

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA OSAKOND

**Toiduainetööstustes ringlevate bakterite biokile tekitamise võimekus,
antibiootikumiresistentsus ja biokile biotsiidi tundlikkus**

Magistritöö

30 EAP

Liina Kuus

Juhendajad PhD Jelena Štšepetova

PhD Epp Songisepp

Tartu 2024

Toiduainetööstustes ringlevate bakterite biokile tekitamise võimekus, antibiootikumiresistentsus ja biokile biotsiidi tundlikkus

Toiduainetööstustes ringlevad bakterid võivad moodustada biokilet, mis kinnitub tööstuse pindadele ning on vastupidav biotsiidide toimele. Biokiled loovad ka sobivad tingimused antibiootikumiresistentsuse levikuks ning seetõttu on oluline kaardistada tööstuses toimuvat. Käesoleva uuringu eesmärgiks oli toiduainetetööstuses prevaleerinud bakterite biokile tekitamise võimekuse uurimine ja nende tekitatud biokilede biotsiiditundlikkuse väljaselgitamine. Lisaks kaardistada uuritavate tüvede antibiootikumiresistentsus ning leida võimalikke seoseid antibiootikumiresistentsuse ning biokile tekitamisel. Leiti, et puu- ja köögiviljatööstuste *Bacillaceae* sugukonda kuuluvad tüved suutsid moodustada kõige tugevamat biokilet võrreldes teiste toiduainetetööstuste tüvedega. Kõige efektiivsemaks biotsiidiks biokile massi eemaldamises ja biokiles olevate bakterite metaboolse aktiivsuse allasurumises oli aluse ja happe töötlus. Leiti, et biokile teket soodustab resistentsus kolme või enama antibiootikumi suhtes ja/või antibiootikumiresistentsuse puudumine.

Märksõnad: biokile, biotsiiditundlikkus, antibiootikumresistentsus

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The biofilm-forming ability of bacteria circulating in the food industries, their antibiotic sensitivity, and the sensitivity of biofilms to biocides

Bacteria circulating in the food industries can form biofilms that adhere to industrial surfaces and resist the effects of biocides. Biofilms create suitable conditions for the spread of resistance, making it crucial to map what is happening in the industries. The aim of this study was to investigate the biofilm-forming ability of bacteria prevalent in the food industries and to determine the biocide sensitivity of the biofilms they produce. The study aimed to map the antibiotic resistance of the strains under investigation and to find possible connections between antibiotic resistance and biofilm formation. It was found that strains belonging to the *Bacillaceae* family in the fruit and vegetable industries were capable of forming the strongest biofilms compared to strains from other food industries. The most effective biocide for removing biofilm mass and suppressing the metabolic activity of bacteria within the biofilm was alkaline and acidic treatment. It was found that biofilm formation is facilitated by resistance to three or more antibiotics and/or the absence of antibiotic resistance.

Keywords: biofilm, biocide susceptibility, antibiotic resistance

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Toiduhügieeni tagamine ja toidu riknemisega seotud organismid	7
1.2 Antibiootikumiresistentsuse levik ning toiduainetööstuse roll levikus	8
1.3 Biokile ja antibiootikumiresistentsuse vahelised seosed	9
1.4 Fenotüübilise antibiootikumiresistentsuse määramine <i>in vitro</i> tingimustes	10
1.5 Biokile struktuur	10
1.6 Biokile tekke etapid	11
1.7 Biokile teket mõjutavad faktorid toidukäitlemise ettevõtetes	12
1.7.1 Pinna topograafia ja materjali koostis	13
1.7.2 Temperatuur ja pH	13
1.7.3 Desinfitseerimise plaanid ja toitainete kättesaadavus	13
1.8 Biokile kontrolli strateegiad tööstustes	14
1.8.1 Toiduaine tööstustes kasutusel olevad kemikaalid	14
1.9 Biokile biotsiidi tundlikkus	15
1.10 Biokile uurimise võimalused	16
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1 Töö eesmärgid	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Uuritavad tüved	18
2.2.2 Antibiootikumiresistentsuse määramine	19
2.2.3 Biokile biotsiiditundlikkuse määramine.....	20
2.2.4 Andmete analüüs	22
2.3 Tulemused ja arutelu.....	24
2.3.1 Mikroobide varieeruvus toidukäitlemise ettevõtte profiilist sõltuvalt.....	24
2.3.2 Mikroobitüvede biokile moodustamise võimekus sugukondade kaupa	26
2.3.3 Tüvede biokile tekitamise võimekus toiduainetööstuste kaupa	30
2.3.4 Biotsiidi mõju biokile massile ja metaboolsele aktiivsusele	32
2.3.5 Biokile parameetrite ja biotsiidide vaheline korrelatsioon	34
2.3.6 Isoleeritud bakteritüvede antibiootikumiresistentsus	36
2.3.7 Tüvede biokile tekitamise ja antibiootikumiresistentsuse vahelised seosed	40

3	KOKKUVÕTE	43
	SUMMARY	45
	TÄNUSÕNAD	47
	KIRJANDUSE LOETELU.....	48
	Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	57

KASUTATUD LÜHENDID

AMR	antimikroobne resistentsus (ingl antimicrobial resistance)
Cfu	kolooniat moodustav ühik (ingl colony forming unit)
CIP	<i>clean-in-place</i>
CV	kristallviolet (ingl crystal violet)
EFSA	Euroopa Toiduohutusamet (ingl European Food and Safety Authority)
EPS	rakuvälised polümeersed komponendid (ingl extracellular polymeric substances)
HACCP	kriitilise kontrollpunkti põhimõtted (ingl Hazard Analysis and Critical Control Point)
MIK	minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon
OD	optiline tihedus (ingl optical density)
SSO	riknemisega seotud organismid (ingl specific spoilage organisms)
TTC	2,3,5-trifenüültetrasooliumkloriid
WHO	Maailma Tervise Organisatsioon (ingl World Health Organization)

SISSEJUHATUS

Toiduainetööstus seisab silmitsi oluliste väljakutsetega tootmishügieeni säilitamisel ja toote ohutuse tagamisel biokiled olemasolu tõttu toidukäitlemise keskkonnas. Biokiled on kompleksed mikroobikooslused, mis kinnituvad pindadele ja moodustavad ekstratsellulaarsete polümeersete ainetega kaetud kaitsekihi (Flemming & Wingender, 2010; Satpathy et al., 2016).

Biokile struktuurid võivad tekkida mitmesugustel pindadel toidu töötlemise etappides, sealhulgas seadmetel, torustikes ja toote pakkematerjalidel. Biokile tekkimist mõjutavad kasvukeskkond ja bakterite genoom ning erinevate desinfitseerimismeetodite tõttu muutuvad tööstuslikud biokiled keemilisele töötlusele üha vastupidavamaks (Hall-Stoodley et al., 2004).

Antibiootikumiresistentsus on suureks probleemiks tervishoiusüsteemis. Antibiootikumide liigne kasutamine inimestel, loomadel ja ka põllumajanduses on viinud antibiootikumiresistentsuse tõusuni ning multiresistentsete tüvede tekkeni. Suurem rõhk toiduainetööstuses on toiduseoseliste patogeenide tuvastamisel, kuid tööstuste biokiled loovad potentsiaalse keskkonna resistentsus geenide ülekandeks ning seega on oluline seirata ka sanitaarnäitlike mikroobide resistentsuse ulatust.

Käesoleva uuringu üldeesmärk oli saada ülevaade erinevate toidukäitlemise ettevõtete (piim, liha, pagaritooted, köögi- ja puuviljatooted) tootmiskeskkonnas ringlevatest toidu kvaliteeti mõjutavatest universaalsetest ja ettevõtte-profiili-põhistest unikaalsetest sanitaarnäitlikest mikroobidest, hinnata nende biokile tekitamise võimet ja tundlikkust tööstuses enimkasutatavate desinfitseerimisvahendite suhtes ning tundlikkust inim- ja veterinaarmeditsiinis kasutatavate antimikroobsete preparaatide suhtes. Uuritavad mikroobitüved isoleeriti BioCC OÜ projekti ResTA24 „Kaasaegse interdistsiplinaarse kuluefektiivse toiduohutuse ja toidukvaliteedi seireprogrammi disainimine toidutööstustele“ raames.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Toiduhügieeni tagamine ja toidu riknemisega seotud organismid

Euroopa Parlamendi ja Nõukogu määrus (EÜ) nr 852/2004 defineerib toiduhügieeni, kui meedet ja tingimusi ohtude ohjamiseks ning toidu kõlblikkuse tagamiseks inimtoiduks, võttes arvesse selle otstarbekohast kasutust. Toiduainete hügieeni tagamiseks on Euroopa Liidu Parlamendi ja Komisjoni poolt alates 2004. aastast kehtestatud reeglid, mille eesmärk on tagada ühtne hügieenipoliitika, mis kohaldub kõikidele toiduainetele ja kõigile toidu käitlejatele kogu toiduahelas lähtudes põhimõttest „talust taldrikule“. Toiduohutuse tagamine viiakse ellu peamiselt ennetava tegevusega rakendades head hügieenitava ning ettevõtetes on sisse viidud ohuanalüüs ning kriitilise kontrollpunkti (*Hazard Analysis and Critical Control Point*, HACCP) põhimõtted.

Komisjoni määruse (EÜ) nr 2073/2005 kohaselt on jagatud toiduainete mikrobioloogilised kriteeriumid kahte klassi: toiduohutuskriteeriumid ning protsessi hügieenikriteeriumid. Toidud on kategoriseeritud vastavalt: liha ja lihatooted, piim ja piimatooted, munatooted, kalandustooted, köögivilid, puuvilid ja nendest valmistatud tooted. Regulatsiooni alusel seiratavate mikroobide jaotumus toiduainete gruppide kaupa on toodud Tabelis 1.

Tabel 1. Komisjoni määruse (EÜ) nr 2073/2005 alusel seiratavad toiduainete mikrobioloogilised kriteeriumid.

Toiduainegrupp	Toiduohutuskriteeriumi seiratavad bakterid	Protsessi hügieenikriteerium seiratavad bakterid
Liha ja lihatooted	<i>Salmonella</i>	Aeroobsete mikroorganismide üldav Enterobakterid <i>Salmonella</i> <i>E.coli</i>
Piim ja piimatooted	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Salmonella</i>	Enterobakterid <i>E.coli</i> Koagulaaspositiivsed stafülokokid
Köögivilid, puuvilid ja nendest valmistatud tooted	<i>Salmonella</i>	<i>E.coli</i>
Munatooted	<i>Salmonella</i>	Enterobakterid
Kalandustooted	<i>Echerichia coli</i>	<i>E.coli</i> Koagulaaspositiivsed stafülokokid

Komisjoni määrus (EÜ) 2073/2005 arvestab ainult liha ja lihatoodetel protsessi hügieenikriteeriumite juures aeroobseid mikroorganisme, mis on seotud toidu riknemisega.

Teiste toidugrupidel puhul sarnast kriteeriumit pole sätestatud ning tootjad peavad ise lähtuvalt oma toidumaatriksist tegema kindlaks toidu säileaega mõjutavad mikroobid.

Euroopa Toiduohutuseamet (*European Food and Safety Authority*, EFSA) defineerib toidu riknemisega seotud organisme (*specific spoilage organisms*, SSO), kui osa toidu mikrobiotast, mis põhjustab kindlas toiduaine grupis määratud tingimustel riknemist (BIOHAZ et al., 2020). Määratud tingimuste all on mõeldud, et toote omadustest, säilitamistingimustest ning algsest toidu mikrobiomist sõltub, kui kiiresti SSO-d paljunevad ning suudavad toota metaboliite, mis põhjustavad toidu maitse või tekstuuri muutusi. Näiteks liha puhul pakendamata tootel on domineerivaks liigiks alguses *Brochothrix thermosphacta*, kuid toote seistes kujuneb domineerivaks *Pseudomonas* spp. Vaakumpakendatud toodete puhul on aeroobsete bakterite kasv pärsitud, mis loob sobiva keskkonna hoopis piimhappebakterite kasvule, mis põhjustavad toote lõhna ja välimuse muutust fermentatsiooni tõttu (Nychas et al., 2008).

SSO piisavaks koguseks toiduriknemise põhjustamiseks loetakse vahemikku $10^6 - 10^8$ cfu/g toote kohta (BIOHAZ et al., 2020). Määratud vahemikus suudavad bakterid piisavas koguses metaboliite toota, et põhjustada toote riknemist. SSO arvukus sõltub toidainete kättesaadavusest. Enamus baktereid eelistavad fermenteerida süsivesikuid ning hakkavad valke hüdrolyüsima alles siis kui süsivesikud on otsa saanud. Toote maitsemuutused tulenevad enamasti valkude hüdrolyüsist. Süsivesikutevaeses toidus võib SSO sisaldus riknemise põhjustamiseks olla madalam kui 10^6 cfu/g (Loy-Hendrickx et al., 2018; Nychas et al., 2008).

1.2 Antibiootikumiresistentsuse levik ning toiduainetööstuse roll levikus

Maailma Tervise Organisatsioon (*World Health Organization*, WHO) andmetel on antibiootikumiresistentsus (*antimicrobial resistance*, AMR) globaalne probleem, mis „*One Health*“ printsiibist lähtudes haarab enda alla inimtervise, loomade tervise, toidutootmise ning keskkonna sektori „*One Health*“ printsiip võtab arvesse, et AMR tõus on seotud sektorite vahelise resistentsusgeenide vertikaalse (bakteri pooldumisel tütarakkudele) või horisontaalse ülekandega (WHO et al., 2023). Horisontaalseks geenide ülekandeks on kolm erinevat võimalust:

1. Konjugatsioon – geneetiliselt mobiilsete elementide (plasmiid, transposoon, geenikassett) liikumine bakterirakkude vahel.
2. Transduktsioon – geenide ülekande toimub bakteriofaagi vahendusel.
3. Transformatsioon – bakterirakust eraldunud vaba DNA võetakse teise bakteri poolt rakku sisse.

Resistentsuse levik geenide kaudu võib toimuda toidutootmisahela erinevates etappides. Enamus teaduskirjanduse andmetest kajastab toidupatogeenide (*Salmonella* spp., *E.coli*, *S.aureus* jt) biokile ja resistentsuse vahelisi seoseid ning AMR ülekandeteid. Väga vähe on uuritud SSO-de antibiootikumiresistentsust ja biokile teket, kuigi SSO-d on samuti potentsiaalsed resistentsusgeenide kandjad ja levitajad (de Brito et al., 2022; Vikesland et al., 2019).

1.3 Biokile ja antibiootikumiresistentsuse vahelised seosed

Biokile moodustumise ja antibiootikumiresistentsuses vahelised seosed on kombineeritud mitmetest mehhanismidest. Mikroobide pinnale kinnitumisel või agregatsioonil muutub geenide ekspressioon ning kujuneb välja biokile spetsiifiline fenotüüp, mis suurendab biokiles olevate rakkude vastupanu antibiootikumidele.

Biokilega seotud antibiootikumiresistentsuse mehhanismid on järgnevad:

- Biokile ekstratsellulaarne maatriks takistab antibiootikumi sihtmärk rakuni (Hoyle et al., 1992).
- Biokiles olevate mikroobirakkude populatsiooni heterogeensus. Biokile küpsedes on toitainete ning hapniku osakaalud erinevad, sellest tingituna ka rakkude metaboolne aktiivsus varieerub ning antibiootikumid mõju on nõrgem metaboolselt inaktiivsematele rakkude vastu (Walters et al., 2003).
- Biokile spetsiifiline fenotüüp mõjutab valkude ekspressiooni. Biokile küpsedes rakkude tiheduse suurenemine ja toitainete vähenemine mõjutab geenide ekspressiooni erinevates etappides. Liigil *Pseudomonas aeruginosa* on kirjeldatud erinevate geenide aktiveerumist või allasurumist, mis mõjutavad antibiootikumide afiinsust rakkudele, *effluks* pumpade süsteemi aktiveerumist või stressi vastust (Whiteley et al., 2001).
- Püsirakkude (*persister cells*) populatsiooni teke biokiles keskkonna mõjuritega kokkupuutel. Näiteks on leitud, et *P. aeruginosa* biokile rakkude resistentsuse muutub antibiootikumi kontsentratsiooni muutmisel. Tuvastati, et madala antibiootikumi kontsentratsioon juures hävis suur osa populatsioonist, kuid ellu jäänud soikeseisundis olev alampopulatsioon osutus tugevalt resistentseks ning oli võimeline moodustama uue biokile. Selliseid biokile alampopulatsioone nimetatakse püsirakkudeks (Brooun et al., 2000).

- Resistentsuse omandamine horisontaalse geeniulekande teel. Biokile kõrges rakupopulatsioonis on ka mobiilseid geneetilisi elemente rohkem, mis loob soodsad tingimused geenide ülekandeks. Biokile tekitamise võimekuse ja antibiootikumiresistentsuse vahel on varasemalt leitud seoseid liigil *Campylobacter jejuni* (Fux et al., 2005; Ma et al., 2021).

1.4 Fenotüübilise antibiootikumiresistentsuse määramine *in vitro* tingimustes

Antibiootikumiresistentsuse määramiseks kasutatakse minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIK) meetodit. MIK on madalaim kontsentratsioon, mis määratud *in vitro* tingimustes takistab bakterite nähtavat kasvu kindla aja jooksul. MIK väärtuste interpretatsiooniks on Euroopa Antimikroobse Tundlikkuse Testimise Komitee (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST*) välja töötanud juhisdokumendid, mille väärtused kontrollitakse üle kord aastas. EUCAST (2024a) dokumendis on erinevate bakterigruppide MIK tulemuste epidemioloogilised piirväärtused (*epidemiological cut-off values, ECOFF*) ning lisatud on bakterite loomupärased resistentsused. EUCAST (2024b) poolt on välja antud lisa juhisdokument bakteritele, mille kohta ECOFF väärtused puuduvad. Vastavalt nendele piirnormidele jagatakse MIK tulemused kolme tundlikkuse kategooriasse: S – tundlik (*susceptible*), I – tinglikult tundlik (*intermediate*), R – resistentne (*resistant*).

Sugukond *Lactobacillaceae* ECOFF väärtused puuduvad, kuid EFSA (2018) poolt on publitseeritud juhendmaterjal söödalisandite ning toidutoomiseks kasutatavate bakterite antibiootikumiresistentsuse hindamiseks. EFSA (2018) juhendmaterjal jagab MIK tulemused kaheks: S – tundlik ja R – resistentne.

Selles magistritöös on tulemuste interpretatsiooniks kasutatud kõiki ülalnimetatud juhisdokumente, et anda ülevaade tööstuses ringlevate bakterite antibiootikumiresistentsusest.

1.5 Biokile struktuur

Biokile on pinnale kinnitunud mikroorganismide kogum, mis on ümbritsetud ekstratsellulaarse maatriksiga (Donlan, 2002; Hall-Stoodley et al., 2004). Ekstratsellulaarne maatriks moodustab üle 90% biokile massist ning selle alla kuuluvad mitmed erinevad rakuvälised polümeersed komponendid (*extracellular polymeric substances, EPS*) (polüsahhariidid, valgud, ekstratsellulaarne DNA, ensüümid, fosfolipiidid), millele on leitud seosed biokile järgnevatele funktsioonidele: adhesioon, mikroobirakkude agregatsioon, ensümaatiline aktiivsus, biokile

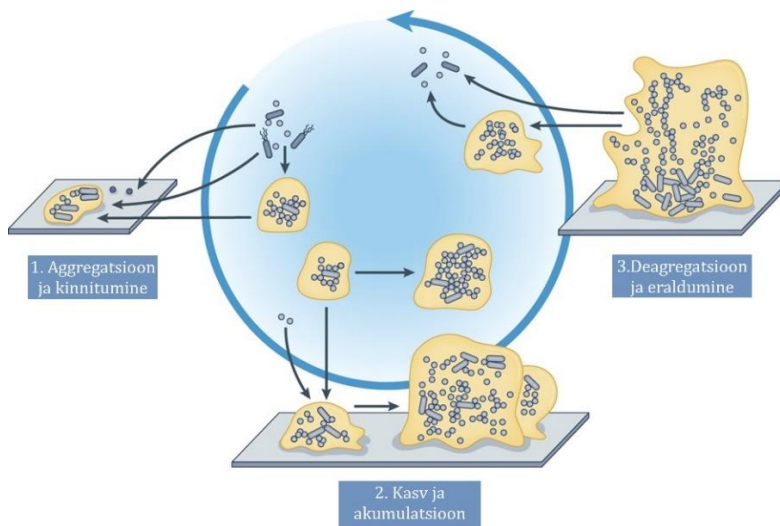
koherentsus, toitainete akumulatsioon, geneetiline info vahetamine jt (Flemming & Wingender, 2010; Hall-Stoodley et al., 2004).

Fimbriad ja viburid mängivad olulist rolli biokile struktuuri moodustamisel. Uuringud mutantsete tüvedega (fimbriateta tüved) näitasid, et fimbriate puudumine pärsib *Acinetobacter baumannii* kinnitumist pinnale ja seeläbi takistab biokile teket ning *Enterococcus faecalis* tekitatud biokiles põhjustab fimbriate puudumine defekte biokile struktuuris (Luo et al., 2015; Nallapareddy et al., 2006). Mikroobide viburit on seostatud biokile tekke initsiatsiooniga, sidudes rakke omavahel kokku moodustades rakuagregaatide. Lisaks mängib vibur olulist rolli biokile tekke etappides. Biokile tekkeprotsessis inhibeeritakse mikroobiraku liikuvust läbi signaalimoekuli (c-di-GMP) kontsentratsiooni tõusu, mis omakorda soodustab biokiles ekstratsellulaarsete polümeeride produktsiooni (Guttenplan et al., 2013; Serra et al., 2013).

1.6 Biokile tekke etapid

Biokile võib kinnituda erinevatele pindadele: eluskudedele, roostevabast terasest pindadele (nt meditsiinilised instrumendid, toiduainetööstuse seadmete pindadele), veetorude siseseintele jm. Kinnitumine sõltub mitmetest keskkonnanafaktoritest: pinna struktuurist, materjalist, temperatuurist, pH-st, antimikroobsete ühendite olemasolust, pinnal olevatest toitainetest (Donlan, 2002).

Sauer et al., (2002) kirjeldasid biokile moodustamise etappe liigil *P. aeruginosa*, kuid kakskümmend aastat hiljem hindasid samad autorid väljatöötatud mudelit ebapiisavaks. Eelnev mudel ei võtnud arvesse erinevate keskkondade mõju biokile tekkele ning ka erinevaid agregatsiooni ja eraldumise mehhanisme (Sauer et al., 2022). Uuendatud biokile tekke mudel on kujutatud Joonisel 1.



Joonis 1. Uuendatud biokile tekke mudel. Välimine ring iseloomustab pinnale kinnituva biokile etappe ning sisemine ring vedelikus tekkiva biokile etappe (allikas: Sauer et al., 2022).

Joonis 1. kajastatud mudeli eesmärk on rõhutada erinevaid biokile tekke variante *in vitro*, *in situ* ja *in vivo* süsteemis. Mudel kirjeldab kolme põhisündmust, mis iseloomustab ja esindab enamikke biokile stsenaariume sõltumata ajast ja küpsusest.

1. Bakterid kleepuvad üksteise külge või kinnituvad pindadele, moodustades nii biotilisi kui ka abiotilisi agregate.
2. Agregeerunud ja kinnitunud bakterikolooniate arvukus tõuseb kasvu ja ümbritsevate rakkude arvelt.
3. Sõltuvalt bakterite mehhanismidest toimub eraldumine agregaatidena või üksikute rakkudena.

Biokile tekke puhul mängib olulist rolli rakk-rakk vaheline signaalsüsteem, mille kaudu on bakterid võimelised reguleerima populatsiooni tihedust. Seda nähtus nimetatakse kvoorumtunnetuseks. Mehhanismis saavutatakse keemiliste signaalide ehk autoindutseerijate vahendusel, mis reguleerivad geeniekspressiooni ning vahendavad kvoorumtunnetust (Kaplan & Greenberg, 1985).

1.7 Biokile teket mõjutavad faktorid toidukäitlemise ettevõtetes

Toiduainetööstuses kujutab biokile teke olulist väljakutset, kuna see võib põhjustada toiduainete saastumise toote riknemist põhjustavate mikroobidega, mis mõjutavad toote organoleptilisi omadusi ning võivad olla tervisekahjulikud tarbijale. Erinevad keskkonnategurid mängivad olulist rolli biokile arengu ja püsivuse mõjutamisel toiduainete

töötlemise pindadel. Nende hulka kuuluvad pinna topograafia, materjali koostis, tööstuse temperatuur, pH, antimikroobsete ühendite olemasolu ja toitainete kättesaadavus. Nende tegurite omavahelise mõju mõistmine on oluline tõhusate biokile kontrollimeetmete rakendamiseks toiduainetööstuses (Duanis-Assaf et al., 2016; Shi & Zhu, 2009).

1.7.1 Pinna topograafia ja materjali koostis

Toiduainetööstuse seadmete ja pakendi materjalide pindade struktuur ja koostis võivad oluliselt mõjutada biokile teket. Ebaregulaarsed pinnad, pinna kahjustused (kriimustused) või karedad tekstuurid pakuvad bakterite kinnitumise ja biokile tekkimise kohti. Erinevate materjalide pinnaomadused näiteks pooride suurus, võib mõjutada biokile teket. Seosed tööstuses kasutatavate pindade ja biokile tekke vahel on laialdaselt uuritud, kuid saadud tulemused on vastuolulised, mis viitab, et pinna omadused ei ole otsustav faktor biokile tekke osas. Näiteks on leitud, et roostevabast terasest pinnad toetavad biokile teket toiduainetööstuse keskkondades, rõhutades vajadust suunatud sekkumiste järele mikroobse kleepumise ja biokile tekkimise leevendamiseks sellistel pindadel (Carrascosa et al., 2021).

1.7.2 Temperatuur ja pH

Toiduainetööstuse keskkonnatingimused, sealhulgas temperatuur, niiskus ja toiduainete pH tase, mängivad olulist rolli biokile tekkes. Optimaalsed temperatuuri- ja pH-vahemikud loovad soodsad tingimused bakterite pinnale kinnitumiseks ja biokile arenguks, tekitades märkimisväärseid väljakutseid pindade hügieenitaseme säilitamisel toidu tootmisega seotud keskkondades (Alvarez-Ordóñez et al., 2019).

1.7.3 Desinfitseerimise plaanid ja toitainete kättesaadavus

Pesuskeemid ja antimikroobsete ühendite kasutamine on tarvilik ennetamiseks biokile teket ning biokile eemaldamiseks. Kuigi pesuskeemide eesmärk on eemaldada tootmise jäägid, võib ebaefektiivse süsteemi korral jääda liigselt toitaineid, mis soodustab mikroobide kasvu. Biotsiidide ebapiisav kontakiaeg võib kaasa aidata resistentsemate mikroobide arengule. Ebapiisava kontakiaja puhul hävinevad planktoonilised rakud, kuid biokile püsirakud jäävad ellu. Lisaks võib toitainete kättesaadavus töötlemispindadel toetada mikroobide kasvu ja biokile teket, rõhutades range ja regulaarse puhastamise ja sanitaartavade tähtsust biokile tekkest

tingitud saaste vältimiseks toiduainetööstuses. Tooraine koostis omakorda mõjutab bakterite biokile tekitamise võimet. On leitud, et piimatööstuses leviv ja toodete riknemist põhjustav *B. subtilis*-el aktiveerib laktoos kvoorumtunnetuste süsteemi ning seeläbi soodustab biokile teket (Carrascosa et al., 2021; Duanis-Assaf et al., 2016).

1.8 Biokile kontrolli strateegiad tööstustes

Clean-in-place (CIP) ehk ringpesu on meetod, mida kasutatakse erinevates tööstusharudes, sealhulgas toidu- ja joogitööstuses, farmaatsias ja kosmeetikas, et puhastada seadmeid ja torustikke neid lahti võtmata. See on automatiseeritud protsess, mis võimaldab efektiivset puhastamist töötlemisseadmetest, mahutitest ja torustikest, tagades, et need vastaksid hügieenistandarditele ja oleksid valmis järgmiseks tootmisringiks. Ringpesu on kasutusel suuremates tootmisettevõtetes, kuna on automatiseeritud ning vajavad vähem inimressurssi puhastusetappide läbiviimiseks. Väiksemate tootmismahtude puhul on antud süsteemide ehitamine liiga kulukas ning väiketootjad peavad leidma sobivad meetodid tootmishügieeni tagamiseks (Bremer et al., 2006; Zhu et al., 2022).

1.8.1 Toiduaine tööstustes kasutusel olevad kemikaalid

Kõige enam kasutatav leeliseline kemikaal CIP pesus süsteemis on naatriumhüdroksiid (NaOH) ja happeline kemikaal lämmastikhape (HNO_3). NaOH on efektiivne toidumaatriksist pärit valkude ja süsivesikute eemaldamises, sellele järgneb pesu happega, mis neutraliseerib leelise ning eemaldab mineraalainete jäägid ning seejärel peaks toimuma desinfitseeriv etapp kasutades vesinikperoksiidi (H_2O_2), äädikhapet (CH_3COOH) või peräädikhapet ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$) (Bremer et al., 2006).

NaOH avaldab biokilele erinevat mõju sõltuvalt kontsentratsioonist ja tingimustest. Uuringud näitavad, et NaOH võib nõrgendada biokile mehaanilist stabiilsust, muutes biokile ekstratsellulaarsete polümeersetest ainete eemaldamise pindadelt lihtsamaks. Siiski võib NaOH efektiivsus biokile eemaldamisel olla mõjutatud teguritest nagu temperatuur ja kontsentratsioon. Näiteks näitas uuring, et 1,2% NaOH lahus 66 °C juures 3 minutit oli ebaefektiivne *P. putida* biokile vastu, kuid 2,0% ja 2,5% NaOH kontsentratsioon samadel temperatuuri ja ajatingimustel oli efektiivne. Teisalt uuringutes *Bacillus cereus* biokilega oli efektiivseks kombinatsiooniks aluse ja happe pesu CIP süsteemis tingimustel 1.5% NaOH 65 °C kraadi juures 30 minutit ja 1% HNO_3 65 °C kraadi juures 10 minutit ning vähest biokile

eemaldamist näitas kombinatsioon 1% NaOH 65 °C kraadi juures 10 minutit ja 1% HNO₃ 65 °C kraadi juures 10 minutit. Antud uuringute tulemuste erinevused näitavad, et iga tööstus peaks looma enda ettevõtte põhise desinfitseerimise süsteemi, mis võtab arvesse tööstuse spetsiifilist mikroobioomi ning arvestab ka mikroobide võimekusega adapteeruda kasutatavate kemikaalide suhtes (Antoniou & Frank, 2005; Kumari & Sarkar, 2014).

Toiduainetööstuses kasutatakse etanooli sageli biotsiidina selle antimikroobsete omaduste tõttu. Etanooli toimemehhanismiks on valkude ja lipiidide lagundamine mille tagajärjel hävineb rakumembraan ning mikroob hävineb. Etanool on kõige tõhusam 60-80% vesilahusena, kuna valkude denatureerimine toimub efektiivsemalt vee olemasolul ning selletõttu kõrgemad etanooli kontsentratsioonid on biotsiidina ebaefektiivsemad (CDC, 2019). Etanooli on enamasti kasutusel väiketootmistes, kellel puudub väiksemate tootmismahude tõttu vajadus CIP pesu järele. Suurtootmis-ettevõtted kasutavad etanooli tööpindade desinfitseerimiseks.

Peräädikhape on tööstustes laialdaselt kasutatav biotsiid, mis toimib tugeva oksüdeeriva aienäna ning kahjustab seeläbi biokile ekstratsellulaarset maatriksit ning mikroobirakkude puhul suurenda membraanide läbilaskvust ning põhjustab rakukesta hävimist. Antud toimeaine puhul on varasemad uuringud näidanud, et 0,3% lahus on väga efektiivne nii Gram-positiivsete kui ka Gram-negatiivsete bakterite, *S. aureus* ja *P. aeruginosa* poolt tekitatud biokile vastu (Chino et al., 2017).

Vesinikperoksiid puhul reageerivad hapniku aatomid valkude, lipiidide ja teiste rakukesta ning biokile moekulidega. See põhjustab biokile struktuuri ja rakukesta kahjustumist. Paraku väga paljudel mikroobidel esineb ensüüm katlaasi aktiivsus, mille toimel lagundatakse vesinikperoksiid veeks ja hapnikuks, ning seeläbi väheneb aine antimikroobne toime (Hassett et al., 1999).

1.9 Biokile biotsiidi tundlikkus

Bakterite biokile tekitamise võimet on seostatud biotsiidide efektiivsuse vähenemisega. Antud reaktsioon on kombineeritud mitmete mehhanismide koostoimest:

- Biotsiidide resistentsuse puhul on leitud, et biokile ei käitu barjäärina, vaid ekstratsellulaarse maatriksi komponendid (ensüümid, valgud, süsivesikud) mõjutavad kemikaali efektiivsust. Katalaas on ensüüm, mille toimel vesinikperoksiid lagundatakse veeks ja hapnikuks. *P. aeruginosa* puhul on näidatud, et vesinikperoksiidiga töötlus

hävitab ainult katalaas-negatiivsete rakkude poolt tekitatud biokilet. Katalaas-positiivsete tüvede biokile vastu vesinikperoksiid ei tööta (Stewart et al., 2000).

- Biokile rakupopulatsiooni heterogeensus mõjutab biotsiidide efektiivsust. Mikroobid, mis asuvad perifeersemates osades pääsevad ligi toitainetele ja hapnikule, kuid rakud, mis paiknevad biokile sügavamas kihis on madalama metaboolse aktiivsusega ning stressi vastuse geenid on tugevamalt ekspresseerunud (Sauer et al., 2002; K. D. Xu et al., 2001).
- *Effluks* pumpade geenide aktiveerumist biokiles on seostatud *P. aeruginosa* puhul kõrgenenud resistentsusega biotsiidide vastu, mis sisaldab bensalkooniumkloriidi. *Effluks* pumba inhibiitorite toimel tundlikkus biotsiidi vastu taastus (Amsalu et al., 2020).
- Biokile spetsiifilise fenotüübi teket reguleerib osaliselt kvoorumtunnetus. Hassett et al. (1999) tegid kindlaks, et kvoorumtunnetus reguleerib oksüdatiivse stressi eest kaitsvate ensüümide, katalaasi ja superoksiid dismutaasi geenide regulatsiooni. Antud ensüümid on olulised biotsiidide neutraliseerimiseks.

1.10 Biokile uurimise võimalused

Biokile uurimiseks on mitmeid meetodeid kasutusel. Biokile struktuuri, paksuse ja ruumilise jaotuvuse hindamiseks kasutatakse konfokaalset laserskanneerivat mikroskoopiat. Fluorestsentsmikroskoopiat kasutatakse struktuuri hindamiseks, kuid ka elusate ja surnute rakkude eristamiseks. Enam levinud meetodiks on kujunenud oma hinna ning kerge teostamise tõttu kristallviolett (*crystal violet*, CV) värving (Carrascosa et al., 2021).

CV on katioonne värvaine, mis seondub negatiivselt laetud biomolekulidega, sealhulgas biokile komponentidega. Biokile puhul seondub CV tavaliselt ekstratsellulaarse polümeeriga ja bakterite pinnaga. Pärast värvimist loputatakse mitteseondunud värv ning tulemusi saab hinnata mõõtes optilist tihedust (*optical density*, OD) spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 595 nm. OD on otseses seoses biokile massiga: mida rohkem CV seondub biokile komponentidega, seda suurem on neeldumus ja seega ka biokile moodustumine. CV värvimine võimaldab visualiseerida ja kvantifitseerida biokile moodustumist (Haney et al., 2021).

CV värving ei anna informatsiooni biokiles olevate rakkude metaboolsest aktiivsusest. Selleks kasutatakse 2,3,5-trifenüültetrasooliumkloriid (TTC) meetodit. TTC on värvitu ühend, kuid aktiivsed mikroobirakud kasutavad seda elektronidoonorina oma ainevahetusprotsessides. Aktiivsed mikroobirakud biokiles metaboliseerivad TTC-d, mis viib selle redutseerumiseni

trifenüülformasaaniks (punase värvusega ühend). Mida kõrgem on biokile metaboolne aktiivsus, seda rohkem TTC-d metaboliseeritakse ja seega moodustub rohkem trifenüülformasaani. TTC tulemusi saab kvantifitseerida, mõõtes optilist tihedust spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 500 nm. OD on seoses biokile metaboolse aktiivsusega: suurem neelduvus näitab suuremat metaboolset aktiivsust ja aktiivsete mikroobirakkude olemasolu (Haney et al., 2021).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva uuringu üldeesmärk oli saada ülevaade erineva profiiliga toidukäitlemise ettevõtete (piima-; pagaritoodete, liha-, köögi- ja puuviljatoodete tootjad) tootmiskeskkonnas ringlevatest toidu kvaliteeti mõjutavatest universaalsetest ja ettevõtte-profiili-põhistest unikaalsetest sanitaarnäitlikest mikroobidest. Üldesmärgist lähtuvalt sealt alaeesmärgid:

- Tuvastada toidu kvaliteeti mõjutavate bakteritüvede biokile tekitamise võimekus.
- Hinnata toidu kvaliteeti mõjutavate bakteritüvede biokile tundlikkust tootmispindade desinfitseerimiseks kasutatavate biotsiidide suhtes.
- Välja selgitada, kui palju esineb antibiootikumiresistentsust toidu riknemisega seotud bakteritel.
- Välja selgitada, kas toidu riknemisega seotud bakterite antibiootikumiresistentsusel ja biokile tekitamise vahel on seos.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Uuritavad tüved

Uuritavad bakteritüved isoleeriti BioCC OÜ projekti ResTA 24 "Kaasaegse interdistsiplinaarse kuluefektiivse toiduohutuse ja toidu kvaliteedi seireprogrammi disainimine toidutööstustele" raames (2020-2023). Kokku koguti projekti jooksul proove 8 Eesti toidukäitlemise ettevõttest. Ettevõtted grupeeriti sarnase tooraine kaupa. Tüved isoleeriti piima-; liha-; pagaritoodete-, puu- ja köögiviljatooteid tootvatest ettevõtetest. Mikroobitüved isoleeriti erinevatest tootmisetappidest: toorainest, valmistoodangust ja hügieeniproovidest. Uuringuks valiti isoleeritud tüvede hulgast arvuliselt prevaleerunud ning teaduskirjanduse andmetel sagedamini toodete kvaliteediprobleeme põhjustavad bakteriliigid.

Tüved säilitati -20 °C juures krüoviaali pärlites (Microbank™, Pro-Lab Diagnostics, Canada). Liigid samastati kasutades MALDI-TOF MS (Bruker MicroFlex Biotyper, USA) meetodit. Antibiootikumiresistentsus määrati 152 tüvel 16 antibiootikumi vastu. Biotsiidi efektiivsuse hindamisel oli algselt 171 tüve, andmete ettevalmistuse käigus jäi järele 161 tüve, mis olid sobilikud andmete analüüsiks. Tüvesid oli 77 liiki, mis kuulusid 41 perekonda ja moodustasid 24 sugukonda. Kokku teostati tüvedega 985 eksperimenti.

2.2.2 Antibiootikumiresistentsuse määramine

AST määramine teostati vastavalt (ISO 20776-1:2019) meetodile. Standardist lähtuvalt valmistati 24 h 30 °C juures aeroobselt kasvanud bakteri kultuurist 0,5 McFarland tihedusega, (vastab $1,5 \times 10^8$ cfu/ml), suspensioon steriilsesse füsioloogilisse lahusesse, tihedus mõõdeti nefelomeetriga (Biosan, Läti). Seejärel võeti 10 µl valmistatud suspensiooni ning lisati tuubi, mis sisaldas 11 ml Mueller-Hinton (MH, Biolife, Itaalia) puljongit. Selle lahjenduse käigus saavutati lahus kontsentratsiooniga $1,0 \times 10^5$ cfu/ml. Elektroonilise automaatpipetiga (Sartorius AG, Saksamaa) lisati 50 µl valmistatud lahust antibiootikumi plaatidele. Positiivse kontrollina kasutati inokuleeritud lahust ning negatiivse kontrollina steriilset MH puljongit. Mikroitiiterplaadid kaeti õhuavadega kilega ning inkubeeriti 18 ± 2 h 35 ± 1 °C.

Sugukond *Lactobacillaceae* AST määramiseks kasutati standardmeetodit (ISO 10932:2010). Perekonda *Lactiplantibacillus* ja *Leuconostoc* tüved kasvatati de Man Rogosa Sharpe (MRS, Biolife, Itaalia) söötmel 30 °C 24 h, *Lactococcus lactis* tüved kasvatati M17 (Biolife, Itaalia) söötmel 30 °C 24 h juures. Uuritavatest tüvedest valmistati 1 McFarland tihedusega lahus (vastab $3,0 \times 10^8$ cfu/ml) steriilses füsioloogilises lahuses.

L.lactis tüvedel valmistati saadud lahusest 1000 kordne lahjendus Isosensitest (IST, Oxoid, UK) puljongisse. Saadud lahjendust tihedusega $3,0 \times 10^5$ cfu/ml, pipeteeriti 100 µl elektroonse pipetiga (Sartorius, Saksamaa) eelkaetud plaatidele saades lõppkontsentratsiooniks $3,0 \times 10^4$ cfu/süvendi kohta. Plaadid kaeti kilega ning inkubeeriti mikroaeroobses (10% CO₂) keskkonnas 30 °C 24 h.

Lactiplantibacillus ja *Leucobnostoc* tüvedel valmistati saadud lahusest 1000 kordne lahjendus LAB *susceptibility test medium* (LSM) puljongisse. LSM puljong koosneb 90% IST (Oxoid, UK) puljongist ja 10% MRS puljongist. Saadud lahjendust tihedusega $3,0 \times 10^5$ cfu/ml, pipeteeriti 100 µl elektroonse pipetiga (Sartorius, Saksamaa) eelkaetud plaatidele saades lõppkontsentratsiooniks $3,0 \times 10^4$ cfu/süvendi kohta. Plaadid kaeti kilega ning inkubeeriti mikroaeroobses (10% CO₂) keskkonnas 37 °C 24 h.

Positiivse kontrollina kasutati uuritavate bakteritega inokuleeritud lahust ning negatiivse kontrollina vastavalt steriilset LSM puljongit ja IST puljongit.

AST määramiseks kasutati Sensititer™ (Thermofisher, USA) lüofiliseeritud antibiootikumidega eelkaetud paneele EULACBI1 ja EULACBI2. Lähtuvalt tootja soovitudele kasutati paneelide kvaliteedikontrolliks tüve *Enterococcus faecalis* WDCM 00087. Kvaliteedi

kontrolli tulemused vastasid etteantud normväärtustele. Eelkaetud paneelide antibiootikumide nimekiri ja kontsentratsioonid on välja toodud Tabelis 2.

Tabel 2. Eelkaetud paneelide antibiootikumide nimistu ja nende kontsentratsiooni vahemikud.

Mikrotiiterplaat	Antibiootikum	Antibiootikum perekond	Kontsentratsioonide vahemikud (µg/ml)
EULACBI1	Gentamütsiin	Aminoglükosiidid	0,5–256
	Kanamütsiin	Aminoglükosiidid	2–1024
	Streptomütsiin	Aminoglükosiidid	0,5–256
	Neomütsiin	Aminoglükosiidid	0,12–64
	Tetratsükliin	Tetratsükliinid	0,12–64
	Erütromütsiin	Makroliidid	0,015–8
	Klindamütsiin	Linkosamiinid	0,03–168
	Klooramfenikool	Klooramfenikoolid	0,12–64
EULACBI2	Ampitsilliin	Penitsilliinid	0,03–16
	Penitsilliin	Penitsilliinid	0,03–16
	Vankomütsiin	Glükopeptiidid	0,25–128
	Kinupristiin-dalfopristiin	Streptogramiinid	0,015–8
	Linesoliid	Oksatolidiinid	0,03–16
	Trimetoprim	Dihüdrolaat-reduktaasi inhibiitorid	0,12–64
	Tsiprofloksatsiin	Fluorokinoloonid	0,25–128
	Rifampitsiin	Rifamütsiinid	0,12–64

2.2.3 Biokile biotsiiditundlikkuse määramine

Uuritavate tüvede biokile moodustumist ja biotsiidide biokile vastase efektiivsuse hindamiseks kasutati Haney et al., (2021) kohandatud meetodit.

Uuritavad tüved külvati liigiliselt sobivatele söötmetele: sugukond *Lactobacillaceae* MRS agarsöötmele ning teised liigid Plate Count Agar-le (PCA, Biolife, Itaalia). *Lactobacillaceae* sugukonna tüvesid inkubeeriti 37 °C, 24 – 48 h ja teisi tüvesid 30 °C, 24 – 48 h. Ettekasvatatud kultuurist võeti 3-5 kolooniat ning valmistati nefelomeetriga (Biosan, Läti) mõõtes 0,5 MacFarland tihedusega (vastab $1,5 \times 10^8$ cfu/ml) lahus MH puljongis. Seejärel võeti 100 µl valmistatud suspensiooni ning lisati tuubi, mis sisaldas 11 ml MH puljongit. Selle lahjenduse käigus saadi külviannus kontsentratsiooniga $1,0 \times 10^6$ cfu/ml. Standardiseeritud mikroobide suspensioonide kontsentratsioon tagas, et kõik töödeldavad proovid olid katse alguses võrdsetes tingimustes. Algse külviannus kontsentratsiooni kasutamine võimaldas võrrelda erinevate tüvede biokile tekitamise võimekust.

Ettevalmistatud lahust külvati 100 µl mikrotiiterplaadile neljas paralleelis. Igale plaadile lisati positiivne kontroll (töötlemata proov) ja negatiivne kontroll (steriilne MH puljong).

Mikroitiiterplaadi äärmised read jäeti kasutamata, kuna nendes on keskkonnatingimused ebastabiilsemad, hapniku juurdevool ääres võib olla suurem, kui keskmistes süvendites, mis omakorda võib tulemusi mõjutada. Iga biotsiidi jaoks valmistati ette eraldi kaks mikroitiiterplaati kahe erineva värvingu jaoks ning kaks mikroitiiterplaati erineva inkubatsiooniaja jaoks. Plaatide inkubeeriti 37 ± 2 °C 24 ± 2 h ja 48 ± 2 h. Pärast inkubatsiooni mõõdeti optiline tihedus 600 nm (OD 600) (Biotek Synergy HTX Agilent Technologies, USA), et hinnata mikroobide kasvu. Seejärel loputati plaadid steriilse destilleeritud veega, et eemaldada mikroitiiterplaadile mittekinnitunud planktoonilised rakud. Teostati töötlus ettekasvatatud biokilele valitud biotsiidiga. Plaatidele lisati enne MH puljong ning seejärel vastav kogus uuritavat biotsiidi, et saada soovitud lõppkontsentratsioon süvendis. Töös kasutatavad biotsiidid ning lõppkontsentratsioonid süvendis on toodud Tabelis 3.

Tabel 3. Töös kasutatud biotsiidid ja nende kontsentratsioonid mikroitiiterplaadi süvendis

Algne kontsentratsioon	Kaubamärk	Toimeaine	Lõpp-kontsentratsioon süvendis
Etanool 96,6%	Epides Strong, Eesti	Etanool	73,5%
P3-oxysan ZS 3% (vol/vol)	P3Oxysan ZS (UK)	Äädikhape ($\geq 30 - < 50$ %) Peräädikhape, ($\geq 5 - < 10$ %) Vesinikperoksiid ($\geq 5 - < 8$)	0,3%
NaOH 20% (vol/vol)	Sigma-Aldrich	NaOH	1,5%
HNO ₃ 20% (vol/vol)	Sigma-Aldrich	HNO ₃	1,5%

Biotsiidi toimeaeg biokilele oli 15 minutit orbitaalloksutis 22 ± 2 °C, kiirusel 100 rpm (Certomat[®] U, Saksamaa). Positiivse kontrollina kasutati biotsiidiga töötlemata CV (GC. A595) ja TTC (GC. A500) värvingu optilisi tihedusi. Pärast kokkupuuteaega plaadid loputati destilleeritud veega toimeainest ning seejärel teostati biokile värvingud.

CV (Merck, USA) värvingu jaoks valmistati alglahusest 0,1% (vol/vol) lahus steriilse destilleeritud veega.

TTC (Merck, USA) värvingu jaoks valmistati 0,2% (wt/vol) lahus destilleeritud vees ning filter steriliseeriti läbi 0,2 µm filtri. Lahus on valgustundlik ning säilitati pimedas +4 °C juures.

CV värvinguks lisati 200 µl 0,1% CV lahust, inkubeeriti orbitaalloksutis 22 ± 2 °C, kiirusel 100 rpm, 30 minutit ning seejärel loputati destilleeritud veega. Kinnitunud värv lahustati üles 200

μl 70% (vol/vol) etanooliga (Sigma, USA), inkubeeriti 30 minutit orbitaallokustis 22 ± 2 °C, kiirusel 100 rpm, seejärel mõõdeti optiline tihedus 595nm (S A595) biokile hindamiseks.

Teostati TTC värving lisades 50 μl 0,2% TTC lahust ning 150 μl 0,1% peptoonvett (lõppkontsentratsioon süvendis 0,05% wt/vol) millele järgnes inkubeerimine 37 ± 2 °C 24 ± 2 h. Seejärel plaadid loputati destilleeritud veega ning värv lahustati 200 μl metanooliga (Merck, USA) 30 minutit orbitaallokustis 22 ± 2 °C, kiirusel 100 rpm. Mõõdeti optiline tihedus 500nm (S A500), et teha kindlaks allesjäänud biokile metaboolne aktiivsus.

2.2.4 Andmete analüüs

Proovide optiliste tiheduste tulemustest lahutati maha steriilsuskontroll. Kõikide tulemuste puhul arvutati nelja paralleeli keskmised. Biokile tekke ja biotsiidi efektiivsuse uuringutes eksponeeriti piisava tüvede arvuga (vähemalt 4) 10 erinevat sugukonda.

Biokile tekitamise võimekust ja metaboolset aktiivsust võrreldi toiduainetööstuste kaupa kasutades Kruskal-Wallise testi. Statistiliselt oluliseks loeti testi tulemusi, mille puhul oli olulisuse tõenäosus $p < 0,05$. Andmete analüüsiks ja jooniste loomiseks kasutati programme R (v. 4.3.0) ja MS Excel.

Biotsiidi mõju hindamiseks biokile massile lahutati biokile massi positiivsest kontrollist (GC.A595) maha pärast biotsiidiga töötlust mõõdetud biokile mass (S A595). Biokilet tekitavate bakterite metaboolse aktiivsuse muutuse hindamiseks lahutati biokile metaboolse aktiivsuse positiivsest kontrollist (GC.A500) maha pärast biotsiidi töötlust mõõdetud biokile metaboolne aktiivsus (S A500). Tulemustest arvutati keskmised sugukondade kaupa. Mida kõrgem optiline tihedus, seda efektiivsem on biotsiid olnud antud sugukonna biokile vastu ja mida madalam optiline tihedus, seda rohkem on biokilet alles jäänud pärast biotsiidiga töötlust. Biokilet mittetekitavad tüved pole antud jooniste koostamisel arvesse võetud. Nimetatud arvutused viidi läbi kasutades MS Excel programmi ja joonised loodi programmis R (v. 4.3.0).

Spearmani korrelatsiooni kasutati, et leida seoseid biotsiidi mõju ning biokilet iseloomustavate näitajate vahel (aeg, metaboolne aktiivsus, biokile mass). Seose tugevust hinnati Tabelis 4. toodud juhiste järgi (Akoglu, 2018). Statistiliselt oluliseks seoseks loeti korrelatsiooni mille $p < 0,05$. GraphPad Prism v. 10 kasutati korrelatsioonide arvutamiseks ja jooniste loomiseks.

Tabel 4. Spearmani korrelatsioonikordaja

Spearman	Seose tugevuse piirid
$ r \leq 0,3$	Nõrk seos
$0,3 < r < 0,7$	Keskmine seos
$ r \geq 0,7$	Tugev seos

Tüved grupeeriti sugukondade kaupa ning biokile tekke võimekus jaotati 4 klassi vastavalt optilisele tihedusele Tabelis 5 toodud valemi põhjal (Singh et al., 2017).

Tabel 5. Tüvede biokile tekitamise võime klassi arvutusvalem ning selle uuringu biokile klasside optilise tiheduse (OD) vahemikud.

Klassikriteeriumi arvutusvalem	Klassi OD vahemikud	Biokile klass
$OD \leq OD_{cut}^*$	$OD \leq 0,23$	Biokile puudub
$OD_{cut} < OD \leq 2 \times OD_{cut}$	$0,23 < OD \leq 0,45$	Nõrk biokile
$2 \times OD_{cut} < OD \leq 4 \times OD_{cut}$	$0,45 < OD \leq 0,91$	Mõõdukas biokile
$OD > 4 \times OD_{cut}$	$OD > 0,91$	Tugev biokile

* $OD_{cut} = 0,23$ (negatiivse kontrolli keskmine OD + $3 \times$ negatiivse kontrolli OD standardhälve)

Antibiootikumiresistentsuse tulemuste puhul esitati andmed tundlikkuse sagedusena testitud antibiootikumide suhtes. Arvutati MAR (*Multiple Antibiotic Resistance*) indeks valemiga $M = a/b$, kus a esindab antibiootikumide arvu, mille suhtes testitud tüvi oli resistentne ja b esindab antibiootikumide koguarvu, mille suhtes tüve uuriti. MAR indeksist lähtuvalt grupeeriti tüved kolme klassi (Tabel 6).

Tabel 6. MAR (*Multiple Antibiotic Resistance*) indeksi klasside jaotus.

MAR indeks	MAR indeks selgitus	Klassi nimetus
MAR indeks 0	Antibiootikum resistentus puudub	Resistentus puudub
$0 < \text{MAR indeks} \leq 0,22$	Ühe või kahe antibiootikumi vastu esineb resistentus	Mõõdukas resistentus
MAR indeks $> 0,22$	Kolme või rohkema antibiootikumi vastu resistentus	Tugev resistentus

MAR indeksi klasse ja biokile massi (OD 595) tulemusi pärast 48 h inkubatsiooni võrreldi kasutades Kruskal-Wallise testi (kolme grupi võrdluses) ja Wilcoxon testi (kahe grupi võrdluses). Toiduainetööstuste kaupa grupeeritud tüvede biokile massi ja MAR indeksi klasside paarikaupa võrdlemiseks kasutati Wilcoxon testi Bonferrooni korrigeerimisega. Statistiliselt oluliseks erinevuseks loeti $p < 0,05$.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Mikroobide varieeruvus toidukäitlemise ettevõtte profiilist sõltuvalt

Uuritavate tüvede varieeruvus tulenes toorainest ning selle residentmikroobioomist. Tabel 7 annab ülevaate sugukondade arvukusest ning uuritavate bakterite osakaaludest valimis. Uuritavad tüved kuulusid 24 sugukonda. Ühised liigid üle kõigi uuritud tööstuste olid *Micrococcus luteus* ja *Staphylococcus hominis*. Ühised perekonnad olid *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus* ja *Staphylococcus*. Ühised sugukonnad olid *Bacillaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae* ja *Staphylococcaceae*. Xu et al., (2023) teostatud metaanalüüsis tuvastati, et kattuvad perekonnad piimatoodetes, värskes lihas, kalatoodetes, puu- ja köögiviljatoodetes ja kohe tarbimiseks mõeldud toodetes olid *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* ja *Microbacterium*. Perekondade *Acinetobacter* ja *Staphylococcus* osas kattuvad metaanalüüsi tulemused käesoleva uuringu tulemustega. Magistritöös puudus kalatoodete tööstus ning sellest tulenevalt võivad tulemused erineda eelpoolviidatud metaanalüüsi tulemustest.

Lisaks mainitud metaanalüüsiga leitud ühistele perekondadele tuvastati selles töös toiduainetööstuste üleselt perekondade *Bacillus* ja *Micrococcus* esindajaid. Perekonda *Bacillus* kuuluvad Gram-positiivsed spore moodustavad mikroobid. Spoorid suudavad ellu jääda kõrgetel temperatuuridel, toitainete puuduses ning pärast biotsiididega töötlust. Seetõttu on *Bacillus* perekonna liike sagedasti tuvastatud pagaritoodetes, piimatoodetes, lihatoodetes ning puu- ja köögiviljatoodetes (André et al., 2017).

Teine perekond, mida metaanalüüs ei seostanud toiduainetööstuste üleselt, kuid mida leiti käesolevas töös oli *Micrococcus*. Magistritöös tuvastati kõikides tööstustes *Micrococcus luteus* ja *Staphylococcus hominis*. Mõlemad liigid kuuluvad imetajate naha mikroobioomi ning võivad sattuda toiduainetööstusesse kas personali kaudu või loomse toorainega (Khayyira et al., 2020).

Tabel 7. Erinevatest toiduainetööstustest isoleeritud tüvede arvud (n) ja osakaalud (%) sugukondade kaupa. Paksus kirjas on välja toodud kattuvad sugukonnad üle erinevate tööstuste ja neli kõige sagedasemat sugukonda tööstustes.

Sugukond	Piimatööstus n=59	Puu-ja kõogiviljatööstus n=21	Lihatööstus n=39	Pagaritööstu n=42
<i>Aeromonadaceae</i>	2	-	-	-
<i>Debaryomycetaceae</i>	-	-	5	-
<i>Bacillaceae</i>	8	33	5	21
<i>Carnobacteriaceae</i>	-	-	8	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	22	14	-	10
<i>Enterococcaceae</i>	3	-	-	2
<i>Filobasidiaceae</i>	-	5	-	-
<i>Erwiniaceae</i>	2	-	-	7
<i>Hafniaceae</i>	2	-	-	-
<i>Lactobacillaceae</i>	7	5	3	10
<i>Listeriaceae</i>	3	-	5	-
<i>Microbacteriaceae</i>	2	-	-	2
<i>Micrococcaceae</i>	3	10	15	10
<i>Moraxellaceae</i>	7	14	18	17
<i>Nocardiaceae</i>	2	-	-	-
<i>Paenibacillaceae</i>	2	-	-	-
<i>Paracoccaceae</i>	-	-	-	2
<i>Pseudomonadaceae</i>	10	-	18	-
<i>Sphingobacteriaceae</i>	2	-	-	-
<i>Staphylococcaceae</i>	15	19	10	14
<i>Streptococcaceae</i>	5	-	-	-
<i>Tsukamurellaceae</i>	2	-	-	-
<i>Weeksellaceae</i>	-	-	-	5
<i>Yersiniaceae</i>	2	-	13	-

Piimatööstustes moodustas valimi 59 erinevat tüve, mis kuulusid 19 sugukonda. Kõige suurema osakaalu moodustasid *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Pseudomonadaceae* ja *Bacillaceae* sugukonda kuuluvad sanitaarnäitlikud ja patogeenseid mikroobid. *Enterobacteriaceae* sugukonnas domineerisid liigid *Cronobacter* spp., *E. coli*, *Citrobacter braakii*, *Klebisella oxytoca* ja *Enterobacter bugandensis*.

Staphylococcaceae sugukonna sagedasemate esindajate hulka kuulusid *Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis* ja *S. warneri*. *Pseudomonadaceae* sugukonnast isoleeriti *P. aeruginosa*, *P. proteolytica*, *P. brenneri*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*. *Bacillaceae* sugukonda kuulusid *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. thermoamylovorans* ja *Exiguobacterium* spp.

Puu-ja kõogiviljatööstustes moodustas valimi 21 tüve, mis kuulusid 7 sugukonda. Enim esindatud sugukonnad olid *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae* ja

Moraxellaceae. Sugukonda *Bacillaceae* kuulusid *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. flexus*, *B. pumilus*, *B. cereus* ja *B. ginsengihumi*. Sugukonda *Staphylococcaceae* kuulusid *S. epidermidis*, *S. hominis* ja *S. warneri* ja *S. saprophyticus*. Sugukonda *Enterobacteriaceae* kuulusid uuritavad tüved liikidest *K. oxytoca* ja *Enterobacter cloacae*. Sugukonda *Moraxellaceae* kuulusid tüved liikidest *Acinetobacter lwoffii* ja *Moraxella osloensis*.

Lihatööstuse valimi moodustas 39 tüve, mis kuulusid 10 sugukonda. Sageduselt esines kõige rohkem sugukondadesse *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Micrococcaceae* ja *Yersiniaceae* kuuluvaid tüvesid. *Pseudomonadaceae* alla kuulusid *P. lundensis*, *P. fragi*, *P. tolaasii*, *P. extremorientalis* ja *P. taetrolens*. Sugukonda *Moraxellaceae* kuulusid uuritavad tüved liikidesse *A. johnsonii*, *A. albensis*, *Psychrobacter immobilis* ja *P. alimentarius*. Sugukonda *Micrococcaceae* kuulusid *M. luteus*, *Kocuria rhizophila* ja *K. carniphila*. Sugukonna *Yersiniaceae* moodustasid *Serratia proteamaculans*, *S. liquefaciens*, *Rahnella aquatilis* ja *Ewingella americana*. Saadud tulemus kattub varem leitud värskes ja töödeldud liha mikroobikoosluste uuringutega (Nychas et al., 2008).

Pagaritööstuse valimi moodustasid 42 tüve, mis jagunesid 11 sugukonda. Kõige enam tüvesid kuulusid sugukondadesse *Bacillaceae*, *Moraxellaceae*, *Staphylococcaceae*. *Bacillaceae* sugukonda kuulusid *B. cereus* ja *Exiguobacterium* spp. Sugukonna *Moraxellaceae* moodustasid *A. baumannii* ja *A. junii* ning *Staphylococcaceae* sugukonna alla kuulusid *S. epidermidis* ja *S. hominis*.

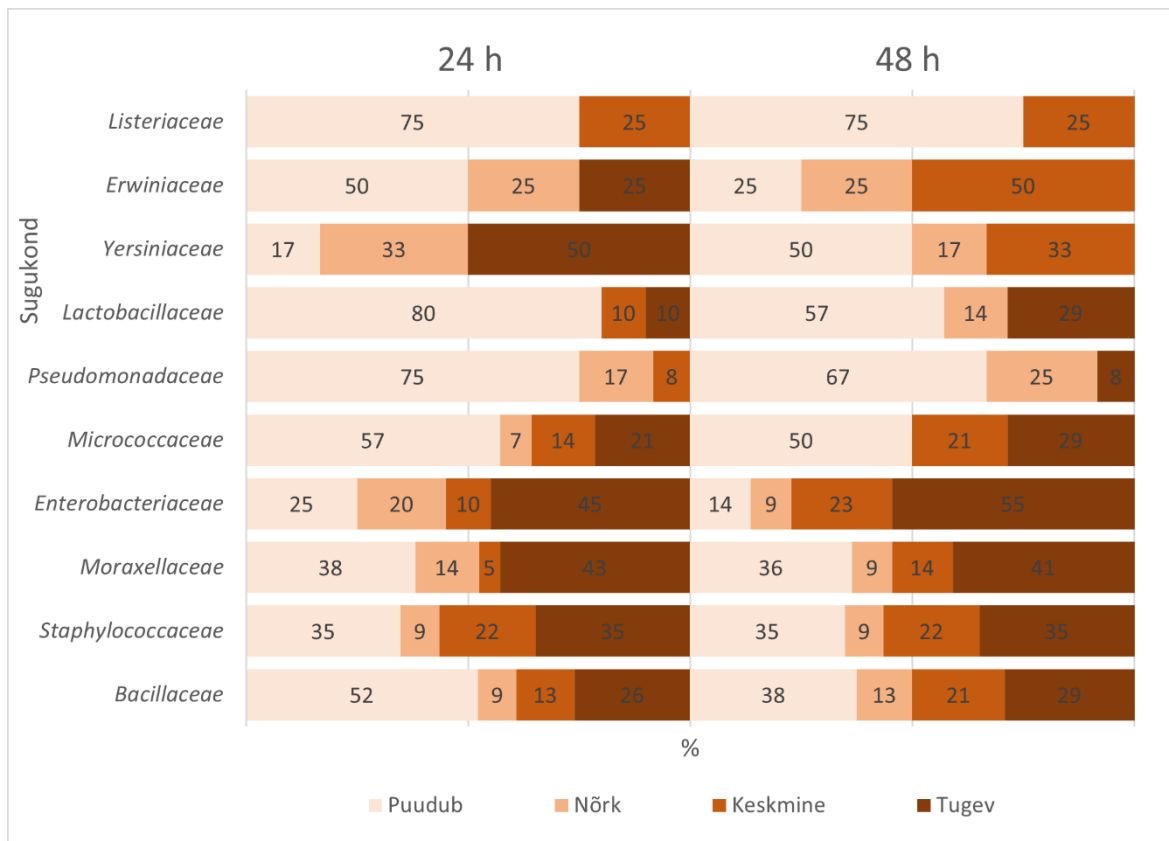
2.3.2 Mikroobitüvede biokile moodustamise võimekus sugukondade kaupa

Uuritavad tüved jagati sugukondade kaupa nelja klassi vastavalt CV värvingu optilise tiheduse (OD 595 nm) mõõtmistulemustele: biokile tekitamine puudub, nõrk biokile tekitaja, keskmine ja tugev biokile tekitaja. Biokile tugevuse hindamisel eemaldati valimist sugukonnad, milles oli alla nelja tüve. Joonisel 2 on kujutatud Tabelis 7 toodud tüvede biokile klasside osakaalud sugukondade kaupa pärast 24 h ja 48 h inkubatsiooni 37 ± 2 °C juures.

Kõige rohkem biokile mittetekitajaid 24 h ja 48 h inkubatsiooni järel esines sugukondades *Lactobacillaceae*, *Listeriaceae* ja *Pseudomonadaceae*. Kõige tugevamad biokile tekitajad 24 h järgsel inkubatsioonil olid sugukonda *Yersiniaceae*, *Enterobacteriaceae* ja *Moraxellaceae* kuuluvad tüved ning 48 h järgsel inkubatsioonil sugukonna *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* ja *Staphylococcaceae* tüved.

Sugukond *Listeriaceae* alla kuulusid selles uuringus kahte liiki tüved (n=4), *Listeria monocytogenes* ning *B. thermosphacta*. Liik *B. thermosphacta* on lihatoodete SSO liik, kuid tema biokile tekitamise võimekust on vähe uuritud. Selle töö tüved olid isoleeritud erinevatest lihatööstustest ning ei olnud võimelised biokilet tekitama 37 ± 2 °C juures 24 h ega 48 h jooksul, kuigi mõlemal ajahetkel tuvastati tüvede kasv mõõtes optilist tihedust lainepikkusel 600 nm. Gaillac et al., (2022) uurisid *B. thermosphacta* tüvede biokile tekitamise võimekust 25 °C juures ning leidis, et 25-st tüvest 5 olid võimelised tekitama tugevat biokilet, mis viitab, et biokile tekitamine on tüvespetsiifiline. Kuna lihakäitlemisettevõtetes hoitakse madalat temperatuuri võrreldes teiste toiduainetööstusega, on antud katses biokilet mitte tekitanud tüvede puhul on vajalik edasine eksperiment madalamal temperatuuril, et tuvastada, kas isoleeritud tüvede puhul on temperatuur biokile tekitamisel mõjufaktoriks.

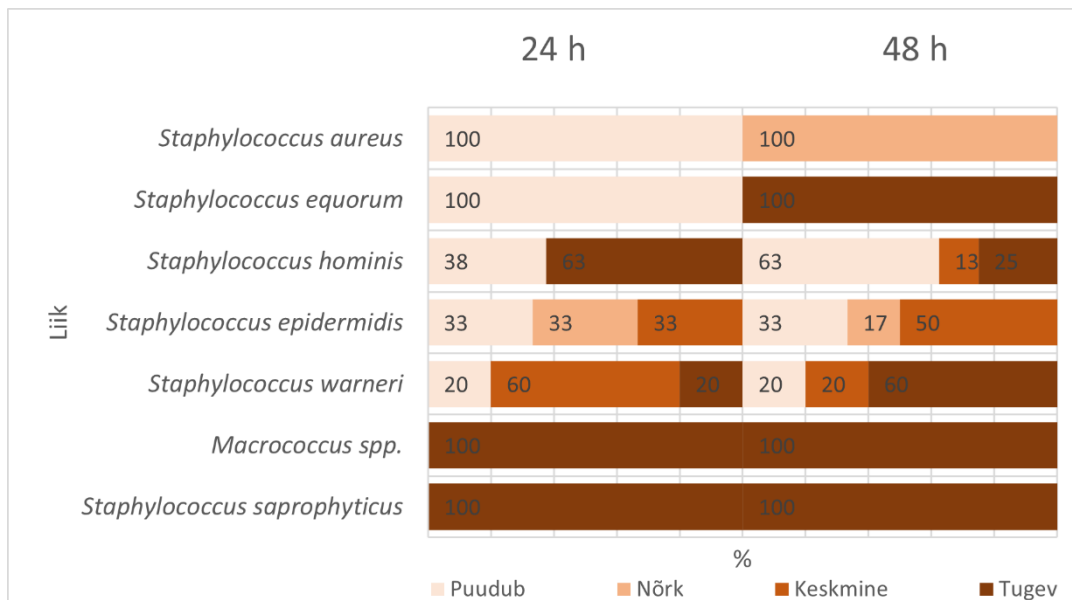
L. monocytogenes tüvede puhul (n=2) oli tegemist sama ettevõtte toorpiima erinevatest partiidest isoleeritud tüvedega. Üks uuritud tüvedest tekitas keskmise tugevusega biokilet ning teine biokilet ei tekitanud, kuigi mõlemad tüved kasvasid edukalt MH puljongis (OD 600 nm). Biokilet tekitanud tüve puhul oli 48 h tekkinud biokile küll tugevam, kuid biokile bakterite metaboolne aktiivsus oli kõrgem 24 h vanusel biokilel. See viitab asjaolule, et biokile teke oli kiire ning 48 h oli bakterirakkude ainevahetus juba aeglustunud. *L. monocytogenes* puhul on eelnevalt uuritud biokile tekitamist nii monokultuurina kui segakultuuridena. Monokultuurina on *L. monocytogenes* biokile tekitamise võimekus väga madal. Kalmokoff et al., (2001) uuringus oli üks tüvi 36-st võimeline tekitama nõrka biokilet, kuid segakultuurina oli bakteri biokile tootmise võimekus tugevam, mis viitab sellele, et biokilet monokultuurina mitte tekitavad *L. monocytogenes* tüved võivad tööstuse keskkonnas koostoimel teiste bakteritega tekitada tugeva biokile, mis allub raskesti biotsiidi toimele ning võib seetõttu sattuda lõpptootesse ja ohustada tarbijat (Carpentier & Chassaing, 2004).



Joonis 2. Erinevatesse sugukondadesse kuuluvate bakteritüvede biokile tekitamise võimekuse osakaalud (%). Biokile tekke võimekus grupeeritud kristallvioleti värvingu optilise tiheduse (OD 595 nm) alusel.

Sugukonda *Yersiniaceae* kuuluvate bakterite puhul esines võrreldes teiste sugukondadega kõige rohkem tugevat biokilet pärast 24 h inkubeerimist (50% tüvedest), kuid 48 h möödudes leiti vaid keskmise tugevusega biokilet ning biokile puudumine oli suurenenud 50%-ni. Sugukonnas esinevad tüved liigist *S. proteamaculans* ja *S. liquefaciens*. Liigil *S. proteamaculans* on tuvastatud varasemalt erinevate proteaaside tootmine, mis mängivad olulist rolli toidu riknemise põhjustamisel, patogeneesil ning biokile vabanemise faasis (Ramírez-Larrota & Eckhard, 2022). *Yersiniaceae* sugukonna esindajate puhul võib eeldada, et 48 h vanuses kultuuris biokile vähenemine võib olla seotud proteaasidega, kuid vajab kinnitamiseks edasisi katseid.

Sugukondadesse *Erwiniaceae*, *Lactobacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* ja *Bacillaceae* kuuluvate tüvede puhul selgus, et pikem inkubatsiooniaeg soodustab biokile kasvu, kuna 48 h esines rohkem keskmise tugevusega ja tugevat biokilet kui 24 h (Joonis 2). Antud sugukondadesse kuuluvate tüvede biokile tekitamise võime uurimiseks oleks edaspidi tarvilik lisada 72 h ajapunkt käesolevas uuringus leitud ajafaktori mõju kinnitamiseks.



Joonis 3. Sugukonda *Staphylococcaceae* kuuluvate liikide biokile tekitamise võimekuse osakaalud (%) 24 ja 48 h järgsel inkubatsioonil. Biokile määramine teostatud kristallviolet värvinguga, optiline tihedus mõõdetud 595nm.

Sugukond *Staphylococcaceae* puhul 24 ja 48 h möödudes ei esinenud biokile tugevuse osakaaludes muutusi (Joonis 2). Joonis 3 annab ülevaate liikide vahelisest erinevusest biokile tekkes. *Macrococcus spp.* ja *S. saprophyticus* liigid tekitasid tugeva biokile juba 24 h jooksul ning 48 h jooksul biokile kasvas edasi. Liikidesse *S. aureus*, *S. equorum*, *S. epidermidis* ja *S. warneri* kuuluvatel tüvedel esines 48 h jooksul biokile küpsemine ning tugeva biokile osakaalu protsent suurenes. *S. hominis* (n=2) puhul tuvastati, et biokile küpses edasi ka 48 h, kuid enamusel tüvedest (n=6) täheldati 48 h biokile tugevuse vähenemist. Liigi *S. hominis* tüvede kohta on märgatavalt vähem eelnevaid uuringuid võrreldes teiste *Staphylococcus spp.* liikidega, kuid kuna tegemist on tõusva tähtsusega nosokominaalse infektsiooni tekitajaga, siis huvi antud liigi tüvede vastu on tõusnud. *S. aureus* ja *S. epidermidis* puhul on kinnitatud, et biokile moodustamisel mängib võtmerolli perekonna liikidel esinev polüsahhariidide intertsellulaarne adhesiin, mida sünteesitakse *ica* operoni poolt kodeeritud ensüümide poolt, kuid liigi *S. hominis* puhul on leitud, et *ica* operoni asemel reguleerivad biokile teket geenid, mis on mõjutatud keskkonna faktorite poolt (nt glükoos, temperatuur, etanool) (Szczuka et al., 2015; Vuong et al., 2004). See võib ka selgitada, miks selles uuringus *S. hominis* tüvede biokile küpsemine toimus erinevalt võrreldes liikidega *S. aureus* ja *S. epidermidis* ja miks esines ka erinevatest toiduainetööstustest isoleeritud tüvedel erinev biokile moodustamise võimekus.

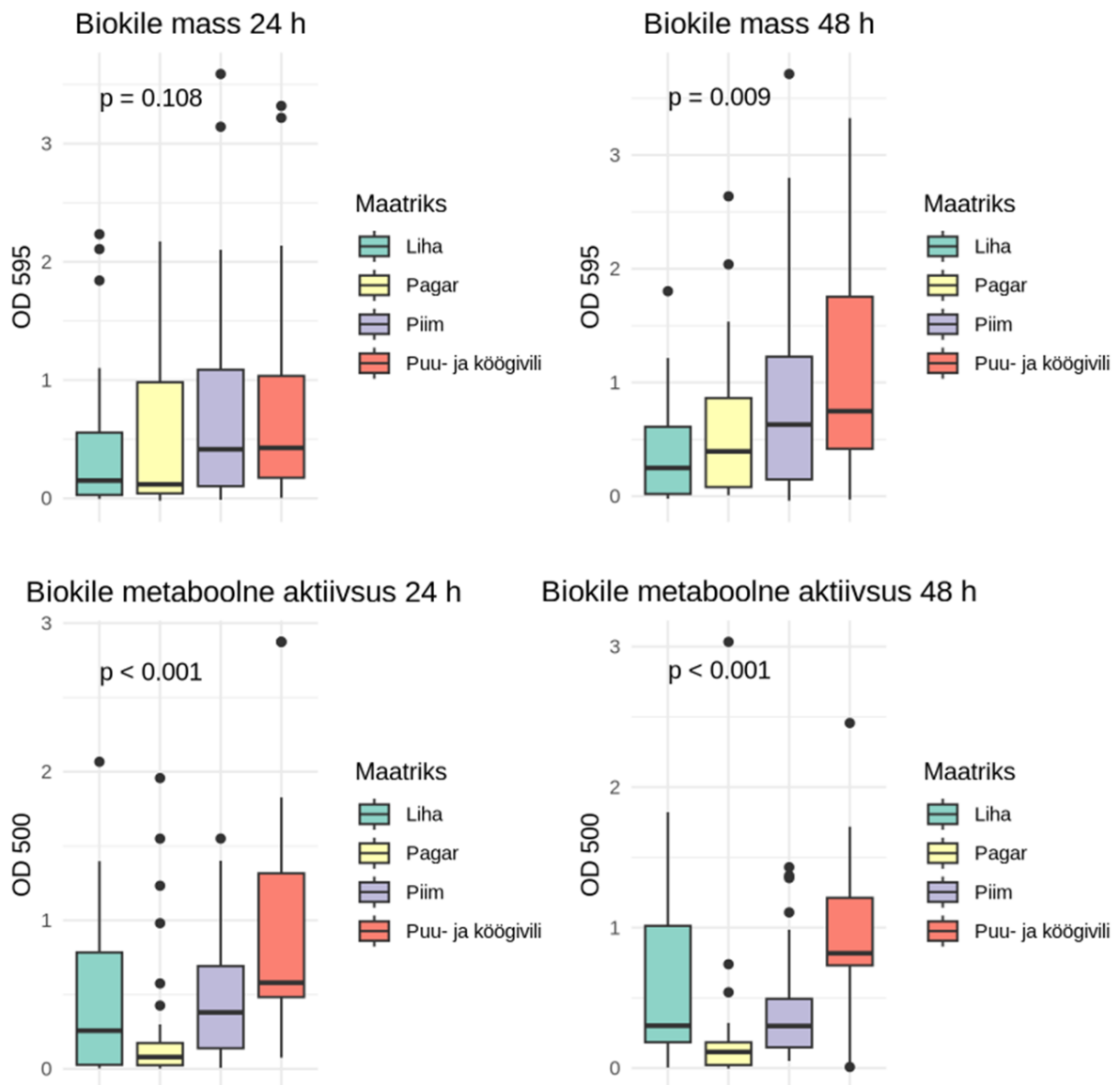
2.3.3 Tüvede biokile tekitamise võimekus toiduainetööstuste kaupa

Biokile tekke võimekust ja bakterite metaboolset aktiivsust biokiles uuriti toiduainetööstuse kaupa. Statistiliselt olulised seosed on toodud välja Joonisel 4. Biokile massi tekkes 24 h järel ei esinenud toiduainetööstuste vahel olulist erinevust, kuid metaboolse aktiivsuse osas 24 h esinesid tööstuste kaupa olulised erinevused. Kõrgeim metaboolne aktiivsus esines puu- ja köögiviljatööstustest isoleeritud tüvedel. Puu- ja köögiviljatööstuste tüvedel esines kõige tugevamat biokile massi tootmist 48 h möödudes. Lisaks esines kõrget metaboolset aktiivsust 48 h möödudes, mis viitab sellele, et 48 h toimus veel biokile küpsemine. Biokile metaboolse aktiivsuse muutust on varasemalt uuritud mudelorganismis *P. aeruginosa*. Lichtenber et al., (2022) leidsid, et mikroobirakkudes toimub biokile EPS tootmiseks metaboolse aktiivsuse plahvatus, mis on reguleeritud signaalmolekuli c-di-GMP kaudu. Plahvatusel järgneb metaboolselt madala aktiivsuse periood, mida seostatakse biokile moodustumisega ja rakkude aktiivsuse vähenemisega.

Piimatööstustest isoleeritud tüvedel oli märgata biokile massi tõusu 48 h, kuid metaboolne aktiivsus oli langenud 48 h, mis viitab, et metaboolne plahvatus toimus uuritavatel tüvedel varem ning 48 h esineb biokile küpsemine ning metaboolselt madal periood.

Lihatööstustest isoleeritud tüvedel esines kõige madalamat biokile tekitamise võimekust 24 h ja 48 h inkubatsiooni järel võrreldes teiste toiduainetööstustega. Biokile bakterite metaboolne aktiivsus oli uuritud tüvedel kõrgem võrreldes pagari- ja piimatööstustega. Leid võib viidata bakterite aeglasemale biokile tootmisele ning vajab kinnitamiseks edasisi katseid.

Pagaritööstuses esines 24 h ja 48 h möödudes biokile tootmist, kuid biokile bakterite metaboolne aktiivsus 24 h ja 48 h möödudes oli kõige madalam võrreldes teiste toiduainetööstustega. Seda leidu võib põhjendada biokiles olevate püsirakkude populatsiooni hulk või tüvede kohastumus pagaritööstuse keskkonna tingimustele. Antud leid vajab edasisi uuringuid, et põhjendada biokile bakterite metaboolse aktiivsuse madalaid väärtusi.



Joonis 4. Uuritavate bakteritüvede biokile massi (OD 595) ja biokile bakterite metaboolse aktiivsuse (OD 500) võrdlus 24h ja 48 h inkubatsioonis erinevate toiduainetööstuste tüvedel

Toiduainetööstustest isoleeritud tüvede biokile massi tootmisel 48 h ja biokile bakterite metaboolses aktiivsuses 24 ja 48 vältel olid olulised erinevused. See viitab, et toiduainetööstusest sõltuvalt on tüvede metaboolne aktiivsus biokiles ja biokile küpsemise aeg erinev. Erinevus võib sõltuda toiduainetööstuste vahelisest erinevusest liigilises koosluses ning toorainest sõltuvalt toitainete varieeruvusest.

2.3.4 Biotsiidi mõju biokile massile ja metaboolsele aktiivsusele

Kõige paremaid tulemusi 24 h ja 48 h kasvanud biokile massi vastu üle erinevate toidukäitlemise ettevõtete sugukondade tüvede andis aluse- ja happepesu (Joonis 5). Metaboolset aktiivsust vähendasid kõik biotsiidid efektiivselt, esinesid vaid vähesed erisused biotsiidide vahel sugukonniti (Joonis 6).



Joonis 5. 24 h ja 48 h kasvanud biokile massi (värving kristallvioletiga, OD 595) muutus erinevate biotsiidide korral võrreldes algse biokile massiga (positiivse kontrolliga).

Sugukondades *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Staphylococcaceae* ja *Yersiniaceae* esineb mõõdukat ja tugevat biokile massi, mis eemaldus kõige efektiivsemalt alus ja happe töötamise järel (Joonis 5). 73,5% etanooli ja P3Oxyzan ZS toime biokile eemaldamisvõime on madalam kui alus-happel ning on mõjutatud biokile vanusest. Biokile bakterite metaboolset aktiivsust vähendasid kõik biotsiidid, kuid väike osa rakkude

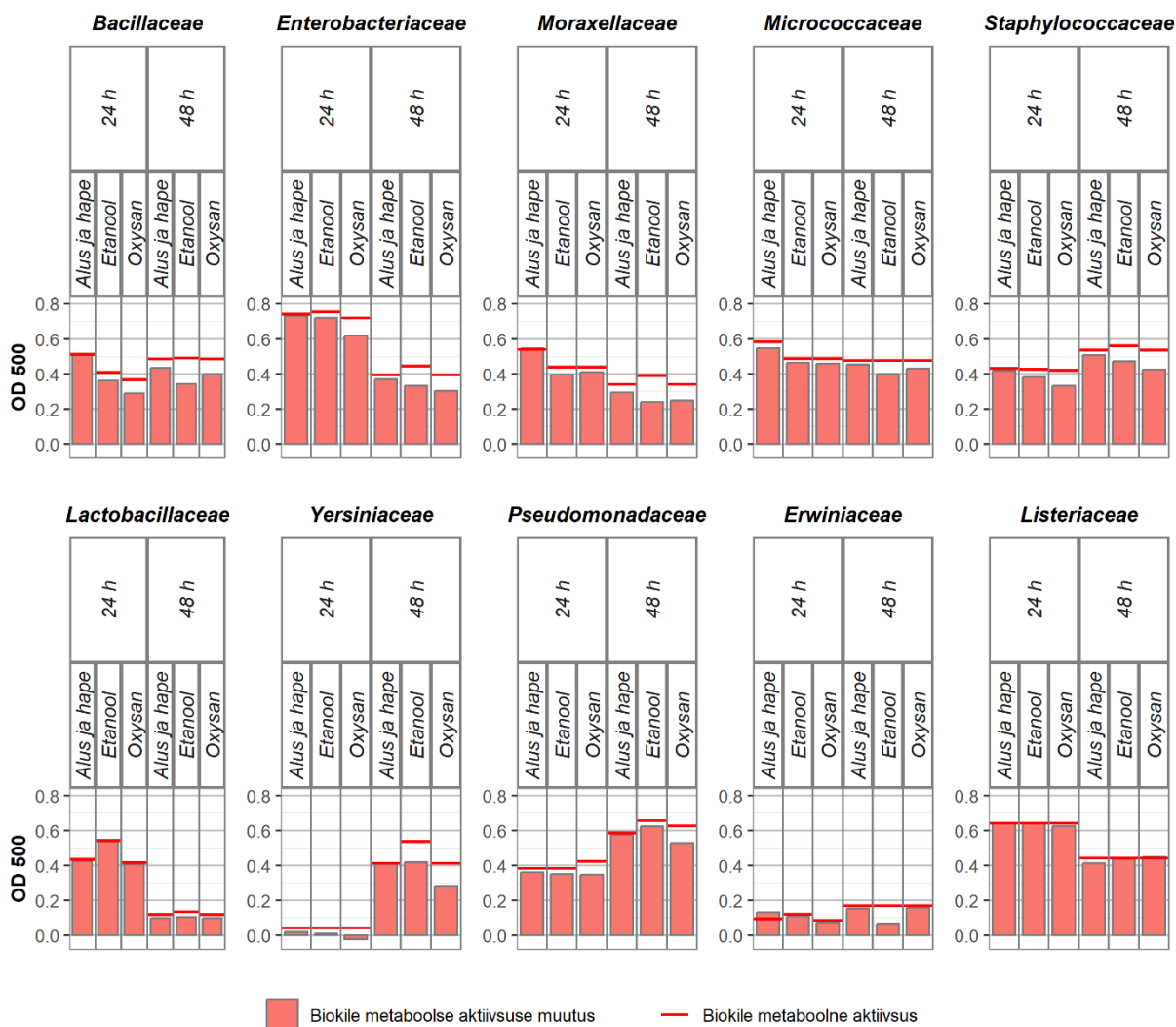
populatsioonist jäi ellu pärast 73,5 % etanooli ja P3Oxysan ZS toimet (Joonis 6). Tegemist võib olla püsirakkude populatsiooniga, mis toitainete kättesaadavusel on võimelised taastama biokile.

Sugukonnas *Lactobacillaceae* (n=10) olid 24 h inkubatsioonil järel 8 tüve biokilet mittetekitajad ning üks tugev ja üks keskmine biokile tekitaja liigist *Lactiplantibacillus plantarum*. Nende kahe tüve 24 h küpsenud biokiledele avaldasid kasutatud biotsiidid toimet vähesel määral, kuid nende tüvede biokile metaboolset aktiivsust vähendasid kõik biotsiidid. See viitab, et 24 h olid palju rakud planktoonilises staatuses ning allusid biotsiidi toimele. 48 h kasvanud biokile massi oli rohkem ning seda eemaldas kõige halvemini 73,5 % etanool. Biokile bakterite metaboolset aktiivsust mõjutasid kõik biotsiidid samaväärselt.

Sugukond *Yersiniaceae* puhul esines tugevat biokilet juba 24 h möödudes, kuid metaboolne aktiivsus biokile bakteritel oli 24 h vanusel biokilel väga madal, 24 h keskmine OD 500 oli 0,04. Selline olukord võib viidata püsirakkude populatsioonile, kus biokile bakterite metaboolne aktiivsus on keskkonna tingimustest sõltuvalt viidud madalale tasemele. 48 h vanusel biokilel esines tugev bakterite metaboolne aktiivsus, kuid biokile massi hulk oli vähenenud, mis võib viidata proteaaside tootmisele ja biokile eraldumise faasile.

Sugukonnal *Pseudomonadaceae* (n=12) tootis nõrka biokile massi 24 ja 48 h inkubatsiooni järel. Biotsiidi vähendasid efektiivselt nii 24 h, kui ka 48 h kasvanud biokile massi ning biokile bakterite metaboolset aktiivsust (Joonis 5 ja Joonis 6). Biokile bakterite kõrge metaboolne aktiivsus 48 h järel tähendab kõrget planktooniliste rakkude populatsiooni, mis viitab, et biokile on veel küpsemise järgus ning edasistes uuringutes oleks vajalik pikendada inkubatsiooni aega (Joonis 6). Planktooniliste rakkude kõrge hulga tõttu olid biotsiidid efektiivsed metaboolse aktiivsuse langetamisel.

Listeriaceae sugukonna tüvedel (n=4) esines 24 h järgsel inkubatsioonil nõrk biokile, mis oli metaboolselt kõrgema aktiivsusega kui 48 h kujunenud mõõdukas biokile (Joonis 6). Metaboolselt kõrgema aktiivsusega biokile viitab, et biotsiidide vastu võib mikroob potentsiaalselt kasutada *effluks* pumpasid. *Listeria monocytogenes*-el on kirjeldatud kahte *effluks*-pumpa (MdrL ja Lde), mida on seostatud antimikroobse preparaadi bensalkooniumkloriidi vastu tundlikkuse puudumisega (Romanova et al., 2006).

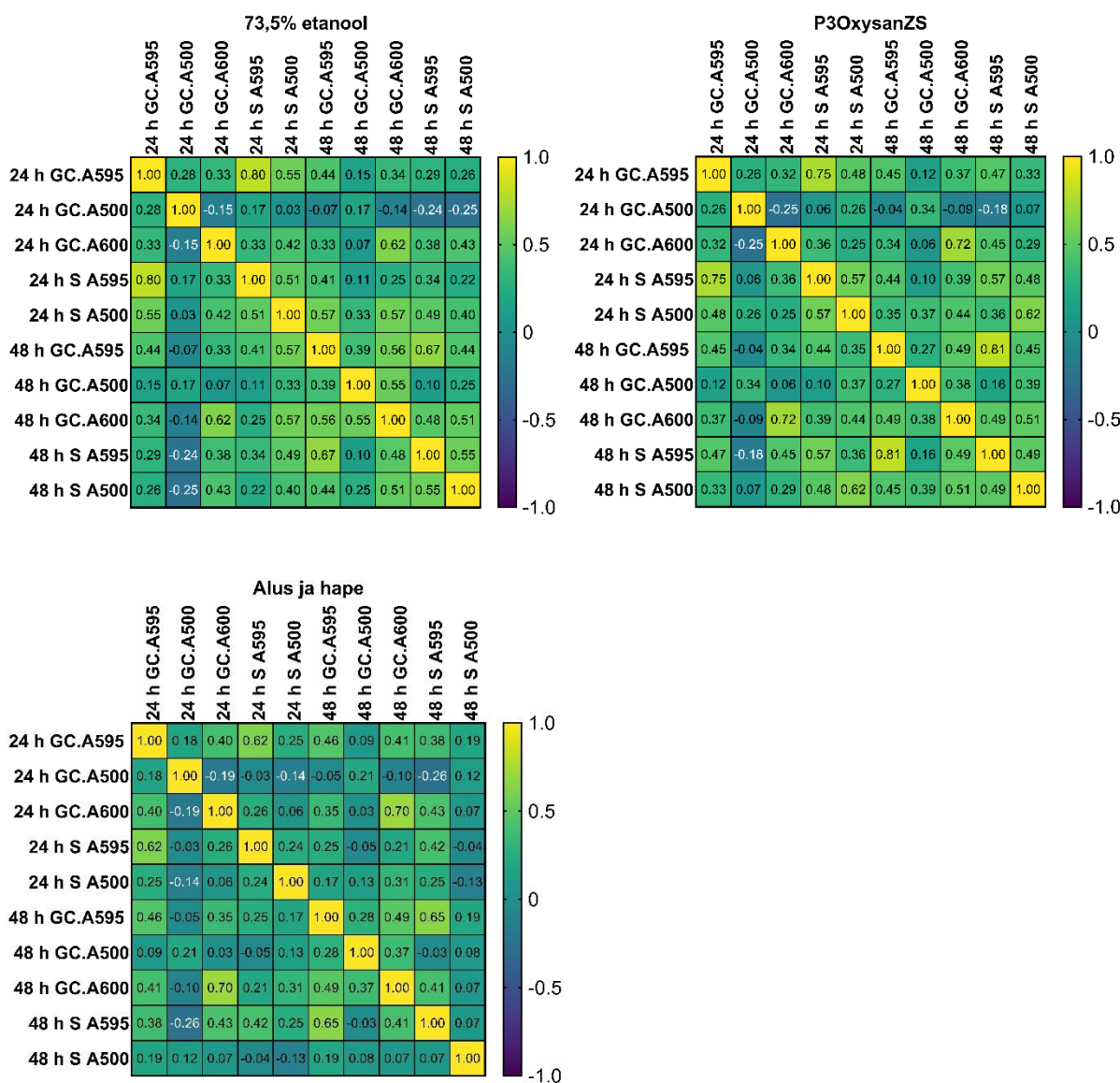


Joonis 6. 24 h ja 48 h kasvanud biokile bakterite metaboolse aktiivsuse (värving TTC, OD 500) muutus erinevate biotsiidide korral võrreldes algse biokile metaboolse aktiivsusega (positiivse kontrolliga).

2.3.5 Biokile parameetrite ja biotsiidide vaheline korrelatsioon

Biotsiidide ja biokilet iseloomustavate parameetrite (24 h ja 48 h mõõdetud GC.A595, GC.A500, GC.A600, S A595, S A500) vaheliste seoste leidmiseks viidi läbi korrelatsioonanalüüs (Joonis 7). Biotsiidi mõjutusest sõltumatute analüüsides puhul oli tugev positiivne korrelatsioon 24 h ja 48 h kasvukontrollide vahel ($r=0,72$; $p<0,001$), mis viitab, et bakterikultuuri kasv ajas muutus sarnaselt. Biokile massi ja metaboolse aktiivsuse vahel oli 24 h ($r=0,28$; $p<0,001$) nõrk seos ja 48 h ($r=0,44$; $p<0,001$) keskmine seos. Biokile massi ja metaboolse aktiivsuse vaheline nõrk seos võib tuleneda bakteri liikide ja tüvede vahelisest suurest varieeruvusest ja liigispetsiifilisest biokile küpsemise dünaamikast.

Tugev seos ($r=0,80$; $p<0,001$) leiti biokile massi kasvukontrolli (GC. A595) ja etanooliga töödeldud biokile vahel (S. A595). See viitab, et et 73,5% etanooli toimet mõjutab enim biokile paksus. P3OxysanZS efektiivsuse ja biokilemassi vaheline seos oli tugev ($r=0,75$; $p<0,001$) ning happe ja aluse puhul oli tegemist keskmise seosega ($r=0,62$; $p<0,001$). Seosed biokile metaboolse aktiivsuse ja biotsiidide toime vahel aga puudusid või olid nõrgad.



Joonis 7. Spearmani korrelatsioon erinevate biotsiidide ning biokile massi ja biokile bakterite metaboolset aktiivsust mõjutavate faktorite kohta. GC.A595- kasvukontroll, kristallviolet värvingu OD mõõdetud 595 nm; GC.A500- kasvukontroll, TTC värvingu OD mõõdetud 500 nm; GC.A600- kasvukontroll OD mõõdetud 600 nm; S A595- biotsiidiga töödeldud proov, kristallviolet värvingu OD mõõdetud 595 nm, S A500- biotsiidiga töödeldud proov, TTC värvingu OD mõõdetud 500 nm.

48 h kasvanud biokile massi ja P3OxysanZS efektiivsuse vahel ($r=0,81$; $p<0,001$) esines tugev seos ning keskmised seosed leiti 73,5% etanooli ($r=0,67$; $p<0,001$) ja aluse ja happe ($r=0,65$;

$p < 0,05$) töötlustel. 48 h biokile metaboolse aktiivsuse ja aluse ja happe efektiivsuse vaheline seos puudus. 73,5% etanooli ja biokile bakterite metaboolse aktiivsuse vahel leiti nõrk seos, kuid see ei olnud statistiliselt oluline ($r = 0,25$; $p = 0,205$). P3OxysanZS töötluste ja biokile bakterite metaboolse aktiivsuse vahel leiti keskmine seos ($r = 0,39$; $p < 0,001$).

2.3.6 Isoleeritud bakteritüvede antibiootikumiresistentsus

Antibiootikumiresistentsuse tulemuste puhul arutati resistentsuse, tundlikkuse ja tinglikult tundlikkuse sagedused valitud sugukondades, kus tüvede arvukus oli vähemalt 4. Tabelis 8 on sugukonda kuuluvate tüvede tundlikkuse sagedused. Kõige enam esines resistentsust sugukondades *Micrococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Listeriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Yersiniaceae*. Sugukonnas *Bacillaceae* esines kõige enam tinglikku tundlikkust.

Micrococcaceae sugukonnas ($n = 16$) tuvastati resistentsus *Kocuria* spp. tüvedel (*K. salsa*, *K. rhizophila*, *K. carniphila*) ja liigi *M. luteus* tüvedel trimetroprimi ja tsiprofloksatsiini vastu. Trimetroprim inhibeerib dihidrofoolhappe reduktaasi ning seeläbi takistab foolhappe sünteesi, mis on vajalik DNA sünteesiks. Tsiprofloksatsiin on fluorokinoloon, mis inhibeerib DNA güraasi ja topoisomeraas IV ja takistab mikroobide DNA replikatsiooni. Varasemates uuringutes on tuvastatud, et *Micrococcaceae* sugukonna liigid on põhjustanud baktereemiat, endokardiiti, peritontiiti, naha ja pehmete kudede infektsioone. Tuvastatud on resistentsust oksatsilliini, tsefasoliini, trimetroprimi, tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini vastu, mis kattub ka selle töö tulemustega (Purty et al., 2013; Varela et al., 2021).

Pseudomonadaceae sugukonna tüvedest ($n = 9$) tuvastati resistentsus kahel tüvel tsiprofloksatsiini vastu. Resistentsuse mehhanisme on uuritud kasutades mudelina liiki *P. aeruginosa*. Üheks resistentsuse mehhanismiks on mutatsioonid DNA grüaasi ja topoisomeraas IV alaühikuid kodeerivates geenides, mis põhjustab sihtmärkmolekulide struktuuri muutust ja vähendab nende afiinsust tsiprofloksatsiini suhtes. Tulemusena väheneb tsiprofloksatsiini efektiivsus DNA replikatsiooni ja transkriptsiooni inhibeerimisel, mis viib bakterite resistentsusele selle antibiootikumi suhtes. Teine mehhanism on seotud *effluks*-pumpade ekspressiooni tõusuga, mille abil vähendatakse antibiootikumi kontsentratsiooni rakus (Rehman et al., 2019).

Listeriaceae sugukonda ($n = 4$) kuulus kaks *B. thermosphacta* tüve, mis kuulub lihatoodete SSO bakterite gruppi. Uuritud tüvedel esines resistentsus tetratsükliinile ja klindamütsiinile. Varasemad uuringud on tuvastanud *B. thermosphacta* tüvedel plasmiidist tetratsükliini

resistentsusgeene. Genoomi uuringud on näidanud, et *B. thermosphacta* omab mitmeid effluks pumpasid, mis sarnanevad *L. monocytogenes*-e omadega. See viitab ühele võimalikule antibiootikumi- ja biotsiidiresistentsus mehhanismidele (Stanborough et al., 2017).

Enterobacteriaceae sugukonnas (n=16) tuvastati 8 tüvel resistentsus ampitsilliini ja ühel tüvel (*E. bugandensis*) resistentsus trimetroprimi ja klooramfenikooli vastu. Ampitsilliini resistentsus on mikroobidel seotud ensüüm beeta-laktamaasi tootmisega, mis tagab resistentsuse beeta-laktaamantibiootikumide suhtes. *E. bugandensis* on laia loodusliku reservuaariga, kõrgelt patogeenne mikroob, mida on seostatud neonataalse sepsise, nosokominaalsete infektsioonide ning baktereemiaga immuunpuudulikkusega patsientidel. Liigil *E. bugandensis* on tuvastatud multiresistentsust nii keskkonnast kui ka haiglast isoleeritud tüvedel (Matteoli et al., 2020; Pati et al., 2018).

Tabel 8. Antibiootikumiresistentsuse sagedustabel erinevate sugukondade lõikes. Paksus kirjas on välja toodud kõige kõrgemad resistentsuse ja tinglikult tundlikkuse osakaalud (%).

Sugukond	Tüvede arv	R osakaal	I osakaal	S osakaal
<i>Staphylococcaceae</i>	25	10	0	90
<i>Bacillaceae</i>	24	9	19	72
<i>Moraxellaceae</i>	20	6	0	94
<i>Enterobacteriaceae</i>	16	11	0	89
<i>Micrococcaceae</i>	16	17	0	83
<i>Lactobacillaceae</i>	11	3	1	96
<i>Pseudomonadaceae</i>	9	15	0	85
<i>Yersiniaceae</i>	6	10	0	90
<i>Erwiniaceae</i>	4	0	0	100
<i>Listeriaceae</i>	4	11	0	89

R – resistentne (*resistant*); I – tinglikult tundlik (*intermediate*); S – tundlik (*susceptible*)

Staphylococcaceae sugukonnas (n=25) isoleeriti multiresistentne tüvi *S. saprophyticus* (resistentsus 10 antibiootikumi suhtes). Lisaks multiresistentsusele moodustas tüvi tugevat biokilet, mis allus ainult osaliselt biotsiidi töötlemisele. Ainult happe ja alusega töötlus oli võimeline biokile bakterite metabolismet aktiivsust vähendama. *S. saprophyticus* on looduses ja elusolendite mikrobiotas leiduv bakter, mis põhjustab 10-20% uroinfektsioonidest noortel naistel. Hashemzadeh et al., (2021) uurisid uroinfektsiooni põhjustanud *S. saprophyticus* isolaate ning tuvastasid, et multiresistentsed tüved olid tugevamad biokile tekitajad, mis langeb kokku käesoleva magistritöö tulemusega. Lisaks kliinilistele isolaatidele leidub liiki *S. saprophyticus* piimatoodetes, puu- ja köögivilja toodetes, lihatoodetes ning on leitud, et toidumaatriksist pärinevad tüved on võimelised kanduma üle inimesele ning lisaks on tüved

võimelised kanduma inimeselt-inimesele. Tugev biokile tekitamine tagab hea koloniseerimise võimekuse nii toiduainetööstustes kui ka inimese limaskestadel. Biokile loob ka võimaluse tüvede levikuks erinevate „*One Health*“ sektorite ehk inimtervise, loomatervise, toidutootmise ja keskkonna vahel (Lawal et al., 2021).

Staphylococcaceae sugukonnas kuuel tüvel esines erütromütsiini suhtes resistentsus ning viiel tüvel penitsilliini vastu resistentsus. Viiel tüvel esines resistentsust vähemalt kahe antibiootikumi vastu ning kahel tüvel rohkem kui kahe antibiootikumi vastu.

Yersiniaceae sugukonnas (n=6) esines resistentsust kolmel tüvel: kahel *R. aquatilis* tüvel ampitsiliini suhtes ja ühel *E. americana* tüvel esines resistentsus tsiprofloksatsiini vastu. *R. aquatilis* on veest ja mullast sagedasti isoleeritud bakter ning üks domineerivatest bakteritest puu- ja köögiviljade pinnal, mida on seostatud toodete riknemisega. Nõrgenenud immuunsüsteemiga inimestel ning enneaegsetelt vastsündinutel on kirjeldatud *R. aquatilis* poolt põhjustatud infektsioone. Bakteri genoomist on tuvastatud 291 eeldatavat resistentsusgeeni, sealhulgas ka beeta-laktamaasi geenid ning selle tulenevalt esineb paljudel selle liigi tüvedel resistentsust ampitsilliini jt., antibiootikumide suhtes (Kuzdan et al., 2015; Ragaert et al., 2007; Roeder et al., 2021; Wang et al., 2023).

Bacillaceae sugukonnas (n=24) esines resistentsust üheksal uuritud tüvel ning tinglikult resistentsust esines 23 tüvel tsiprofloksatsiini suhtes. Kolm tüve olid resistentsed erütromütsiinile, kolm tüve klindamütsiinile, kaks tüve klindamütsiinile ja erütromütsiinile ning üks tüvi oli resistentne tsiprofloksatsiini suhtes.

Üle kõigi analüüsitud tüvede (n=152) esines resistentsust kõige enam rifampitsiini, trimetroprimi, tsiprofloksatsiini, penitsilliini, erütromütsiini, tsiprofloksatsiini, ampitsiliini ja klindamütsiini suhtes (Tabel 9). WHO (2024) juhendmaterjal on välja toodud, et rifampitsiin, tsiprofloksatsiin ja erütromütsiin on kriitilise olulisusega antibiootikumid ning trimetroprim, penitsilliin, ampitsilliin ja klindamütsiin on kõrge tähtsusega antibiootikumid inimravis ja veterinaarmeditsiinis.

Rifampitsiin on kliiniliselt oluline antibiootikum *Mycobacterium tuberculosis* raviks ning kindlatel näidustustel kasutusel veterinaarmeditsiinis mastiidi raviks. Resistentsetest tüvedest (n=18) 15-el esines resistentsus rohkem kui ühe antibiootikumi vastu. Resistentsus esines 11 *Lactobacillaceae* sugukonda kuuluval tüvel. Varasemalt on tuvastatud, et *Lactobacillaceae* tüved on rifampitsiini vastu tundlikud ning resistentseid tüvesid on leitud vähem. Tüvede resistentsusmehhanisme tuleks põhjalikumalt edasi uurida, et teha kindlaks, mis teel on tüvede

resistentsus kujunenud ning kas esinevad võimalikud AMR ülekandeteed (Campedelli et al., 2019; World Health Organization, 2024).

Tabel 9. Uuritud tüvede (n=152) antibiootikumiresistentsuse osakaalud (%), kõige suuremad resistentsuse osakaalud on toodud paksus kirjas.

Antibiootikum	Tüvede arv	R osakaal	I osakaal	S osakaal
Gentamütsiin	84	0	0	100
Kanamütsiin	38	3	0	97
Streptomütsiin	10	0	0	100
Neomütsiin	6	0	0	100
Tetratsükliin	78	13	0	87
Erütromütsiin	64	19	0	81
Klindamütsiin	87	18	0	82
Klooramfenikool	41	2	0	98
Ampitsilliin	80	18	0	83
Penitsilliin	51	20	0	80
Vankomütsiin	81	9	0	91
Kinupristiin-dalfopristiin	28	4	0	96
Linesoliid	91	3	0	97
Trimetoprim	90	23	0	77
Tsiprofloksatsiin	149	19	17	63
Rifampitsiin	63	29	0	71

R – resistentne (*resistant*); I – tinglikult tundlik (*intermediate*); S – tundlik (*susceptible*)

Tüvede antibiootikumiresistentsuse sagedused grupeeriti toiduainetööstuste kaupa, et tuvastada, kas toorainest sõltuvalt oli erinevusi resistentsuse sagedustes (Tabel 10). Kõige enam esines AMR-i puu- ja köögiviljatoodetest isoleeritud tüvedel. Selles tööstuses esines ka multiresistentne *S. saprophyticus*, mis grupi R sagedust märgatavalt tõstis. Piimatoodete grupis esines kaks multiresistentset tüve *Microbacterium paraoxydans* (resistentsus 7 antibiootikumi suhtes) ja *Brachybacterium nesterenkovi* (resistentsus 5 antibiootikumi suhtes).

Tabel 10. Uuritud tüvede (n=152) antibiootikumiresistentsuse osakaalud (%) toiduainetööstuste kaupa, kõige suuremad resistentsuse osakaalud on toodud paksus kirjas.

Toiduainetööstused	Tüvede arv	R osakaal	I osakaal	S osakaal
Piimatooted	55	14	2	84
Lihatooted	32	11	1	83
Pagaritooted	42	11	3	82
Puu- ja köögiviljatoodet	23	20	4	81

R – resistentne (*resistant*); I – tinglikult tundlik (*intermediate*); S – tundlik (*susceptible*)

Antibiootikumiresistentsuse olemasolu toiduainetööstuses leiduvatel SSO ja oportunistlikel patogeenidel (*E. bugandensis*, *S. saprophyticus*, *R. aquatilis*, *E. americana*, *Kocuria* spp.) on oluline leid, kuna mikroobide poolt tekitatud segakultuuri biokiledes võib esineda

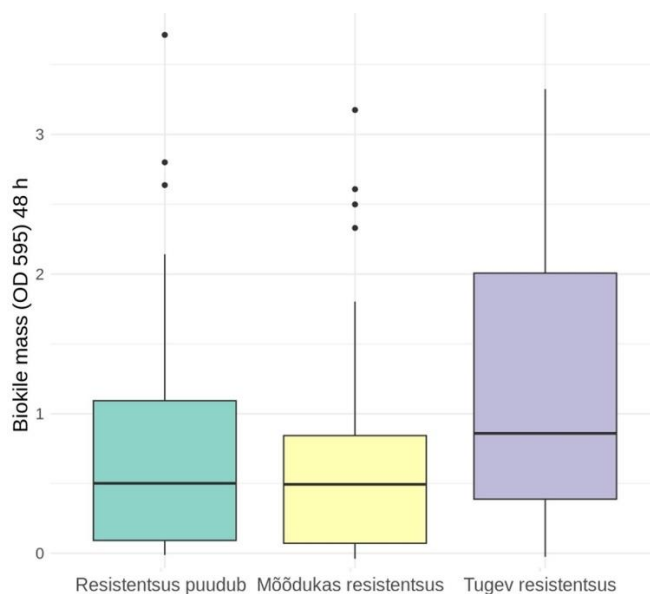
resistentsusgeenide ülekanne. Resistentsuse levik on probleemiks toiduseoseliste patogeenide puhul. Resistentsete bakterite poolt põhjustatud toiduseoseliste infektsioonide haigusperiood on pikem, majanduslikult kulukam ning kaasuvate haiguste korral raskema kuluga. Teine probleemkoht on resistentsusgeenide ülekanne oportunistlikele patogeenidele, mis ohustavad nõrgenenud immuunsüsteemiga populatsiooni. AMR oportunistlike patogeenide poolt põhjustatud infektsioonide korral on haiguse kulg raskem ning suremuse risk kõrgem (Larsson & Flach, 2022).

Antud töö puuduseks on, et tehnilistel põhjustel uuritavatel tüvedel ei määratud tsefalosporiinide tundlikkust. Tsefalosporiinid kuuluvad samuti kriitiliste antibiootikumide hulka ning edasistes uuringutes tasuks lisada tsefalosporiinid valitud sugukondade bakterite resistentsuse määramiseks.

2.3.7 Tüvede biokile tekitamise ja antibiootikumiresistentsuse vahelised seosed

Uuritud tüved grupeeriti kolme klassi MAR indeksist lähtuvalt. Joonisel 8 on toodud biokile massi jaotus 48 h möödudes (OD 595 nm) erinevate MAR indeksi väärtuste põhjal üle kõigi uuritud tüvede (n=152). Joonis 8 näitab biokile massi mediaani, kvartiilidevahemikku ja võimalikke erindeid kolmes erinevas MAR indeksi rühmas. Tulemused viitavad sellele, et biokile mass on suurim ja varieeruvam tugeva resistentsuse klassis võrreldes mõõduka ja puuduva resistentsuse klassiga.

Sugukondadel *Staphylococcaceae*, *Bacillaceae*, *Moraxellaceae* tüvede 48 h biokile massi ja biokile metaboolse aktiivsuse vahel ei leitud statistiliselt olulisi seoseid. Toiduainetööstuste kaupa ei leitud olulist seost 48 h kasvanud biokile bakterite metaboolse aktiivsuse ja MAR indeksite klasside vahel ($p=0,158$). Toiduainetööstuse kaupa esinesid statistiliselt olulised erinevused 48 h biokile massi ja resistentsuse puudmise ($p=0,029$) vahel ning 48 h biokile massi ja tugeva resistentsuse ($p=0,035$) vahel (Joonis 9).

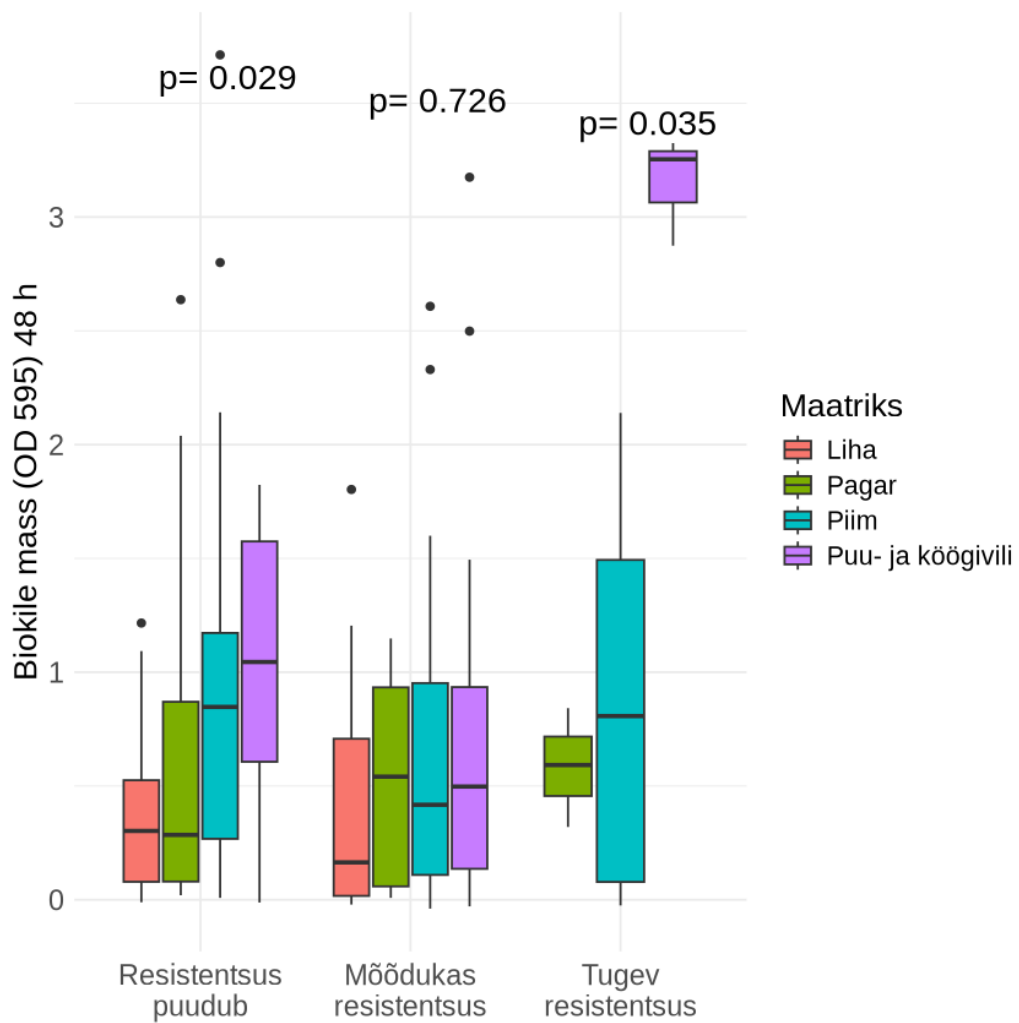


Joonis 8. Biokile massi (OD 595) jaotus 48 h möödudes erinevate MAR (*Multiple Antibiotic Resistance*) indeksi väärtuste klassides.

Tugevama resistentsuse korral on puu- ja köögiviljatööstuse ning piimatööstuse bakterite biokile mass suurem kui liha- ja pagaritööstuste tüvedel. See viitab sellele, et nende toiduainete bakterite antibiootikumiresistentsus soodustab tugevama biokile teket. Eriti selgelt oli seda seost näha puu- ja köögivilja tööstuses, kus tugeva resistentsuse klassis võrreldes teiste MAR-i klassidega, tekitasid bakterid märgatavalt suuremat kogust biokile massi. Sellest tulenevalt oli 48 h kasvanud biokile massi ja MAR-i vaheline seos puu- ja köögiviljatööstuses statistiliselt oluline ($p=0,017$). Kõik MAR indeksite klassid olid puu- ja köögiviljatööstustes üksteisest oluliselt erinevad.

See viitab, et biokile massi tekkis rohkem tüvedel, kellel esines tugev antibiootikumiresistentsus ja tüvedel kellel puudus antibiootikumiresistentsus. Kõigist tööstustest oli kõige kõrgem biokile mass ning biokile bakterite metaboolne aktiivsus 48 h puu- ja köögiviljatööstuses (Joonis 4). See võib olla mõjutatud tööstuses domineerivatest sugukondadest *Bacillaceae* ja *Staphylococcaceae* (Tabel 7).

Tulemused viitavad sellele, et antibiootikumiresistentsus võib mõjutada bakterite võimet moodustada biokilesid toiduainetööstuses. Toiduainetööstustest isoleeritud bakterite erinev biokile massi ja bakterite metaboolne aktiivsuse tuleneb tööstuste spetsiifiliselt keskkonnast, mida mõjutavad füüsilised temperatuur, tööstuse pinnad) ja keemilised (toitainete kättesaadavus, niiskus, veeaktiivsus, pH tase) tegurid.



Joonis 9. Toiduainetetööstuste 48 h kasvanud biokile massi (OD 595) võrdlus antibiootikumi resistentsuste klassisiseselt.

3 KOKKUVÕTE

Bakterite võime moodustada biokilet annab neile eelise jääda ellu toitainete vaeses keskkonnas ning suurendab tõenäosust jääda ellu pärast biotsiididega töötlust. Varasemate uuringute fookus on olnud toiduseoseliste patogeenide uurimisel, kuid sageli on toiduainetööstuste peamisteks probleemkohtadeks hoopis tööstuste spetsiifilised saastumist põhjustavad bakterid. Lisaks mängib biokile mängib olulist rolli antibiootikumiresistentsuse levikus, luues sobiva keskkonna resistentsusgeenide ülekandeks biokiles olevate bakterite vahel.

Lähtuvalt uuringu eesmärgist selgitati välja erinevates Eesti toiduainetööstustes enam levinud ning toote kvaliteeti mõjutanud bakterid. Selgus, et lisaks toote kvaliteeti mõjutavatele bakteritele leidub tööstustes oportunistlike patogeene (*E. bugandensis*, *S. saprophyticus*, *R. aquatilis*, *E. americana*, *Kocuria* spp). Erinevate toiduainetööstuste võrdlemisel selgus, et tööstuse tooraine erinevusest sõltub mikroobikooslused. Puu- ja köögviljatööstustest isoleeritud tüved olid võimelised tootma kõige tugevamat metaboolset aktiivsetest rakkudest koosnevat biokilet. Ettevõtete ja sugukondade kaupa erinesid tüvede biokile tootmise ning biokile moodustanud bakterirakkude metaboolse aktiivsuse tulemused. See annab alust arvata bakteri algne isoleerimise keskkond mõjutab tema biokile tootmise võimekust.

Erinevate biotsiidide võrdluses osutus kõige efektiivsemaks biokile eemaldamises ja metaboolse aktiivsuse vähendamises aluse ja happe töötlus. 73,5 % etanool ja P3Oxysan ZS olid efektiivsed küll bakterite metaboolse aktiivsuse vastu, kuid biokile massi eemaldasid osaliselt. Magistritöös selgus, et 73,5% etanooli ja P3OxysanZS biokile eemaldamise toimet mõjutab enim biokile massi hulka. See viitab, et need biotsiidid on tõhusad väiksema massiga biokile vastu. Alust ja hapet ning P3Oxysan ZS kasutatakse suurtööstustes CIP pesuprogrammides, kuid selgus, et tugevama biokile puhul P3Oxysan XS toime on ainult osaline. 73,5% etanooli kasutatakse enamasti pindade desinfitseerimiseks, kuid tugeva biokile eemaldamiseks pindadelt ei ole see biotsiid piisav.

Antibiootikumiresistentsust tuvastati toiduainetööstustest isoleeritud oportunistlikel patogeenidel, mis ohustavad nõrgenenud immuunsüsteemiga tarbijate populatsiooni. Lisaks leiti multiresistentseid oportunistlikke patogeene ning toidu kvaliteeti mõjutavaid baktereid. Toiduainetööstuste biokiled loovad keskkonna resistentsusgeenide levikuks ning toetavad multiresistentsete mikroobide väljakujunemist toidukäitlemise keskkonnas. Magistritöös selgus, et biokile massi teket soodustab konkreetse tüve resistentsus kolme või rohkema

antibiootikumi suhtes ja/või resistentsuse puudumine. See võib viidata, et antibiootikumiresistentsuse mehhanismid ja biokile tekke mehhanismid võivad olla omavahel seotud ning vajavad täpsemat uurimist.

The biofilm-forming ability of bacteria circulating in the food industries, their antibiotic sensitivity, and the sensitivity of biofilms to biocides

Liina Kuus

SUMMARY

In the food industries, biofilms pose significant challenges in maintaining cleanliness and ensuring product safety. Biofilms are complex microbial communities that adhere to surfaces, forming a protective matrix of extracellular polymeric substances. These structures can develop on various surfaces within food processing facilities, including equipment, pipelines, and storage containers. Biofilms significantly contribute to the spread of antibiotic resistance by creating an environment conducive to the transfer of resistance genes among bacteria.

Bacteria strains were isolated from the production environment of 8 representatives of the dairy, meat, bakery fruit and vegetable industries. Bacterial strains were selected based on their frequency and ability to cause product quality problems. The purpose of this study was to evaluate the biofilm-forming ability of the bacteria isolated from food industries and the effectiveness of possible biofilm elimination strategies. Another objective was to determine antibiotic resistance and explore the connection between antibiotic resistance and biofilm-forming ability.

In addition to bacteria that affect product quality, opportunistic pathogens such as *E. bugandensis*, *S. saprophyticus*, *R. aquatilis*, *E. americana*, and *Kocuria* spp. were identified. A comparison across different food industries revealed that microbial communities are influenced by the type of raw material used. Strains isolated from fruit and vegetable industries were found to produce the most robust biofilms composed of metabolically active cells. The results indicated that both biofilm production and the metabolic activity of biofilm-forming bacterial cells varied by company and genus, suggesting that the bacteria's original isolation environment influences their biofilm-forming capabilities.

In this study three different biocides (73,5% ethanol, 0,3% P3Ozysan ZS, 1,5% NaOH and 1,5 % HNO₃) treatments were tested against 24 h and 48 h matured biofilms. Alkaline and acidic treatments were the most effective in removing biofilms and reducing metabolic activity. While 73.5% ethanol and P3Oxysan ZS were effective against bacterial metabolic activity, they only partially removed the biofilm mass. The thesis revealed that the effectiveness of 73.5% ethanol and P3Oxysan ZS in biofilm removal is most influenced by the amount of biofilm mass. This indicates that these biocides are effective against biofilms with a smaller mass. Alkaline and acidic treatments, as well as P3Oxysan ZS, are used in CIP (clean-in-place) washing programs

in large industries, but it was found that for stronger biofilms, P3Oxysan ZS's effect is only partial. In this thesis it was found that 73.5% ethanol is not sufficient for removing strong biofilms from surfaces.

Antibiotic resistance was identified in opportunistic pathogens isolated from food industries, posing a risk to consumers with weakened immune systems. Additionally, multi-resistant opportunistic pathogens and bacteria affecting food quality were found. Biofilms in food industries create an environment conducive to the spread of resistance genes and support the development of multi-resistant microbes in food handling environments. The study revealed that biofilm mass formation is facilitated by specific strains' resistance to three or more antibiotics and/or the absence of resistance. This suggests a potential relationship between the mechanisms of antibiotic resistance and biofilm formation, warranting further investigation.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma lõputöö juhendajaid Jelena Štšepetova-t ja Epp Songisepp-a, kes aitasid töö valmistamisele oma teadmistega kaasa ning olid usinad lugejad. Lisaks soovin tänada Mirjam Vallas-t, kes aitas andmete analüüsiga ning jagas lahkelt oma teadmisi.

Soovin tänada BioCC kolleege, kes olid näinud palju vaeva bakteriisolaatide kogumisega.

- Akoglu, H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine, 18*(3), 91–93.
- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., & Cotter, P. D. (2019). Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology, 10*(1), 173–195.
- Amsalu, A., Sapula, S. A., De Barros Lopes, M., Hart, B. J., Nguyen, A. H., Drigo, B., Turnidge, J., Leong, L. E., & Venter, H. (2020). Efflux Pump-Driven Antibiotic and Biocide Cross-Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Different Ecological Niches: A Case Study in the Development of Multidrug Resistance in Environmental Hotspots. *Microorganisms, 8*(11), 1647–1647.
- André, S., Vallaeys, T., & Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Research in Microbiology, 168*(4), 379–387.
- Antoniou, K., & Frank, J. F. (2005). Removal of *Pseudomonas putida* Biofilm and Associated Extracellular Polymeric Substances from Stainless Steel by Alkali Cleaning. *Journal of Food Protection, 68*(2), 277–281.
- Bremer, P. J., Fillery, S., & McQuillan, A. J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology, 106*(3), 254–262.
- Brooun, A., Liu, S., & Lewis, K. (2000). A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44*(3), 640–646.
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., & O'Toole, P. W. (2019). Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology, 85*(1), e01738-18.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>

- Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, *97*(2), 111–122.
- 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*(4), 2014–2014.
- Chino, T., Nukui, Y., Morishita, Y., & Moriya, K. (2017). Morphological bactericidal fast-acting effects of peracetic acid, a high-level disinfectant, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in tubing. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *6*(1), 122–122.
- de Brito, F. A. E. de, de Freitas, A. P. P. de, & Nascimento, M. S. (2022). Multidrug-Resistant Biofilms (MDR): Main Mechanisms of Tolerance and Resistance in the Food Supply Chain. *Pathogens*, *11*(12), 1416–1416.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, *8*(9), 881–890.
- Duanis-Assaf, D., Steinberg, D., Chai, Y., & Shemesh, M. (2016). The LuxS Based Quorum Sensing Governs Lactose Induced Biofilm Formation by *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, *6*.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jacxsens, L., Skjerdal, T., Da Silva Felicio, M. T., ... Lindqvist, R. (2020). Guidance on date marking and related food information: Part 1 (date marking). *EFSA Journal*, *18*(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6306>
- EUCAST guidance on “When there are no breakpoints in breakpoint tables?” (2023).

- Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 852/2004, 29. aprill 2004, toiduainete hügieeni kohta, ELT L 139, 30.4.2004, p. 1–54.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34–40.
- Gaillac, A., Briandet, R., Delahaye, E., Deschamps, J., Vigneau, E., Courcoux, P., Jaffrès, E., & Prévost, H. (2022). Exploring the Diversity of Biofilm Formation by the Food Spoiler *Brochothrix thermosphacta*. *Microorganisms*, 10(12), 2474–2474.
- Guttenplan, S. B., Shaw, S., & Kearns, D. B. (2013). The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 87(1), 211–229.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108.
- Haney, E. F., Trimble, M. J., & Hancock, R. E. W. (2021). Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nature Protocols*, 16(5), 2615–2632.
- Hashemzadeh, M., Dezfuli, A. A. Z., Nashibi, R., Jahangirimehr, F., & Akbarian, Z. A. (2021). Study of biofilm formation, structure and antibiotic resistance in *Staphylococcus saprophyticus* strains causing urinary tract infection in women in Ahvaz, Iran. *New Microbes and New Infections*, 39, 100831–100831.
- Hassett, D. J., Ma, J., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E. H., Huang, C., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., McFeters, G., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology*, 34(5), 1082–1093.

- Hoyle, B. D., Alcantara, J., & Costerton, J. W. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(9), 2054–2056.
- ISO 10932:2010 | IDF 223:2010 Milk and milk products — Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB).
- ISO 20776-1:2019 Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
- Kalmokoff, M. L., Austin, J. W., Wan, X.-D., Sanders, G., Banerjee, S., & Farber, J. M. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 725–734. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01419.x>
- Kaplan, H. B., & Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of Bacteriology*, 163(3), 1210–1214.
- Khayyira, A. S., Rosdina, A. E., Irianti, M. I., & Malik, A. (2020). Simultaneous profiling and cultivation of the skin microbiome of healthy young adult skin for the development of therapeutic agents. *Heliyon*, 6(4), e03700–e03700.
- Komisjoni määrus (EÜ) nr 2073/2005, toiduainete mikrobioloogiliste kriteeriumite kohta. ELT L 338, 22.12.2005, lk 1-26.
- Kumari, S., & Sarkar, P. K. (2014). In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control*, 36(1), 153–158.

- Kuzdan, C., Soysal, A., Özdemir, H., Coşkun, Ş., Akman, İ., Bilgen, H., Özek, E., & Bakır, M. (2015). Rahnella aquatilis Sepsis in a Premature Newborn. *Case Reports in Pediatrics*, 2015, 1–3.
- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269.
- Lawal, O. U., Fraqueza, M. J., Bouchami, O., Worning, P., Bartels, M. D., Gonçalves, M. L., Paixão, P., Gonçalves, E., Toscano, C., Empel, J., Urbaś, M., Domínguez, M. A., Westh, H., de Lencastre, H., & Miragaia, M. (2021). Foodborne Origin and Local and Global Spread of Staphylococcus saprophyticus Causing Human Urinary Tract Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 27(3), 880–893.
- Lichtenberg, M., Kragh, K. N., Fritz, B., Kirkegaard, J. B., Tolker-Nielsen, T., & Bjarnsholt, T. (2022). Cyclic-di-GMP signaling controls metabolic activity in Pseudomonas aeruginosa. *Cell Reports*, 41(3), 111515–111515.
- Loy-Hendrickx, A. D., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Jaxsens, L., & Devlieghere, F. (2018). *Microbiological guidelines: Support for interpretation of microbiological test results of foods*. Brugge : die Keure.
- Luo, L. M., Wu, L. J., Xiao, Y. L., Zhao, D., Chen, Z. X., Kang, M., Zhang, Q., & Xie, Y. (2015). Enhancing pili assembly and biofilm formation in Acinetobacter baumannii ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. *BMC Microbiology*, 15(1).
- Ma, L., Konkel, M. E., & Lu, X. (2021). Antimicrobial Resistance Gene Transfer from Campylobacter jejuni in Mono- and Dual-Species Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(15).
- Matteoli, F. P., Passarelli-Araujo, H., Pedrosa-Silva, F., Olivares, F. L., & Venancio, T. M. (2020). Population structure and pangenome analysis of Enterobacter bugandensis uncover the presence of blaCTX-M-55, blaNDM-5 and blaIMI-1, along with sophisticated iron acquisition strategies. *Genomics*, 112(2), 1182–1191.

- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Sillanpaa, J., Garsin, D. A., Hook, M., Erlandsen, S. L., & Murray, B. E. (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(10), 2799–2807.
- Nychas, G.-J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, *78*(1–2), 77–89.
- Pati, N. B., Doijad, S. P., Schultze, T., Mannala, G. K., Yao, Y., Jaiswal, S., Ryan, D., Suar, M., Gwozdziński, K., Bunk, B., Mraheil, M. A., Marahiel, M. A., Hegemann, J. D., Spröer, C., Goesmann, A., Falgenhauer, L., Hain, T., Imirzalioglu, C., Mshana, S. E., ... Chakraborty, T. (2018). *Enterobacter bugandensis*: A novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. *Scientific Reports*, *8*(1), 5392–5392.
- Purty, S., Saranathan, R., Prashanth, K., Narayanan, K., Asir, J., Sheela Devi, C., & Kumar Amarnath, S. (2013). The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: A case report and literature review. *Emerging Microbes & Infections*, *2*(1), 1–8.
- Ragaert, P., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *44*(3), 185–194.
- Ramírez-Larrota, J. S., & Eckhard, U. (2022). An Introduction to Bacterial Biofilms and Their Proteases, and Their Roles in Host Infection and Immune Evasion. *Biomolecules*, *12*(2), 306–306.
- Rehman, A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, *68*(1), 1–10.
- Roeder, H. A., Fuller, B., & Scoular, S. (2021). Septic Shock Caused by *Rahnella aquatilis* Bacteremia in an Immunocompetent Adult. *American Journal of Case Reports*, *22*.

- Romanova, N. A., Wolffs, P. F. G., Brovko, L. Y., & Griffiths, M. W. (2006). Role of Efflux Pumps in Adaptation and Resistance of *Listeria monocytogenes* to Benzalkonium Chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(5), 3498–3503.
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., ... Galobart, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, *16*(3).
- Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S. (2016). Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *7*, 56–66.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, *184*(4), 1140–1154.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(10), 608–620.
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., & Hengge, R. (2013). Microanatomy at Cellular Resolution and Spatial Order of Physiological Differentiation in a Bacterial Biofilm. *mBio*, *4*(2).
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(9), 407–413.
- Singh, A., Prakash, P., Achra, A., Singh, G., Das, A., & Singh, R. (2017). Standardization and classification of In vitro biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Infectious Diseases*, *9*(3), 93–93.

- Szczuka, E., Telega, K., & Kaznowski, A. (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiologica*, *60*(1), 1–5.
- Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S. M., Tamplin, M., & Chandry, P. S. (2017). Insight into the Genome of *Brochothrix thermosphacta*, a Problematic Meat Spoilage Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, *83*(5).
- Stewart, P. S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J. G., Lewandowski, Z., Ochsner, U. A., & Hassett, D. J. (2000). Effect of Catalase on Hydrogen Peroxide Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(2), 836–838.
- Zhu, T., Yang, C., Bao, X., Chen, F., & Guo, X. (2022). Strategies for controlling biofilm formation in food industry. *Grain & Oil Science and Technology*, *5*(4), 179–186.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.01, 2024.*
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, *10*(5), 593–593.
- Vikesland, P., Garner, E., Gupta, S., Kang, S., Maile-Moskowitz, A., & Zhu, N. (2019). Differential Drivers of Antimicrobial Resistance across the World. *Accounts of Chemical Research*, *52*(4), 916–924.
- Vuong, C., Voyich, J. M., Fischer, E. R., Braughton, K. R., Whitney, A. R., DeLeo, F. R., & Otto, M. (2004). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular Microbiology*, *6*(3), 269–275.
- Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003). Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic

- Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317–323.
- Wang, B., Jin, H., Xu, Y., & Sun, Z. (2023). Isolation, Characterization, and Genomic Analysis of Multidrug-Resistant *Rahnella aquatilis* from Fruits in China. *Current Microbiology*, 80(10), 321–321.
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., & Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860–864.
- William A. Rutala, David J. Weber, & Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). (2019). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*.
- World Health Organization. (2024). *WHO's List of Medically Important Antimicrobials: A risk management tool for mitigating antimicrobial resistance due to non-human use*.
- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, United Nations Environment Programme and World Organisation for Animal Health. (2023). *A one health priority research agenda for antimicrobial resistance*.
- Xu, K. D., Franklin, M. J., Park, C.-H., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (2001). Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 67–71.
- Xu, Z. S., Ju, T., Yang, X., & Gänzle, M. (2023). A Meta-Analysis of Bacterial Communities in Food Processing Facilities: Driving Forces for Assembly of Core and Accessory Microbiomes across Different Food Commodities. *Microorganisms*, 11(6), 1575–1575.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liina Kuus

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Toiduainetööstustes ringlevate bakterite biokile tekitamise võimekus, antibiootikumiresistentsus ja biokile biotsiidi tundlikkus“

mille juhendajad on Jelena Ššepetova ja Epp Songisepp

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Liina Kuus

30.05.2024