

Pintojen mikrobiologiaa – biofilmin muodostus pinnoille ja poisto pinnoilta, mikrobiologinen näytteenotto, analysointi ja tulosten tulkinta.

Wirtanen, Gun Linnea; Salo, Satu

Published in:

Eläinlääkäripäivät Luentokokoelma 2015

Publication date:

2015

Document Version

Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):

Wirtanen, G. L., & Salo, S. (2015). Pintojen mikrobiologiaa – biofilmin muodostus pinnoille ja poisto pinnoilta, mikrobiologinen näytteenotto, analysointi ja tulosten tulkinta. In Eläinlääkäripäivät Luentokokoelma 2015 (pp. 257-264). Helsinki.

DTU Library

Technical Information Center of Denmark

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Pintojen mikrobiologiaa – biofilmin muodostus pinnoille ja poisto pinnoilta, mikrobiologinen näytteenotto, analysointi ja tulosten tulkinta

Gun Wirtanen ja Satu Salo

DTU National Food Institute, Technical University of Denmark,

Kgs. Lyngby, Tanska

Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy, Espoo, Suomi

Yhteenveto

Elintarviketeollisuuden vaarat ovat aineita tai olosuhteita, jotka voivat aiheuttaa haitallisia terveysvaikutuksia, ja ne ovat joko mikrobiologisia esim. biofilmin muodostusta, biologisia, kemiallisia, fyysisiä tai informatiivisia. Biofilmin muodostuminen alkaa mikrobisolun kiinnittymisellä tuotantopintaan, sen jälkeen solu alkaa kasvaa pinnalla, pintaan kiinnittyneet solut jakaantuvat ja kasvavat muodostaen limaa. Täysin kehittyneet biofilmit koostuvat mikrobisoluklustereista ekstrasellulaarisessa polysakkaridi- ja glykoproteiini-matriisissa, jossa on kanavia, jotka mahdollistavat mikrobisolujen ravinnon ja hapen saamisen biofilmissä. Mikrobit tuotanto- ja ympäristöpinnoilla ovat enimmäkseen haitallisia tuotteille, koska ne ovat joko pilaajia tai taudinaiheuttajia. Useat epidemiat *Listeria monocytogenes*-, *Bacillus cereus*-, *Salmonella*- ja entero-hemoraattisella *Escherichia coli*-bakteereilla viimeisten kymmenien vuosien ajan ovat haavoittaneet eurooppalaisten ja amerikkalaisten kuluttajien luotamusta elintarviketurvallisuuteen. Oikeaoppiset puhdistus- ja desinfiointimenettelyt elintarviketuotannon kosketuspinoilla edesauttavat ettei elintarvikeperäisiä epidemioita synny. Tarvitaan käytännöllisiä menetelmiä mikrobien ja orgaanisen lian arvioimiseen pinnoilla, jotta voidaan laatia laitteille optimaaliset puhdistusrutiinit ja myös varmistaa puhdistuksen tehokkuus.

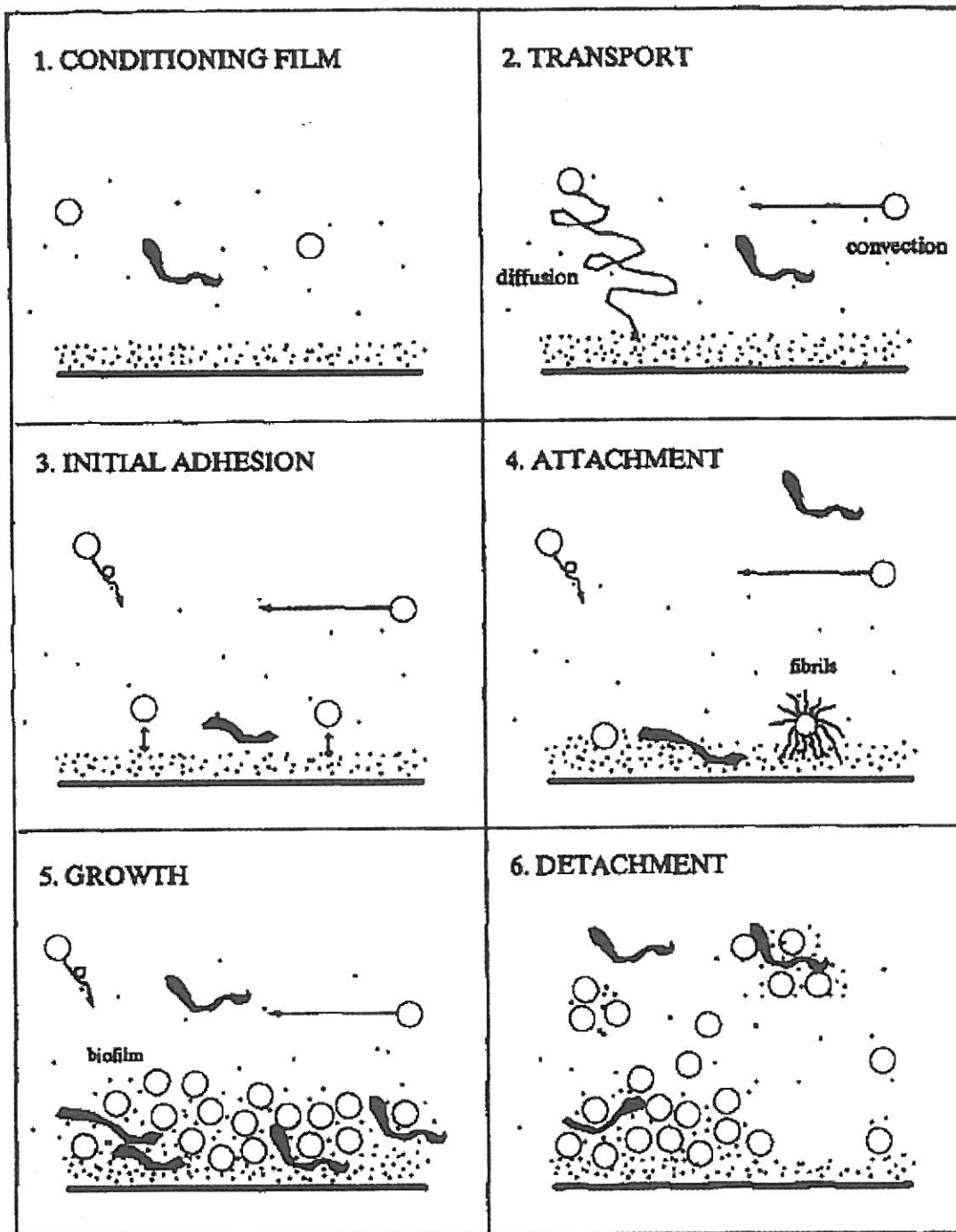
Biofilmin muodostus ja biofilmiriskit tuotantopinoilla

Mikrobit kiinnittyvät ja kasvavat mieluummin pinnoille kuin ovat nesteessä ja siksi useimmat elintarvikkeita saastuttavat mikrobit löytyvät laite- tai tuotantopinoilta biofilmin muodossa. Biofilmin muodostuminen (kuva 1) alkaa mikrobisolun kiinnittymisellä pintaan, solun kasvu alkaa kiinnittymisen jälkeen ja samalla solut erittävät limaa, joka voi koostua sekä polysakkarideista että glykoproteiineista, pinnalle. Biofilmit ovat monikerroksisia solurakenteita. Biofilmin muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi ympäristön happamuus, ravinnepitoisuudet ja lämpötila. Li-massa mikrobisolut suojautuvat ympäristötekijöiltä kuten epäedulliselta lämpötilalta, virtaukselta sekä kemiallisilta hyökkäyksiltä mm. antibiooteilta ja desinfiointiaineilta. Biofilmit koostuvat mikrobisoluklustereista, jotka ovat ekstrasellulaarisessa polysakkaridi- ja glykoproteiinimatriisissa. Niiden sisällä on verkosto sisäisiä kanavia tai onteloita, jotka mahdollistavat ravinteiden ja hapen siirtymisen nesteestä soluihin.

Elintarviketeollisuuden tuotanto- ja ympäristöpinnoilla olevat mikrobit ovat enimmäkseen haitallisia, koska ne ovat joko pilaajia tai taudinaiheuttajia ja väärissä paikoissa ne saastuttavat prosessipintoja ja prosessissa tuotettuja tuotteita. On myös tärkeää muistaa, että jopa 96–98 % biofilmistä koostuu vedestä, mikä tarkoittaa, että vain 2–4 % koko biofilmin tilavuudesta on havaittavissa kuivilla pinnoilla. Sekä laboratoriotutkimukset biofilmeillä että hygieniakartoitukset teollisuuspinnoilta ovat osoittaneet, että pintoihin kiinnittyneet taudinaiheuttajat ovat vastustuskykyisempiä desinfiointiaineita vastaan kuin vastaavien mikrobien solut nesteissä. Patogeenien aiheuttamista tapauksista on alla koottu tietoa.

On huolestuttavaa, että taudinaiheuttajia kuten *Listeria monocytogenes*, metisilliniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Cronobacter sakazakii*, enterohemorraattiset *Escherichia coli*-kannat, *Salmonella Typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Legionella pneumophila* ja *Candida albicans* muodostavat biofilmejä elintarviketuotantopinnoille. Biofilmejä on vaikea poistaa niiden tahmeiden ja limaisten rakenteiden takia. Kirjallisuuden mukaan jo vuonna 1999 *Listeria*-biofilmejä on löydetty valmisruokien ja maitotuotteiden kanssa kosketuksissa olevilta pinnoilta. Nämä molemmat tuoteryhmät kuuluvat elintarviketuotantoon, jossa mikrobiologisen kontaminaation riski on korkea. Näiden tutkimusten mukaan 35–42 % tutkituista ympäristöpinnoista oli saastunut *Listeria*-biofilmeillä. Samassa raportissa todettiin, että kylmissä olosuhteissa *S. aureus* -löydöksiä oli kontaktipinnoilla 7 % ja vastaavasti 8 % ympäristönäytteistä. *Listeria*-biofilmejä on tutkittu teollisuusympäristöissä laajasti aina 1980-luvun alussa olleesta Kanadan coleslaw-tapauksesta lähtien lähiaikoina Tanskassa tapahtuneisiin sekä rullepølse- että lohitapauksiin ja keväällä 2015 Yhdysvalloissa tapahtuneisiin karamelliomena- ja jäätelötapauksiin.

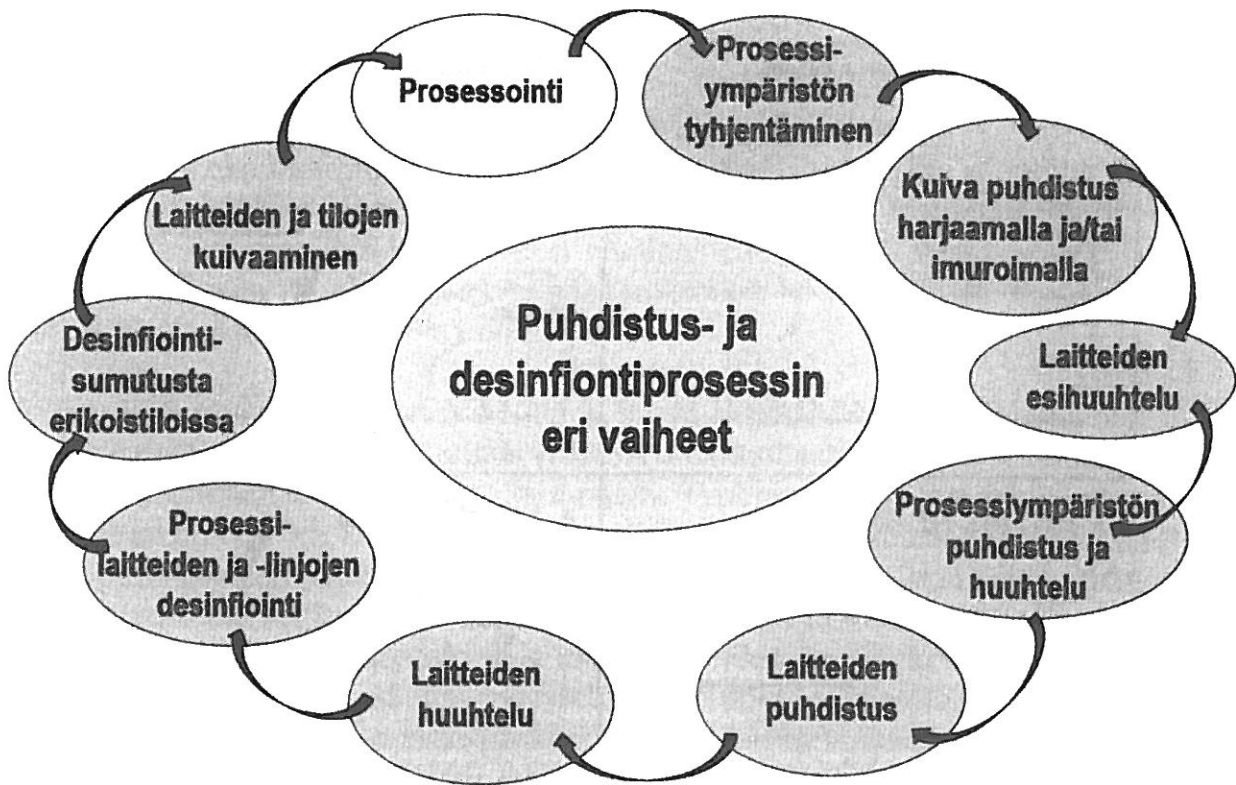
Kaikista ponnisteluista huolimatta laajoja epidemioita on vuosittain sekä Euroopassa että USA:ssa. Joissakin epidemioissa ihmisiä joutuu sairaalahoitoon ja heikkokuntoisia potilaita jopa kuolevat. Euroopan unionin (EU) yhteenvedossa zoonoottisista tapahtumista (EFSA ja ECDC, 2015) vuonna 2013 oli yhteensä 1763 tapausta. Raportoitu kuolleisuus oli 10,8 % ja kuolemantapauksia yhteensä 191. Listerioositapaukset ovat nousussa vuoteen 2012 verrattuna. Suuntaus on EU / ETA-alueella ollut kasvussa vuosina 2009–2013. Foodborne Diseases Active Surveillance Network:sta (FoodNet:sta) peräisin olevien Yhdysvaltojen valvontatietojen mukaan vuosina 2004–09 oli yhteensä 762 listerioositapausta. Kaikista tapauksista 18 % johti kuolemaan. Listeriooseissa on usein korkeat kuolleisuuslukemat, varsinkin silloin, kun sairaalahoitoon joutuvat potilaat ovat vanhuksia, imeväisikäisiä lapsia, heikentyneellä vastustuskyvyllä olevia ihmisiä tai raskaana olevia naisia. Uusia tutkimuksia tehdään jatkuvasti ja löydöksiä raportoidaan tasaisesti.



Kuva 1. Biofilmi muodostuksen eri vaiheet solun siirtymisestä liuoksesta pinnalle, solun kiinnittymisestä pinnalle, solun kasvusta solurykelmäksi ja edelleen biofilmiksi sekä biofilmin irtoaminen ulkoisella voimalla pinnasta takasin liuokseen (Gottenbos ym., 1999).

Biofilmin poisto

Pintojen puhtaus, henkilöstön koulutus sekä hyvät tuotantotavat että hyvät suunnittelukäytännöt ovat tärkeimpiä välineitä biofilmiongelmien minimointiin. Oikeaoppiset puhdistus- ja desinfiointimenettelyt (kuva 2) elintarviketuotannon kosketuspinoilla edesauttavat elintarvikeperäisten epidemioiden torjuntaa.



Kuva 2. Puhdistus- ja desinfiointiprosessin eri vaiheet (Wirtanen ja Salo, 2014).

Puhdistus ja desinfiointi toteutetaan elintarviketehtaissa, jotta siellä voidaan tuottaa turvallisia, säilyviä ja laadukkaita tuotteita. Biofilmin poisto on kuitenkin vaikea ja vaativa tehtävä. Puhdistusjärjestelmän mekaaniset tekijät, kemialliset aineet, lämpötila ja vaikutusaika on valittava huolella, jotta puhdistuksen vaikutus olisi riittävä. Tehokas puhdistus muodostuu pesu- ja desinfiointiainekäsittelyistä tehokkailla pitoisuuksilla oikeissa lämpötiloissa sisältäen tehokkaita väli- ja loppuhuuhteluita. Pesuaineiden perustehtävänä on vähentää pintajännitystä lian ja pintojen välillä siten, että myös biofilmiä eli mikrobilikaa sekoittuu veteen. Täten mikrobilikajäämät on huuhdeltavissa pinnoilta. Avain tehokkaaseen puhdistukseen tuotantotilassa on, että henkilöstö tiedostaa likatyypin (esim. rasvaa, proteiineja, hiilihydraatteja, sokeria, suolaa ja mikrobeja), mitä heidän on poistettava pinnoilta. Henkilöstön on oltava asianmukaisesti koulutettu ja heidän pitää ottaa vastuuta ja säilyttää tehtaan prosessihygienia hyvällä tasolla. Pesuliuosten uudelleenkäyttö on rajattava esihuuhteluihin tai esipesuihin, koska vanhojen pesuliuosten uudelleenkäyttö voi saastuttaa laitepinnoita ja näin heikentää puhdistustulosta.

Puhdistustehoon vaikuttaa myös pääsy puhdistettavaan laitteeseen. Biofilmin poisto vaikeasti puhdistettavista laitteista voidaan tehdä purkamalla laitteet manuaalista puhdistusta varten. Purettu laiteosat ja välineet pitää tämän jälkeen säilyttää joko telineissä tai pöydillä muttei lattialla. Desinfiointiaineiden tehtävä on tappaa puhdistuksen jälkeen pinnoille mahdollisesti jääneet mikrobit. Puhdistus avoimissa prosesseissa suoritetaan enimmäkseen loppudesinfiointilla. Kosteissa prosessiympäristöissä pinnoille jäljelle jäävät, elävät mikrobit pitää tappaa, koska muutoin ne voivat pilata tuotettavia tuotteita. Desinfiointiaineiden jäämiä ei saa jättää prosessipinnoille;

pinnat on huuhdeltava juomakelpoisella vedellä. Pinnoille pitkäksi ajaksi jätetyt desinfiointiaineet tai liian laimeina pitoisuuksina käytetyt desinfiointiaineet voivat johdattaa mikrobien vastustuskyvyn kasvuun. On olemassa niin sanottua fotobakteeritesti, jota voidaan käyttää varmistamaan, että desinfioituja pintoja on huuhdeltu riittävästi. Fotobakteeritesti perustuu bioluminenssiin ja testissä käytetään *Vibrio fischeri*-bakteeria. Testissä *V. fischeri*-bakteerien valotuotto vähenee kun bakteeri altistuu myrkyllisille yhdisteille kuten puhdistus- ja desinfiointiaineille. Lopuksi pitää todeta että välineet, laitteet ja prosessilinjat pitää kuivattaa hyvin ilmastoidussa tilassa, sillä mikrobit eivät kasva kuivilla, puhtailla pinnoilla.

Mikrobiologinen näytteenotto prosessipinnoilta ja näytteiden analysointi

Elintarviketeollisuudessa ensimmäinen askel hygienian parantamiseen on tunnistaa biofilmiongelmia prosesseissa tai prosessilinjoilla. Käytännöllisiä menetelmiä (taulukko 1) tarvitaan mikrobien ja orgaanisen lian määrittämiseksi prosessipinnoilla, jotta voidaan optimoida laitteiden puhdistusta ja tarkastaa puhdistuksen tehokkuutta. Biofilmit eivät ole pysyviä ja näin ollen välillä vaikeasti mitattavissa. Biofilmin määrittäminen perustuu mikrobiologisiin ja kemiallisiin menetelmiin sekä molekyylibiologiaan että mikroskopiaan. Biofilmin määrittämisessä käytettävät kemialliset menetelmät perustuvat spesifisten yhdisteiden muodostumiseen tai hyödyntämiseen esimerkiksi orgaaninen hiili, happi, polysakkaridit ja proteiinit, elävien solujen määrät ja sisältö kuten adenosini-5'-trifosfaatti (ATP). Tärkeitä työkaluja modernissa biotekniikan tutkimuksessa ovat erityyppiset mikroskopointitekniikat. Monia eri fluorokromeja käytetään mikrobien värjäämiseen elintarvikenäytteissä, biofilmeissä ja ympäristönäytteissä. Biofilmisolujen havaitsemiseen ja eristämiseen ja edelleen karakterisointiin on myös tärkeää käyttää parhaiten soveltuvia menetelmiä mm. molekyylibiologisia tai biokemiallisia menetelmiä. Erilaisia havaitsemis- ja tunnistamis menetelmiä voidaan käyttää joko tunnistamaan lika tai mikrobit suoraan näyttemateriaalista tai välillisesti näytteiden puhtasviljelmistä. Eniten käytetyt molekyylibiologiset tekniikat bakteerien havaitsemiseen ja tunnistamiseen ovat polymeerasiketjureaktioon (PCR), sekvensointiin ja hybridisaatioon perustuvat tekniikat. Seuraavan sukupolven sekvensointitekniikat mahdollistavat tutkimukset mikrobiyhteisöjen syvemmissä kerroksissa kun taas perus PCR-tekniikkaa käytetään taudinaiheuttajien löytämiseen. Sekvensoinnin viimeaikaiset kehitykset mm. uudet reagenssit ja välineet sekä myös kehitykset bioinformatiikassa ovat mullistaneet mikrobiökologiaa ja genomiikkaa. In situ fluoresenssihybridisaatio havaitsee nukleiinihapposekvenssit käyttämällä fluoresoivaa leimattua koetinta, joka hybridisoituu spesifisesti komplementaariseen kohdesekvenssiin ehjän solun sisällä. Tulokset voidaan tarkastella käyttämällä epifluoresenssimikroskopiaa tai konfokaalilasermikroskopiaa tai virtausytometriä.

Hygieniaseurantamenetelmät perustuvat edelleen lähinnä perinteisiin viljelymenetelmiin, jossa mikrobinäyte otetaan tutkittavasta pinnasta vanutupolla, sideharsotaitoksella tai teipillä, huuhtelua tai painamalla selektiivisiä tai yleisiä ravintoalustoja pintaan. Ensimmäiset haasteet ovat näytteen irrotus pinnalta ja sen jälkeen näytteen sekoittaminen asianmukaisesti viljelyä varten. Laboratorioiden välisessä vertailututkimuksessa huomasimme, että mikrobisaanto oli samalla tasolla kun näytteet oli otettu sekä kontaktimaljatekniikalla että tupottamalla viljelyä varten. Rajoittava tekijä menetelmissä, jotka perustuvat näytteenottoon tupoilla, sienillä, non-woven

sideharsoilla tai mikrokuituliinoilla on pintoihin kiinnittyneiden mikrobien irrottaminen. Saantoa pinnoilta voidaan parantaa kastelemalla pintaa steriilillä vedellä tai vastaavalla laimennusliuoksella ennen näytteenottoa. Liian voimakas käsittely biofilmin pinnasta irtoamisen yhteydessä voi vahingoittaa soluja, jolloin ne eivät pysty kasvamaan ravinneagarmaljoilla, kun taas myös riittämätön käsittely voi aiheuttaa epätarkkoja tuloksia. Ultraäänikäsittely biofilmisolujen irrottamisessa pinnasta on noin 10 kertaa tehokkaampi tupotukseen verrattuna. On kuitenkin muistettava että vertailtaessa tuloksia näytteenoton ja näytteenkäsittelyn pitää olla samalla tavalla tehtyjä. Jatkuvatoiminen seuranta biofilmin mittauksissa olisi suljetuissa järjestelmissä ihanteellinen.

Tulosten tulkinta

Pintahygieniatestauksessa yleisindikaattoreina pitäisi käyttää aerobisten bakteerien, hiivojen, homeiden ja koliformien määriä. Erityiset mikrobit kuten *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* ja *Echerichia coli* voidaan lisätä näytteistä analysoitavien mikrobien listalle tuotettujen tuotteiden mikrobiriskien mukaan. Hygienianäytteet otetaan tavallisesti puhdistuksen jälkeen juuri ennen toiminnan alkua vuorossa, mikä tarkoittaa, että ainakin kosketuspintojen pitäisi olla hyvällä hygieniasella tasolla. Eri mikrobien raja-arvot voidaan asettaa esim. kolmeen ryhmään (löysä, normaali ja tiukka) riippuen tuotannollisesta toiminnasta eri alueilla. Kullekin alueelle voidaan itsenäisesti määrittää tavoitetasot eri mikrobeille. Tavoitearvojen perusteella voidaan laatia hygieniatason luokittelussa käytettävät asteikot (esimerkiksi kolme luokkaa: hyvä, riittävä ja huono hygieniataso). Luokittelu ja tavoitetasojen määrittely voi perustua joko omiin tuloksiin tai kirjallisuudesta otettuihin arvoihin, mikäli omia tuloksia ei ole käytettävissä. Tieto aerobisten bakteerien määrästä on erityisen tarpeellinen, silloin kun tuotetaan tuotteita, joilla on pitkä myynti-aika. Lisäksi suhteellisen hygieenisissä tiloissa aerobisten mikrobien määrät voivat paljastaa paikkoja, joissa tarvitaan parannuksia. Koliformien esiintymistä pidetään merkinä huonosta hygieniasta. Sienten läsnäolo on merkinä joko mahdollisesta kosteusongelmasta tai heikentyneestä ilmanlaadusta. Tuotteiden pilaantumisherkyys on pidettävä mielessä, kun asetetaan raja-arvoja eri ryhmille. Mitä alttiimpia tuotteet ovat pilaantumiselle sitä tiukemmat pitäisi rajojen olla. Hygienia-avalvonnan pääpaino pitää tietenkin olla elintarvikekosketuspinoilla. Ympäristöpinnat voivat kuitenkin olla osana tartuntareiteistä esimerkiksi ristikontaminaation kautta. Ympäristöpinoilta esimerkiksi lattioilta, seiniltä, ovilta ja hyllyiltä löytyvät mikrobit voivat siten vaikuttaa tuotteiden laatuun erityisesti niissä tuotteissa, mitkä on tuotettu avoimissa tai puoliavoimissa prosesseissa. Mikrobien kulkeminen ympäristön pinnoilta elintarvikekosketuspintoihin voi tapahtua ilmavirtauksien mukana tai henkilöiden liikkeillä. On huomioitava, että ympäristöpintojen hygienia voi vaikuttaa tuotteisiin, jotka valmistetaan suljetuissa prosesseissa esimerkiksi maitosäiliöissä saastuneen korvausilman kautta.

Taulukko 1. Menetelmiä prosessihygieniatestauksiin esim. biofilmin määrittämiseksi pinnoilta

Menetelmä	Sovellus kommentteineen
Kontaktimalja ja/tai -teippi (viljely)	Käytetty hygieniatestauksissa Edut: tunnistaminen, selektiiviset kasvualustat, helppokäyttöinen Rajoitus: herkkyys, aikaa vievää
Tupotus ja/tai sideharsopyyhintä (viljely)	Käytetty hygieniatestauksissa Edut: tunnistaminen, selektiiviset kasvualustat Rajoitus: herkkyys, aikaa vievää
Impedanssi	Käytetty hygieniatestauksissa, hyödyllinen myös laboratoriotestauksissa Edut: nopeampi kuin viljely, selektiiviset kasvualustat Rajoitus: herkkyys
ATP-kitit	Käytetty hygieniatestauksissa, suuret hajonnat analysoitaessa monikerroksisia biofilmejä, sillä solukerrostien solut ovat eri metabolisessa tilassa Edut: on-site ATP-pohjaiset biofilmmittarit Rajoitus: herkkyys
Proteiinikitit	Käytetty hygieniatestauksissa Edut: nopea, helppokäyttöinen Rajoitus: vain proteiiniliat

Uusi trendejä biofilmivalvonnassa

Henkilöstön koulutusta tarvitaan elintarviketurvallisuuden ja -hygienian ylläpitoon elintarviketuotannossa. Tärkeätä tuotannossa on että riskinarvioinnissa hyödynnetään kvantitatiivisia ja järjestelmällisiä menettelyjä enemmän ja että ne perustuvat alan tieteeseen. Mikrobiologian ja kemian merkitys tuotantohygieniassa on aina ollut suuri, mutta tulee ajan mukaan muuttumaan entistä tärkeimmäksi, koska tulevaisuudessa elintarvikkeiden, rehujen ja pakkausmateriaalien yms. puhtaus valmistuksessa korostuu mm. siitä syystä että tiedostetaan eri asiakasryhmien tarpeet huolellisemmin kuin ennen. Prosessilinjojen ja niiden siivousjärjestelmien hygieenistä suunnittelua on parannettava käyttämällä esimerkiksi 3D-tulostukseen, ultraääneen, kuivajähän, otsonointiin ja UVC-säteilytykseen perustuvia tekniikoita. Elintarviketuotannossa ja käsihygieniassa käytettävien desinfiointiaineiden tehokkuuksia voidaan parantaa käyttämällä uusia yhdisteitä mm. eteerisiä öljyjä. Kaupallisten tuotteiden on oltava biosididirektiivin mukaisesti hyväksytyjä.

Kirjallisuus

- Aarnisalo K. Equipment hygiene and risk assessment measures as tools in the prevention of *Listeria monocytogenes* – contamination in food processes. VTT Publ. 669 [väitöskirja]. Espoo: VTT teknillinen tutkimuskeskus; 2007.
- Bryers J, toim. Biofilms II: Process analysis and applications. New York: John Wiley-Liss Inc; 2000.
- Characklis WG. Fouling biofilm development: a process analysis, *Biotechnol. Bioeng.* 1981; 23:1923-60.
- Characklis WG, Trulear MG, Bryers JD, Zilver N. Dynamics of biofilm processes. *Water Res.* 1982; 16:1207-16.
- Costerton JW, Marrie TJ, Cheng K-J. Phenomena of bacterial adhesion. Kirjassa: Savage DC, Fletcher M. toim. Bacterial adhesion. New York: Plenum Press; 1985, 3-43.
- Eur-Lex [kotisivu internetissä]. Bryssel, Belgia: European Union. [luettu heinäkuussa 2015]. <http://eur-lex.europa.eu/>.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J.* 2015; 13(1):3991.
- Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Meth. Enzymol.* 1999; 310: 523–534.
- Juvonen R, Nohynek L, Storgårds E, Wirtanen G, Honkapää K, Lyijynen T, Mokka M, Haikara A. Hiivakontaminaa tioiden hallinta elintarviketeollisuudessa. VTT Research Notes T2107. Espoo: VTT Biotekniikka; 2001.
- Lelieveld HLM, Holah J, Napper D, toim. Hygiene in food processing, Principles and practices. 2. painos. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2014.
- Lindsay D. Ecophysiology, biofilm formation and sanitizer susceptibility of food spoilage bacteria with emphasis on selected *Bacillus* species [väitöskirja]. Johannesburg: University of the Witwatersrand; 2001.
- Mattila-Sandholm T, Wirtanen G. Biofilm formation in the industry – a review. *Food Rev. Int.* 1992; 8:573-603.
- Miettinen H. *Listeria monocytogenes* in fish farming and processing [väitöskirja]. Helsinki: Helsingin yliopisto; 2006.
- Salo S. Evaluating hygiene and cleaning efficiency of food process surfaces based on experimental data and modelling [väitöskirja]. Kgs. Lyngby: BioCentrum-DTU & Espoo: VTT teknillinen tutkimuskeskus; 2006.
- Wirtanen G, Raulio M, Salo S. Management of biofilm risk. Kirjassa: Motarjemi Y, toim. Encyclopedia of food safety, vol. 4: Food safety management. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2014, 240-243.
- Wirtanen G, Salo S. Biofilms risks. Kirjassa: Lelieveld H, Holah J, Gabrić D, toim. Handbook of hygiene in the food industry. 2. painos. Amsterdam: Elsevier Science. Hyväksytty julkaistavaksi 2015.
- Wirtanen G, Salo S. Cleaning and disinfection. Kirjassa: Ninios T, Lundén J, Korkeala H, Fredriksson-Ahomaa M, toim. Meat inspection and control in the slaughterhouse. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2014, 453-471.
- Wirtanen G, Salo S. DairyNET – Hygiene control in Nordic dairies, VTT Publ. 545, Espoo: Otamedia Oy; 2004.
- Wirtanen G, Salo S. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2003; 2:293-306.
- Surface Microbiology – Biofilm Formation and its Elimination, Sampling on Surfaces, Analysis and Interpretation of Results