17.
- Anand, S., Singh, D., Avadhanula, M., Marka, S. 2014. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 13, 18–33.
- Arnold, J. W., Boothe, D. H., Suzuki, O., & Bailey, G. W. 2004. Multiple imaging techniques demonstrate the manipulation of. *Journal of Microscopy*, 216(3), 215–221.
- Araújo, P., Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., & Simões, M. 2011. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 826–834.
- Baumann, A. R., Martin, S. E., & Feng, H. 2009. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *Journal of food Protection*, 72(6), 1306–1309.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 27, 1017–1032.
- de Carvalho, C. C. C. R. 2007. Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), 49–57.
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., Raposo, A. 2021. Microbial biofilms in the food industry – a comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 1–31, <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
- Chaturongkasumrit, Y., Takahashi, H., Keeratipibul, S., Kuda, T., & Kimura, B. 2011. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control*, 22(12), 1893–1899, Elsevier Ltd.
- Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8), 853e859, Elsevier Ltd.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Aldo Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. 2017. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens*, 6, 41; doi:10.3390/pathogens6030041.
- Costerton, J. W., 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.*, 15(3), 137–140.
- Di Bonaventura, G.; Piccolomini, R.; Paludi, D.; D’Orio, V.; Vergara, A.; Conter, M.; Ianieri, A. 2008. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1552–1561.
- Dobell, C. F.R.S. 1932. Antony van Leeuwenhoek and his “Little Animals”: being some Account of the Father of Protozoology and Bacteriology and his Multifarious Discoveries in these Disciplines, *Nature*, 130, 679–680.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881e890, Centers for Disease Control and Prevention.
- Donlan, R. M., Costerton, J. W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15(2), 167–193.
- Dosti, B., Guzel-Seydim, Z., & Greene, A. K. 2005. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 19–24.

- Dutra, T.V.; Fernandes, M.D.; Perdoncini, M.R.F.G.; dos Anjos, M.M.; Abreu Filho, B.A.D. 2018. Capacity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to produce biofilm on stainless steel surfaces in the presence of food residues. *J. Food Process. Preserv.*, 42, e13574.
- EFSA and ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2019;17(12):5926.
- Exner, M., Tuschewitzki, G. J., & Scharnagel, J. 1987. Influence of biofilms by chemical disinfectants and mechanical cleaning. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Serie B, Umwelthygiene, Krankenhaushygiene, Arbeitshygiene, präventive Medizin*, 183(5e6), 549–563.
- 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, 150–170.
- Fagerlund A, Langsrud S, Schirmer BCT, Møretrø T, Heir E. 2016. Genome Analysis of *Listeria monocytogenes* Sequence Type 8 Strains Persisting in Salmon and Poultry Processing Environments and Comparison with Related Strains. *PLoS One*, 11:e0151117 doi: 10.1371/journal.pone.0151117
- Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 623–633
- FSIS, Food Safety and Inspection Service of the United States Department of Agriculture. 2014. FSIS *Listeria* Guideline, FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products, pp. 143.
- 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.
- Guðbjörnsdóttir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. 2005. Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 55–61.
- Hall-Stoodley, L. J., Costerton, W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 95–108.
- Harrand, A.S., Jagadeesan, B., Baert, L., Wiedmann, M., Orsi, R.H. 2020. Evolution of *Listeria monocytogenes* in a Food Processing Plant Involves Limited Single-Nucleotide Substitutions but Considerable Diversification by Gain and Loss of Prophages. *Applied Environmental Microbiology*, 86:e02493 doi: 10.1128/AEM.02493–19.
- Holah, J. T., Taylor, J. H., Dawson, D. J., Hall, K. E. 2002. Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 111S–120S.
- Khardre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J.-G. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, 66(9), 1242–1252.
- Kim, K. Y., Frank, J. F. 1995. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *J. Food. Prot.*, 58(1), 24–28.
- Kuda, T., Yano, T., & Kuda, M. T. 2008. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 988–993.
- Kumar, C. G., Anand, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in the food industry: A review. *Int J Food Microbiol*, 42, 9–27.
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon C., Lecuit, M. 2019. *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 1k. 74-81.

- Leong D, Alvarez-Ordóñez A, Jordan K. 2014. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Front Microbiol*, 5:436 doi: 10.3389/fmicb.2014.00436.
- Lindsay, D.; von Holy, A. 2006. What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *Br. Food J.*, 108, 27–37.
- Maaeluministri 25.02.2021 määrus nr 21 “Ettevõtte ehituse, projektlahenduse ja seadmete hügieeninõuded toidu väikesemahulisel käitlemisel”. RT I, 04.03.2021, 3.
- Martínez-Suárez, J.V., Ortiz, S., Lopez-Alonso, V. 2016. Potential impact of the resistance to quaternary ammonium disinfectants on the persistence of the *Listeria monocytogenes* in food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 638.
- Manish, A., Muriana, P.M. 2019. Efficacy of commercial sanitizers used in food processing facilities for inactivation of *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *Salmonella* biofilms. *Foods*, 8, 639; doi:10.3390/foods8120639.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 327–356.
- Mäesaar, M., Mamede, R., Elias, T., Roasto, M. 2021. Retrospective use of Whole-Genome Sequencing expands the multicountry outbreak cluster of *Listeria monocytogenes* ST1247. *International Journal of Genomics*, <https://doi.org/10.1155/2021/6636138>.
- NHS, National Health Service in England. UK standards for microbiology investigations. Identification of *Listeria* species, and other non-sporing gram-positive rods (except *Corynebacterium*). *Bacteriology*, 2014, Issue No. 3.1, pp. 9–10.
- Pometto, A. L., Demirci, A. Preface. In: Anthony L. Pometto and Ali Demirci (Eds.) *Biofilms in the Food Environment*. 2015. IFT Press, Wiley Blackwell, xii-xiv.
- Reis-Teixeira, F.B.D.; Alves, V.F.; de Martinis, E.C.P. 2017. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 587–591.
- Roasto, M. 2021. Öppematerjal veterinaarmeditsiini üliõpilastele: “Toidu tootmishügieeni ja sanitatsiooni alused” ning “Tootmiskeskkonnast provide võtmise”. Eesti Maaülikool, Tartu.
- Roasto, M. 2011. Biofilmid tootmishügieeni mõjutava faktorina. Raamatus: M. Roasto, M. Breivel ja P. Dreimann (Autorid) *Toiduainetööstuse tootmishügieen*. Halo kirjastus, Ecoprint. ISBN: 978-9949-429-27-1. Lk. 105–114.
- da Silva, P. M. B., Acosta, E. J. T. R., de Rezende Pinto, L., Graeff, M., Spolidorio, D. M. P., Almeida, R. S., et al. 2011. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses*, 54(6), e712–e717.
- Simpson, G.D., Laxton, G.D., Miller, R.F., Clements, W.R. 1993. A Focus on Chlorine Dioxide: The 'Ideal' Biocide. *Corrosion* 93, 8–12.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. 2006. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts*, 84(4), 338–345.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Sinde, E., & Carballo, J. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17, 439–447.
- Srey, S.; Jahid, I. K.; Ha, S. D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572–585.

- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., & Svabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428–432.
- Storgards, E., Simola, H., Sjöberg, A.-M., & Wirtanen, G. 1999. Hygiene of gasket materials used in food processing equipment part 1: new materials. *Food and Bioproducts Processing*, 77(2), 137–145.
- Tang, L.; Pillai, S.; Revsbech, N.P.; Schramm, A.; Bischoff, C.; Meyer, R.L. 2011. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. *Biofouling*, 27, 111–121.
- Tachikawa, M., Yamanaka, K., & Nakamuro, K. 2009. Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone: Science & Engineering*, 31(1), 3–9.
- Yu, T., Jiang, X., Zhang, Y., Shengdong, J., Gao, W., Shi, L. 2018. Effect of benzalkonium chloride adaption on sensitivity to antimicrobial agents and tolerance to environmental stresses in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2018.02906, 1–14.
- Wang, R.; Kalchayanand, N.; Bono, J.L. 2015. Sequence of colonization determines the composition of mixed biofilms by *Escherichia coli* O157:H7 and O111:H8 strains. *J. Food Prot.*, 78, 1554–1559.
- Ward, T.J., Gorski, L., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Hutchins, J., Pupedis, K. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(15), pp. 4994–5002.
- Watnick, P., Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182(10), 2675–2679.
- Wirtanen, G., Storgaerds, E, Mattila-Sandholm, T. 2003. Biofilms. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., Trugo, L. & Finglas, P. (Eds). London: Academic Press. 484–489. ISBN: 0-12-227055-X.
- Wirtanen, G., Salo, S. 2007. Microbial sampling of surfaces in direct and indirect contact with products processed. In: Gun Wirtanen and Satu Salo (Eds.) *Detection and Identification of Harmful Microbes*. VTT, Edita Prima Oy, Helsinki, Finland, 11–14.