



Universitetet  
i Stavanger

DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

## MASTEROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering:  Biologisk kjemi - masterstudium i biologisk kjemi	Vårsemesteret, 2010  Åpen
Forfatter: Øystein Olsen	..... (signatur forfatter)
Fagansvarlig: Jan Thomas Rosnes  Veileder(e): Jan Thomas Rosnes, Torstein Skåra og Dagbjørn Skipnes	
Tittel på masteroppgaven:  Isoterm varmebehandling <i>Listeria innocua</i> i kappilærrør Engelsk tittel: Isothermal heat treatment of <i>Listeria innocua</i> in capillary tubes	
Studiepoeng: 60	
Emneord:  Varmedrap, pasteurisering, varmebehandling	Sidetall: ...55 + vedlegg/annet: .....  Stavanger, <u>2. juni 2010</u> dato/år

## Sammendrag

---

Utgangspunktet for denne masteroppgaven var å skaffe kunnskap om *Listeria monocytogenes*-surrogaten *Listeria innocua*, og dens varmeinaktiveringskinetikk med hensyn på kvalitet og matsikkerhet i pasteuriserte fiskeprodukter. *L. monocytogenes* kan forårsake listeriose, en sykdom som har høy dødelighet. *L. monocytogenes* kan vokse ved kjøletemperaturer og ved høye saltkonsentrasjoner, det er derfor viktig at man har kontrollen på denne bakterien før et matprodukt slippes ut i markedet. *L. monocytogenes* inaktiveres ved vanlig pasteurisering som er 70 °C i 2 minutter. Denne behandlingen er også minstekravet for produkter som skal ha holdbarhet i opp til 10 dager.

Bruken av *L. innocua* som surrogat for *L. monocytogenes* er akseptert, og blitt dokumentert i ulike studier (Fairchild and Foegeding 1993; Friedly *et al.* 2008b). Det ble i denne oppgaven benyttet to stammer av *L. innocua*, en fra Culture Collection, University of Gothenburg (CCUG 35613), og en fra American Type Culture Collection (ATCC 33090). Bakteriene ble dyrket og varmebehandlet i ”tryptic soy broth med gjærekstrakt” (TSBYE), og deretter regenerert på ”tryptic soy agar med gjærekstrakt” (TSAYE). D- og z-verdier er verdier brukt for å beskrive varmeresistensen til en mikroorganisme. D-verdien forteller hvor lang tid det tar å inaktivere 90 % av bakteriene i ved en gitt temperatur. En z-verdi forteller hvor stor temperaturøkning som skal til for å inaktivere 90 % av bakteriene. Beregningene av varmeresistensen tok utgangspunkt i lineær førsteordens kinetikk. D-verdiene ble beregnet for temperaturer i intervallet 57-63 °C. På grunnlag av D-verdiene ble z-verdiene beregnet. For *L. innocua* CCUG 35613 var  $D_{60} = 2,29 \pm 0,05$  minutter og  $z = 5,15 \pm 0,12$  °C, og for *L. innocua* ATCC 33090  $D_{60} = 2,40 \pm 0,04$  minutter og  $z = 4,71 \pm 0,08$  °C. Det var liten signifikant forskjell i D- og z-verdier mellom stammene.  $D_{60}^{\circ C}$  verdiene så ut til å være like de funnet i andre publikasjoner, z-verdiene var lavere. Begge stammene i oppgaven ville med gjeldene betingelser blitt inaktivert i en pasteuriseringsprosess på 70 °C i 2 minutter. Dog må man forvente at varmeresistensen ville vært høyere i en matmatriks.

## Forord

---

Som en del av masterstudiet i biologisk kjemi ved Universitet i Stavanger har jeg utført denne 60 studiepoengs masteroppgaven høsten 2009 og våren 2010. Oppgaven ble utført hos Nofima Norconserv i Måltides Hus. Det har vært svært lærerikt og inspirerende å jobbe med så mange kunnskapsrike personer som det er på Nofima Norconerv.

Vil rette en stor takk til mine veiledere Jan Thomas Rosnes og Torstein Skåra for god hjelp og støtte i forbindelse med laboratoriearbeid og skriving. I tillegg vil jeg takke Dagbjørn Skipnes for hjelp i forbindelse med resultatmessig diskusjon. Til slutt vil jeg takke resten av staben ved Nofima Norconserv, labgjengen hos Tine Norske Meierier FOU og medstudent Biljana Cavnich Sivertsen for godt samarbeid og sosialt samvær J

Stavanger, juni 2010

Øystein Olsen

## Innhold

---

Sammendrag.....	0
Forord .....	2
Figurliste .....	5
Tabelliste.....	6
1.0 Innledning/Bakgrunn .....	7
2.0 Teori.....	11
2.1 Slekten <i>Listeria</i> .....	11
2.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
2.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> i mat .....	12
2.1.3 Listeriose.....	13
2.2 <i>Listeria innocua</i> .....	14
2.2.1 <i>Listeria innocua</i> som surrogat for <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
2.3 Faktorer som påvirker varmeresistensen på <i>Listeria</i> .....	17
2.3.1 Veksttemperatur .....	17
2.3.2 Medier.....	18
2.3.2.1 Vekstmedium (før varmebehandling) .....	18
2.3.2.2 Varmebehandlingsmedium.....	19
2.3.2.3 Regenereringsmedium.....	19
2.3.3 Vannaktivitet.....	20
2.3.4 pH.....	20
2.4 Isoterm varmebehandling og ”come-up” tid.....	20
2.5 Beregning av varmeresistens .....	22
2.5.1 Statistikk .....	24
2.5.2 Avvik fra 1.ordenskinetikk .....	24
3.0 Materialer og metoder.....	26

3.1	Test organisme .....	26
3.1.1	Frysing av kulturer i Microbank .....	26
3.1.2	Dyrking av bakterier.....	27
3.1.3	Vekstforsøk med bioscreen.....	27
3.2	Varmebehandling .....	28
3.2.1	Temperaturmåling i vannbad .....	28
3.2.2	Varmebehandling i kapillærrør .....	29
3.3	Beregning av resultater .....	31
3.3.1	Fortynninger i dypbrønnsbrett .....	32
3.3.2	Regenerering etter varmebehandling.....	33
3.3.3	Telling.....	35
4.0	Resultater.....	36
4.1	Temperaturmåling av vannbad.....	36
4.2	Vekstforsøk.....	38
4.3	Varmedrapsforsøk .....	39
4.4	Videre arbeid.....	47
5.0	Konklusjon .....	48
6.0	Referanser.....	49
7.0	Appendiks.....	54
7.1	Medier.....	54
7.2	EDDY JET Utplatingvolumer .....	55
7.3	Annet utstyr.....	55

## Figurliste

---

Figur 1.1. Flytskjema over det eksperimentelle oppsettet. ....	10
Figur 2.1. Fylogenetisk tre av <i>Listeria</i> . ....	14
Figur 2.2. Viser en isoterm varmebehandling med "come-up" tid (1) og nedkjølingstid (2). ...	21
Figur 2.3. Viser en ikke-isoterm varmebehandling. ....	21
Figur 2.4. D-verdi. Figuren viser prinsippet med D-verdi. ....	23
Figur 2.5. Z-verdi. Figuren viser prinsippet bak z-verdien. I dette tilfellet er z-verdien 5 °C. ...	24
Figur 2.6. Viser logaritmen overlevende <i>L. monocytogenes</i> plottet mot tid, og regresjonen er tilpasset den lineære modellen (A) og Weibullmodellen (B) . ....	25
Figur 3.1. Microbank-ring i TSBYE. ....	27
Figur 3.2. Oversikt over sensorplassering. ....	28
Figur 3.3. 1. Bilde viser hvordan kapillærrøret ble fylt med en bakteriesuspensjon ved hjelp av en steril sprøyte/kanyle. 2. Viser hvordan enden på røret forsegles ved hjelp av en gassbrenner. 3. Rørene stilles i en loddrett posisjon for å bekrefte at de er lufttette. ....	29
Figur 3.4. Kapillærrør stativet. Kapillærrør holderne (1) festes til magnetskinnene (2). ....	30
Figur 3.5. 1. Varmebehandling i vannbad. 2. Kjøling på is. 3. Lufttørking. 4. Filing av endene. ....	30
Figur 3.6. En VWR fortynningsbrønn med 96 brønner à 1,2 ml. ....	32
Figur 3.7. Utplatingsmaskinen EDDY JET. ....	33
Figur 3.8. Viser utplatede bakterier utført med EDDY JET. ....	34
Figur 3.9. Telleplate for EDDY JET spreder, og koloniteller. Koloniteller i høyre hjørne. ....	35
Figur 4.1. Skjematisk fremstilling av kapillærrørstativet i Grant-vannbadet. ....	37
Figur 4.2. Figuren viser A600 av bakterievekst som funksjon av tid ved 37 °C. ....	38
Figur 4.3. Overlevende (CFU/ml) <i>L. innocua</i> CCUG 35613 ved 60 °C plottet mot tid. ....	40
Figur 4.4. Overlevende <i>L. innocua</i> CCUG 35613 ved ulike varmebehandlingstemperaturer som funksjon av tid. ....	41
Figur 4.5. Overlevende <i>L. innocua</i> ATCC 33090 ved ulike varmebehandlingstemperaturer som funksjon av tid. ....	42
Figur 4.6. Log D-verdi for <i>L. innocua</i> CCUG 35613 som funksjon av temperatur (°C). ....	44
Figur 4.7. Log D-verdi for <i>L. innocua</i> ATCC 33090 som funksjon av temperatur (°C). ....	44

## Tabelliste

---

Tabell 2.1. Listeriose meldt MSIS 2003 - 2009 etter smittested. Totalt smittede på landsbasis .....	14
Tabell 2.2. Viser en oversikt over varmebehandlingsforsøk utført med ulike stammer av <i>L. innocua</i> . I kolonnene for vekstmedium og veksttemperatur vises vekstforholdene under oppformeringen og regenerering .....	16
Tabell 2.3. Viser en litteraturoversikt over varmebehandlingsforsøk utført med ulike stammer av <i>L. innocua</i> i matsystemer. ....	17
Tabell 4.1. Gjennomsnittstemperatur fra 15 minutters tidsintervall, samt minimums- og maksimumstemperaturen og differansen mellom høyeste og laveste målte temperatur. ....	36
Tabell 4.2. Tabell over hvor lang tid det tok før <i>L. innocua</i> stammene nådde tidlig stasjonærfase .....	38
Tabell 4.3. D-verdier (min) og regresjonskoeffisient for <i>L. innocua</i> CCUG 35613 .....	43
Tabell 4.4. D-verdier (min) og regresjonskoeffisient for <i>L. innocua</i> ATCC 33090 .....	43
Tabell 4.5. De samlede resultater med $D_{60\text{ }^{\circ}\text{C}}$ , $z$ og $R^2$ verdier for <i>L. innocua</i> ATCC 33090 <i>L. innocua</i> CCUG 35613 .....	46
Tabell 7.1 Avsatt volum for EDDYJET i de ulike segmentene.....	55

## 1.0 Innledning/Bakgrunn

---

### Bakgrunn

Denne oppgaven er en del av prosjektet ProSpect. ProSpect er et prosjekt i samarbeid mellom Nofima Norconserv og Nofima Marin. I dette prosjektet er det ønskelig å se på hvordan man kan oppnå sikre, minimalt prosesserte fiskeprodukter ved bruk av overflatepasteurisering. Elementer fra aseptisk pakking skal i prosjektet bli brukt under pakking av ikke-sterile produkter. Aseptisk pakking innebærer at pakking skjer under sterile betingelser. *Listeria monocytogenes* blir i prosjektet brukt som en målorganisme for å se på effekten av pasteuriseringen. Målet er å kunne lage nye produkter som er varmebehandlede med overflatepasteurisering, og som har lang holdbarhet og er tiltrekkelig sikre.

### Innledning

I dagens moderne samfunn ønsker forbrukeren mat som er lett å tilberede, og i økende utstrekning velger forbrukerne å kjøpe ferdigretter. Trenden kan ses igjen på omsetningen til en av de største ferdigmatprodusentene i Norge, Fjordland AS. I år 2000 hadde Fjordland en omsetning på 375 millioner norske kroner, mens de i 2008 hadde en omsetning på 1020 millioner norske kroner.

Ved for sterk varmebehandling av sjømat kan det bli et problem at produktet mister optimal smak og tekstur. Fisk er, som annet kjøtt, steril i muskelen og en kontaminering vil skje på overflaten av fiskemuskelen. Ved bruk av overflatepasteurisering vil man kunne oppnå et sikkert og holdbart produkt uten stort tap av smak og tekstur. En overflatepasteurisering har som utgangspunkt å bare varmebehandle overflatene, og kan utføres ved hjelp av damp.

Varmebehandling blir brukt for å gjøre mat spiselig, og for å sikre stabile og trygge produkter. Det er to hovedtyper varmebehandling varmebehandling, den ene er pasteurisering og den andre er sterilisering. Pasteurisering er en mild varmebehandling hvor hensikten er å innaktivere enzymer og vegetative celler samt enkelte viktige patogene bakterier. Dette er med på å gi et sikkert produkt med god sensorisk kvalitet. Det europeiske forbundet for kjølt mat (ECFF- European Chilled Food Federation) har definert retningslinjer for produkter med lang holdbarhet og for kort holdbarhet. Disse retningslinjene er satt på grunnlag av mange studier. Kort holdbarhet defineres som produkter som har en beregnet holdbarhet på mindre



enn 10 dager. Denne holdbarheten oppnås ved å varmebehandle i 2 minutter ved 70 °C. En slik varmebehandling er ment for produkter som skal være uten vegetative bakterier som *L. monocytogenes*, og med kontroll av *Clostridium botulinum*. Siden *Clostridium botulinum* overlever og det er derfor viktig at produktet holdes kjølt i holdbarhetsperioden. Melk er kanskje det mest kjente pasteuriserte produktet som er pasteurisert for å ha en holdbarhet på mindre enn 10 dager. En vanlig melkepasteurisering er gitt til å være 15 sekunder ved 72 °C eller 2 minutter ved 70 °C (FAIR programme- European Commission 1997).

For produkter som skal ha en holdbarhet på lengre enn 10 dager trengs det 6D innaktivering av *Clostridium botulinum*, hvis det ikke er andre hindre som hemmer mot vekst. Produktet må lagres ved kjøletemperatur, og i tillegg ha en eller flere av følgende faktorer oppfylt (FAIR programme- European Commission 1997):

- Varmebehandling ved 90 °C i 10 minutter (eller tilsvarende)
- Konservering: minimum salt innhold på 3,5 %, vannaktivitet ( $a_w$ ) <0,97, eller pH 5.

Hvis mildere behandlinger blir gitt må det dokumenteres at dette er holdbart og gir helsemessig sikkert. For sikkerhets og oppbevaringsegenskaper må pasteuriseringen avsluttes med pakking som hindrer rekontaminering. Pasteurisering blir benyttet på en rekke næringsmidler, for eksempel juice, øl, krabbekjøtt og melk. Historisk sett har pasteurisering blitt anvendt for å inaktivere *Mycobacterium tuberculosis* (tuberkulose) og *Coxiella burnetii* (Q-feber). Denne pasteuriseringen vil ikke gjøre matproduktet fritt for patogene sporedannere som *Bacillus cereus*, men vegetative bakterier som *Salmonella* og *L. monocytogenes* vil inaktiveres.

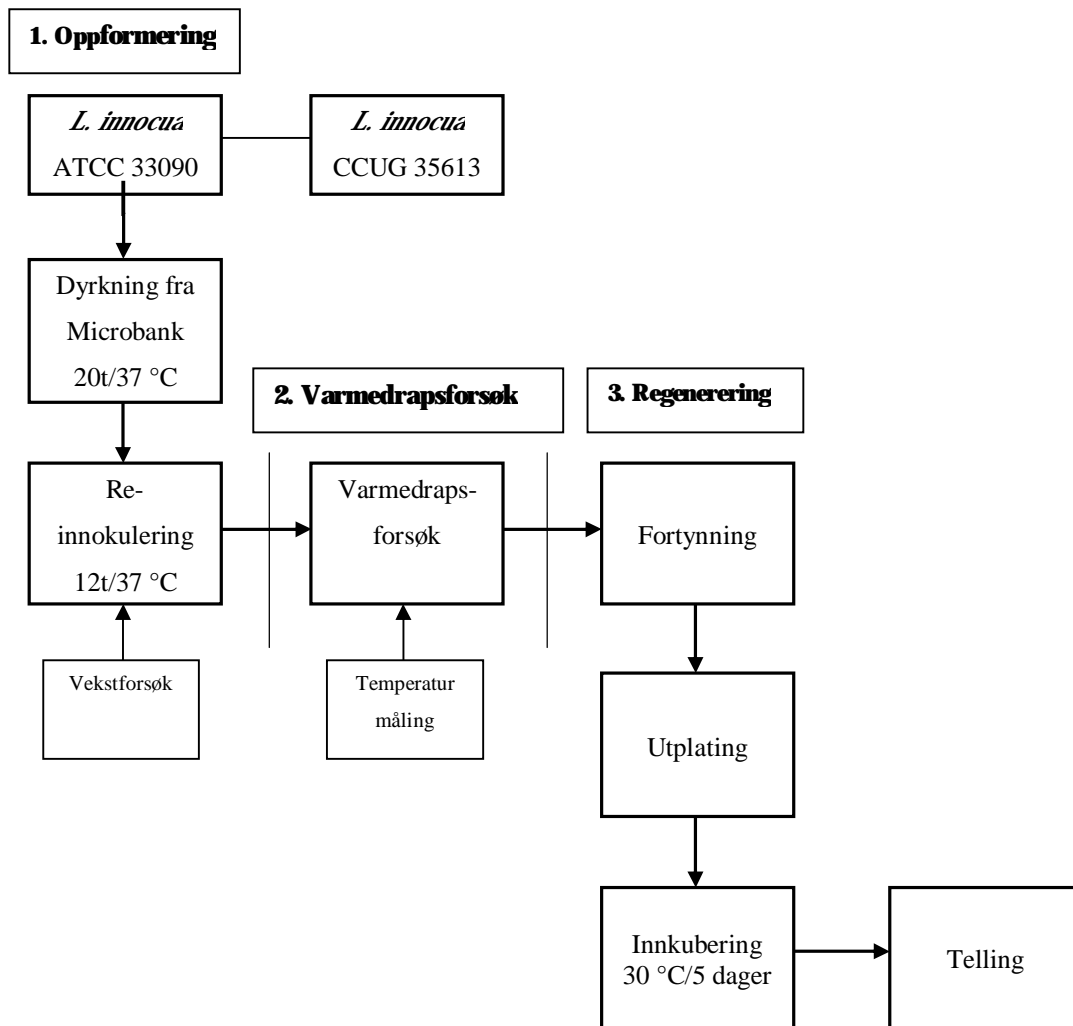
*L. monocytogenes* er en patogen bakterie som kan resultere i listeriose. Listeriose kan gi hjernehinnebetennelse, og merkes med influensalignende symptomer. Særlig gravide er utsatt, da listeriose kan føre til abort. Innenfor EU i 2008 ble det meldt om en dødlighet på 20,5 % av de listeriosesmittede (EFSA -European Food Safety Authority 2010). *L. monocytogenes* kan vokse ved mange av betingelsene som finnes i matvarer, også når matvarene er delvis konserverte. For eksempel kan *Listeria* vokse ved kjøletemperatur og i saltkonsentrasjoner opp til 10 %.

*L. monocytogenes* er en svært viktig bakterie å ha kontroll på i matvarer. I denne masteroppgaven har det blitt sett nærmere *L. innocua*, en *Listeria* som er svært lik *L.*

*monocytogenes*. *L. innocua* har veldig like vekstbetingelser som *L. monocytogenes*, og den har også lik varmeresistens. En forskjell er at *L. monocytogenes* er patogen, mens *L. innocua* er ikke-patogen. Disse faktorene spilte en viktig rolle for at *L. innocua* ble valgt som surrogat for *L. monocytogenes*. Det har blitt gjort flere forsøk som viser at *L. innocua* kan brukes som surrogat for *L. monocytogenes* for innaktiveringsstudier (Fairchild and Foegeding 1993; Friedly *et al.* 2008). Det er også gjort en rekke forsøk der *L. innocua* er studert i laboratoriesystemer og matsystemer (Ahn and Balasubramaniam 2007; Lorentzen *et al.* 2010; Miller *et al.* 2006; Miller *et al.* 2009).

Utgangspunktet for denne masteroppgaven var å skaffe kunnskaper om *L. monocytogenes* surrogaten, *L. innocua*, og dens varmeinnaktiverings kinetikk med relevans til matsikkerhet i fiskeprodukter. Det ble det benyttet to stammer *L. innocua*, en fra Culture Collection, University of Göteborg (CCUG 35613), og en fra American Type Culture Collection (ATCC ATCC 33090). I denne oppgaven ble bakteriene dyrket og varmebehandlet i ”tryptic soy broth med gjærekstrakt” (TSBYE), og deretter regenerert på ”tryptic soy agar med gjærekstrakt” (TSAYE). D-verdiene ble beregnet for hver hele temperatur i intervallet 57-63 °C, og deretter ble z-verdien beregnet på grunnlag av D-verdiene. I forsøkene ble det brukt bakterier som hadde nådd tidlig stasjonærfase fordi det er da de tåler mest. Det ble kjørt vekstforsøk med bioscreen for å finne ut når tidlig stasjonærfase ble nådd, slik at bakteriene ble innkubert i korrekt tid. For at målingene skulle bli så korrekte som mulig, er det viktig at temperaturfordelingen holder seg jevn og stabil i vannbadet. Ved bruk av temperatursensorer ble temperaturfordelingen i vannbadene målt og loggført.

Figur 1.1 viser oppsettet over forsøkene. Oppformering av bakteriene, 2. Varmedrapsforsøk, 3. Regenerering av bakteriene



Figur 1.1. Flytskjema over det eksperimentelle oppsettet.

## 2.0 Teori

---

### 2.1 Slekten *Listeria*

*Listeria* slekten omfatter *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae* og *L. marthii*. Bakteriene er Gram positive, ikke-sporedannende, bevegelige, fakultativ anaerobe staver. Den er bevegelig med flaggeller. *Listeria* er mest bevegelig ved veksttemperaturer mellom 20 °C og 25 °C, bevegeligheten avtar ved høyere og lavere temperaturer. *L. innocua* har høyere bevegelighet enn *L. monocytogenes* ved høye temperaturer (25-30 °C) (Faber and Peterkin 2000)

*Listeria* er psykrotrofe organismer som kan vokse i temperaturer under 0 grader. De vokser også i sure miljøer, og ved høye saltkonsentrasjoner. Dette er en bekymringsfaktor for produsenter av ferskvareprodukter med forlenget hylletid. *Listeria* har et vidt habitat, og *Listeria monocytogenes* har blitt funnet i for eksempel vann, silofôr, kloakksystemer, slakteravfall, jord, og avføring fra mennesker og dyr.

Enkelte av artene er humanpatogene. *L. ivanovii*-zoonoser er først og fremst på småfe, men det er også rapportert humane tilfeller. *L. monocytogenes* er patogen for både mennesker og dyr.

#### 2.1.1 *Listeria monocytogenes*

De første som beskrev *L. monocytogenes* var (Murray *et al.* 1926) da ble den kalt *Bacterium monocytogenes* fordi den forårsaket "mononuclear leucosytosis" (forhøyning av antall hvite blodlegemer) i kaniner. Noen år senere isolerte (Pirie 1940) en bakterie fra en ørkenrotte i Sør Afrika. Bakterien ble kalt *Listerella hepatolytica* etter kirurgen Joseph Lister.

*L. monocytogenes* kan vokse i temperaturområdet -0,4 °C (S.J.Walker *et al.* 1990) til 45 °C. Den gjennomsnittlige generasjonstiden for 39 forskjellige *L. monocytogenes* stammer var ved 4 °C 43 timer med en lagfase på 151 timer, ved 10 °C grader var den 6,6 timer med en lagfase på 48 timer, og ved 37 °C var generasjonstiden 1,1 timer med en lagfase på 7,3 timer (Barbosa *et al.* 1994).

Europeiske kommisjoner kom i 2005 med retningslinjer som definerer vekstgrenser for *L. monocytogenes* med hensyn på pH og vannaktivitet. Disse viser at *L. monocytogenes* ikke vokser ved pH 4,4 eller  $a_w$  0,92. Ved en kombinasjon av pH og vannaktivitet er grensene for vekst ved pH 5 og vannaktivitet på 0,94 (European Commission 2005). De lave vannaktivitets tallene viser at *Listeria monocytogenes* kan vokse i svært salte miljøer. Ved 10-12 % natriumklorid vokser den sakte, ved moderate saltkonsentrasjoner på 6,5 % vokser den til store populasjoner. Overlevelsesgraden i høye saltkonsentrasjoner øker ved å senke temperaturen.

### **2.1.2 *Listeria monocytogenes* i mat**

Mat hvor det kan finnes *L. monocytogenes* blir av (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food 2009) nevnt å være:

- Mat som ikke har gjennomgått en prosess hvor *L. monocytogenes* drepes.
- Mat som blir utsatt for kontaminering etter prosessering. For eksempel kutteoperasjoner.
- Produkter med lite eller ingen konserveringsfaktorer, som har nøytral pH og lav saltkonsentrasjon.
- Kjølevarer med lang holdbarhet.
- Mat som konsumeres som et spiseklart måltid (Ready to eat, RTE)

Eksempler på slike produkter er mykost (eks camembert, brie), melk, patér, pølser, kokt kjøtt, røkt fisk, skalldyr, og grønnsaker og frukt som har blitt kuttet. Matvarer som det ikke kan vokse *L. monocytogenes* i er definert gjennom lav pH og  $a_w$ , som beskrives i 2.1.1

Mattilsynet innførte i 2008 nye grenseverdier som er harmonisert med den europeiske forskriften for *L. monocytogenes* i mat som gir vekstbetingelser for *L. monocytogenes* (European Commission 2005). Før 2008 var det i hovedsak nulltoleranse for *L. monocytogenes* i mat som var kjølt og vakuumpakket med holdbarhet opp til 15 dager. Etter 2008 ble det satt en grense på 100 CFU/g i slutten av produktets holdbarhetstid. For babytmat og mat benyttet til medisinske formål skal det fortsatt ikke forekomme *L. monocytogenes*. For spesielle produkter, som for eksempel rakfisk, er det gjort unntak. Her er grensen på 1000 CFU/g, men da må det være en advarsel med produktet som fraråder konsum av risikogrupper.

Risikogrupperne for listeriose er barn med ikke fullt utviklet immunforsvar, eldre mennesker, personer med nedsatt immunforsvar og gravide. Hos gravide er det særlig fosteret som er utsatt, og derfor frarådes det gravide å spise produkter som kan inneholde *Listeria*. Dette gjelder særlig upasteuriserte meieriprodukter og paté, men også rakfisk og enkelte ganger røykte fiskeprodukter.

### **2.1.3 Listeriose**

Vanligvis asymptomatisk eller influensaliknende sykdomsbilde, men hos fostre, nyfødte, eldre og personer med nedsatt immunforsvar kan infisering forårsake alvorlig sykdom. Vanligste manifestasjon er hjernehinnebetennelse (meningitt) og blodforgiftning, diaré er svært sjelden. Gravide kan smitte sitt barn uten selv å bli syk. Infeksjon via livmoren kan føre til fosterdød. Dersom smitte av listeriose har skjedd i livmorene, kan dette føre til at barnet fødes for tidlig med nedsatt allmenntilstand og symptomer på multiorganssvikt. Denne smitten har høy letalitet. Dersom smitten har skjedd i fødselskanalen eller ved sykehusmitte kommer symptomene etter tre eller flere dager i form av hjernehinnebetennelse.

Den vanligste smitemåten (80-90 %) for listeriose er overføring fra kontaminte matvarer. Utsatte risikoprodukter blir hovedsakelig kontaminert under produksjonen. Fostere og nyfødte smittes via morkaken (transplacentært) eller i fødselskanalen. Mennesker kan også smittes direkte fra infiserte dyr (aerosolmitte) (Folkehelseinstituttet 2010b).

En minste sykdomsfremkallende smittedose er ikke blitt fastsatt i infeksjonsstudier på mennesket. Grensen på 100 CFU/g er satt å på grunnlag av tidligere utbrudddata som indikerte at risikoen for utbrudd av listeriose var minimal når smittedosen var under 100 cfu/g (European Commission 2005; European Commission - Health & consumer protection directorate 1999). Inkubasjonstiden kan variere fra 11 til 70 dager, med en median på 21 dager (Jemmi and Stephan 2006).

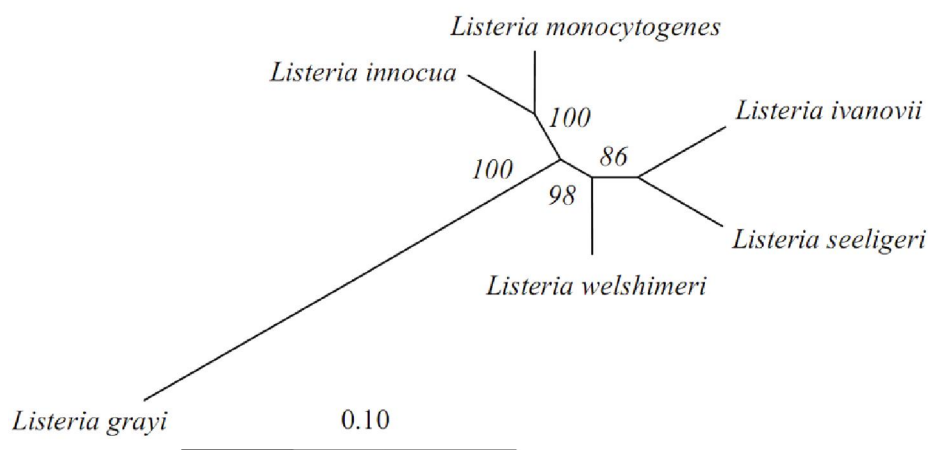
De fleste tilfeller av menneskelig listeriose er sporadiske, men i noen tilfeller har disse sporadiske tilfellene opphav i samme kilde. Forekomsten av menneskelig listeriose på verdensbasis er underestimert ettersom de fleste data baserer seg på frivillig rapportering. Innen for EU er det et meldepliktig rapporteringssystem for listeriose, der alle tilfeller meldes inn til ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). I 2008 ble det i EU registrert 0,3 tilfeller av listeriose pr 100.000 innbygger (EFSA -European Food Safety Authority 2010).

Det er beskrevet 3 utbrudd i Norge: Trondheim i 1992 hvor 8 ble syke og smittekilden var varmebehandlet kjøttpålegg. Et utbrudd i Ålesund 2005, som skyldtes mykost (Folkehelseinstituttet 2010). I 2007 var det et landsomfattende utbrudd hvor det var 20 smittede hvor 14 var innlagte pasienter på et sykehus i Oslo. Utbruddet var forårsaket av camembertost, som ble behandlet i et saltkar kontaminert med *L. monocytogenes* (Mattilsynet 2007). Tabell 2.1 viser en liten stigning av listeriosetilfeller fra 2003 til 2009 (Folkehelseinstituttet 2010). Utbruddet i 2007 skiller seg ut ettersom ekstra mange ble smittet.

**Tabell 2.1. Listeriose meldt MSIS 2003 - 2009 etter smittested. Totalt smittede på landsbasis**

Smittested	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Norge	14	13	13	19	45	24	25
Utlandet	1	8	1	3	-	9	-
Ukjent	1	2	-	5	5	1	6
<b>Totalt</b>	<b>16</b>	<b>23</b>	<b>14</b>	<b>27</b>	<b>50</b>	<b>34</b>	<b>31</b>

## 2.2 *Listeria innocua*



**Figur 2.1 Fylogenetisk tre av *Listeria*** Treet er basert på sekvensering av 16S og 23S rRNA. Horisontal linje indikerer 10% variasjon i basesammensetningen i 16S og 23S rRNA. *L. rocourtia* og *L. marthii* er ikke med i det fylogenetiske treet da de ikke var funnet da figuren ble konstruert. Reproduert fra (Schmid *et al* 2005)

*L. innocua* er en av de åtte artene som hører til slekten *Listeria*. *L. innocua* er apatogen, dette kommer også fram av navnet, innocent, som betyr uskyldig/uskadelig. *L. innocua* og *L. monocytogenes* er de to *Listeria* artene som har flest fysiologiske og genetiske (Fig 2.1) likhetstrekk, og de ble ikke skilt som egne arter før i 1981 (Seeliger 1981). *L. innocua* og *L. monocytogenes* har også like nisjer, og lik toleranse for pH, temperatur og salt.

Apatogeniteten til *L. innocua* gjør at man slipper å ta de samme sikkerhetsmessige hensynene som man måtte tatt med *L. monocytogenes*, når man arbeider med bakterien i laboratoriet.

### **2.2.1 *Listeria innocua* som surrogat for *Listeria monocytogenes***

En biologisk indikator brukes for å bekrefte om varmebehandlingen er tilstrekkelig i et matsystem med kjente og ukjente faktorer. Et kjennetegn for en biologisk indikator er at den må ha termoresistens lik eller høyere enn målorganismen. Det er blitt gjort studier som viser at *L. innocua* har slike egenskaper.

(Friedly *et al.* 2008) studerte ulike *L. innocua* og *L. monocytogenes* stammer og sammenlignet disse for å bekrefte at *L. innocua* M1 var en ideell surrogat for varmebehandling av *L. monocytogenes*. D- og z-verdiene til *L. monocytogenes*, *L. innocua* M1, *L. innocua* SLCC 5639, *L. innocua* SLCC 5640 og *L. innocua* SLCC 2745 ble bestemt i rå hamburgere. Undersøkelsen viste at *L. innocua* M1 var den mest termotolerante av de testede *L. innocua* i hamburgere (Tab 2.3). *L. innocua* M1 og *L. innocua* SLCC 5640 var begge mer termotolerante enn *L. monocytogenes* og var egnet for å være surrogat for *L. monocytogenes*.

Fairchild og Foegeding (1993) gjorde en lignende undersøkelse. Der ble rifampin- og streptomycinresistente *L. innocua* M1 mutanter sammenlignet med *L. monocytogenes* F5069 i skummet melk.  $D_{68\text{ °C}}$ -verdien var for *L. innocua* M1 3,8 sekunder og z-verdien var 5,6 °C. For *L. monocytogenes* F5069 var  $D_{68}$ -verdien 4,9 sekunder, og z-verdien var 5,8 °C. *L. innocua* M1 var en egnet surrogat for *L. monocytogenes* F5069

Tabell 2.2 og 2.3 viser en oversikt over varmbehandlingsforsøk med *L. innocua*. Tabell 2.2 tar for seg forsøk utført med laboriemedier, og Tabell 2.3. viser forsøk utført i matmatriser



**Tabell 2.2. Viser en oversikt over varmebehandlingsforsøk utført med ulike stammer av *L. innocua* I kolonnene for vekstmedium og veksttemperatur vises vekstforholdene under oppformeringen og regenerering**

Stamme <i>L. innocua</i>	Vekstmedium	Varme- medium	Vekst- temperatur (°C)	Varme- behandling (°C)	D-verdi (min)	Z- verdi (°C)	Kilde
ATCC 33090	TSBYE/TSAYE	Pepton- vann	30/30	60	2,43	-	(Ahn and Balasubramani am 2007)
NCTC 10528	TSBYE/TSAYE	TSBYE	30/30	60	2,73	6,73	(Miller <i>et al.</i> 2006)
NCTC 10528	TSBYE/TSAYE +NaCl	TSBYE	30/30	60	1,08	5.10	(Miller <i>et al.</i> 2006)
NCTC 10528	TSBYE/Palcam	TSBYE	30/30	60	1,72	5.56	(Miller <i>et al.</i> 2006)
CECT 910	BHI <sup>a</sup> - buljong/BHI- agar	Sorensen -buffer	37/37	59	1.04	5,65	(Alvarez- Ordonez <i>et al.</i> 2009)
NCTC 10528	TSBYE/TSAYE	TSBYE	30//30	60	2,21	6,87	(Miller et al. 2009)
2030c	TSBYE/TSAYE	TSBYE	30//30	60	1,83	5,95	(Miller <i>et al.</i> 2009)
<i>ATCC</i> <i>33090</i>	TSBYE/TSAYE	Salin 0,75% NaCl	37/37	57	2,03	5,16	(Aguirre <i>et al.</i> 2009)

<sup>a</sup> Brain heart infusion

**Tabell 2.3** Viser en litteraturoversikt over varmebehandlingsforsøk utført med ulike stammer av *L. innocua* i matsystemer.

Stamme <i>L. innocua</i>	Matsystem	Dyrknings- medium	Varme- behandling (°C)	D-verdi (min)	Z- verdi (°C)	Kilde
M1	Rå hamburger	TSA YE	62,5	3,17	7,71	(Friedly <i>et al.</i> 2008)
SLCC 5640	Rå hamburger	TSA YE	62,5	2,68	7,60	(Friedly <i>et al.</i> 2008)
SLCC 2745	Rå hamburger	TSA YE	62,5	1,13	7,44	(Friedly <i>et al.</i> 2008)
M1	Steril melk	TPA <sup>a</sup>	61,8	38,4 sek	5,6	(Fairchild and Foegeding 1993)
M1	Steril melk	TSA+ <sup>bc</sup>	61,8	38,1 sek	5,6	(Fairchild and Foegeding 1993)
M1	Fersk melk	TSA+ <sup>a</sup>	61,8	49,5 sek	5,1	(Fairchild and Foegeding 1993)
<i>ATCC</i> <i>33090</i>	Steril helmelk	TSA YE	57	4,07	5,72	(Aguirre <i>et al.</i> 2009)

<sup>a</sup>TPA- Tryptisk fosfat agar.

<sup>b</sup>50 mg rifampin per liter og 250 mg streptomycin pr liter

<sup>c</sup> TSA- Tryptisk soya agar.

## 2.3 Faktorer som påvirker varmeresistensen på *Listeria*

Det er flere faktorer som påvirker varmeresistensen til bakterier. Inkuberingstemperatur og vekstmedier før og etter en varmebehandling er faktorer som har innvirkning på varmeresistensen. Sammensetningen av vekstmediet spiller en viktig rolle, og da har særlig pH, saltkonsentrasjon og vanninnhold stor innvirkning. Dette gjelder i både matmatriser og laboratoriemedier. I forbindelse med laboratoriemedier er det svært viktig å ha kontroll over de enkelte vekstfaktorer, slik at en vet hva som forårsaker varmeresistens.

### 2.3.1 Veksttemperatur

Optimal veksttemperatur for *L. innocua*, og *Listeria* generelt, ligger på mellom 30 og 37 °C.

Temperaturen i vekstfasen påvirker lipidbiosyntesen, sammensetningen av membraner, og proteinsyntesen. Dette er faktorer som påvirker varmeegenskapene til *L. monocytogenes* (Juneja *et al.* 1998). Flere studier på *L. monocytogenes* viser at cellene er mer varmeresistente

ved vekst før varmebehandling ved høye temperaturer (f.eks 35 °C) enn ved lave temperaturer (f.eks 20 °C) (Pagan *et al.* 1997;Smith *et al.* 1991;Smith and Marmer 1991)

*L. innocua* har høyere varmeresistens når de har vokst ved høye temperaturer enn ved lave temperaturer. I en studie ble det vist betydelig høyere D-verdier for celler dyrket 45 °C enn ved 20 °C, D-verdiene var opp til 5 ganger høyere ved 45 °C (Alvarez-Ordóñez *et al.* 2009). I samme studie ble det ikke funnet signifikant forskjell i z-verdien.

### **2.3.2 Medier**

Forskjellige medier blir benyttet i forbindelse med varmedrapsforsøk, f.eks. medium til i) oppformering av bakterier, ii) varmeoverføring eller iii) regenerering av skadede bakterier etter en varmebehandling. Det finnes både selektive og ikke-selektive medier, og varmeresistensen vil variere med valg av medium. Et selektivt medium er i denne sammenheng et vekstmedium som favoriserer vekst av *Listeria*, for eksempel medier tilsatt salt (5 %). Et ikke-selektivt medium er et medium hvor annen mikroflora har like vekstvilkår.

#### **2.3.2.1 Vekstmedium (før varmebehandling)**

Vekstmediet er mediet som blir benyttet for oppformering av bakterier i forkant av varmebehandling. I laboratoriesammenheng brukes ofte et væskemedium (buljong/broth), som inneholder nødvendige næringsstoffer til bakterien. Enkelte komponenter i mat eller kulturmedier kan beskytte bakteriene fra varmeskader ved å stabilisere membraner og andre celle komponenter, eller ved å stimulere for produksjon av stressproteiner. Det osmotiske miljøet kan spille en viktig rolle for varmeresistensen til *Listeria*. *L. monocytogenes* dyrket i 1,5 M NaCl fikk en forlenget form og en bedre varmeresistens sammenlignet med bakterier dyrket i 0,09 M NaCl (Jorgensen *et al.* 1995). I de fleste tilfeller er det vist at salt har en beskyttende effekt på *L. monocytogenes*, noe som resulterer i økt varmeresistens. Celler fra Scott A stammen som var dyrket i et fettriakt medium var 8 ganger mer varmeresistente ved 60 °C enn celler dyrket i tryptisk soya broth (TSB) (Casadei *et al.* 1998). *L. monocytogenes* fikk betydelig bedre varmeresistens når det var minimalt med næring i vekstmediet (Lou and Yousef 1996).

### **2.3.2.2 Varmebehandlingsmedium**

Et varmebehandlingsmedium er mediet som blir brukt under varmebehandlingen. Medier som blir brukt i laboratorieforsøk er for eksempel TSBYE, peptonvann destillert vann. I matsystemer vil varmebehandlingsmedium ha stor innvirkning på effekten av varmebehandlingen. Dette skyldes blant annet fettinnhold, vannaktivitet og pH, og teksturen, som alle har effekt for bakteriers overlevelse (Doyle *et al.* 2001).

Resultater fra ulike studier indikerer at *L. monocytogenes* er mer varmeresistent i mat, enn i laboratoriemedier (Boyle *et al.* 1990; Casadei *et al.* 1998; Foegeding and Stanley 1991; Jorgensen *et al.* 1999). For *L. monocytogenes* Scott A varierer D<sub>60</sub>-verdiene en del i matmatriser, flytende eggemasse 1,95 min (Muriana *et al.* 1996), krabbekjøtt 2,61 minutter (Harrison and Huang 1990), homogenisert gullerot 5,02 minutter og homogenisert biff (< 7 % fett) 8,32 minutter. (Gaze *et al.* 1989). For disse forsøkene ble bakteriene dyrket opp og deretter overført til matmatrixen. Det må tas i betraktning at betingelsene ikke var like under disse forsøkene.

### **2.3.2.3 Regenereringsmedium**

Ulike selektive og ikke-selektive medier har blitt brukt for regenerering. Mange av mediene ikke tilfredsstillende for restitusjon av varmeskadede celler. Selektive medier er laget å fremme vekst av en spesifikk bakterie. Dette går på bekostning av optimale vekstvilkår og det vil derfor gi negativ innvirkning på restitusjonen av varmeskadede bakterier (Patel and Beuchat 1995; Smith and Archer 1988). Regenereringsmediet var ugunstige for restitusjon av bakteriene når mediet inneholdt bestanddeler som gjorde mediet selektivt (phenyletanol, acriflavin, natrium tellurit, polymyxin B sulfat eller 5 % salt) (Smith and Archer 1988). Det er også funnet at ikke-selektive medier har høyere antall kolonier enn selektive medier etter varmebehandling (Crawford *et al.* 1989; Fain *et al.* 1991; Golden *et al.* 1988; Heddleson and Doores 1994; Linton *et al.* 1990; Linton *et al.* 1992; Rowan and Anderson 1998). For *L. innocua* ble det gjort en sammenligning mellom det ikke-selektive mediet tryptisk soya agar med 0,6 % gjærekstrakt (TSAYE), og de selektive mediene TSAYE med 5 % salt og Palcam. Resultatet var at det ikke-selektive mediet viste en høyere overlevelse enn de to selektive mediene, og blant de selektive mediene ga TSAYE med 5 % salt lavere overlevelse enn Palcam (Miller *et al.* 2006)

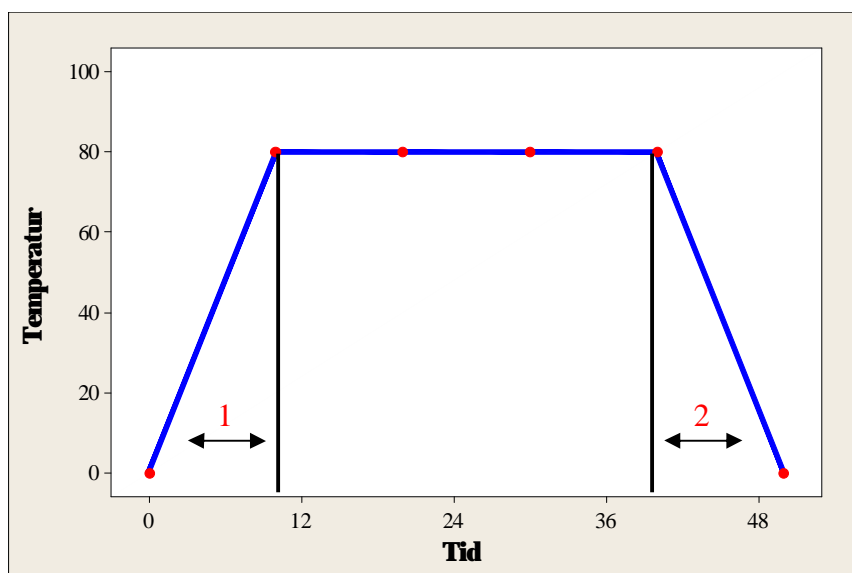
### 2.3.3 Vannaktivitet

Lavere vannaktivitet ( $a_w$ ) gir høyere varmeresistens i *L. monocytogenes*. Scott A stammen ble utsatt for ulike sukrosekonsentrasjoner. Ved en vannaktivitet på 0,98 ble de i et forsøk vist at man fikk en  $D_{65,6\text{ }^\circ\text{C}}$ -verdi på 0,36 og en z-verdi på 12,9 °C, når vannaktiviteten ble senket til 0,90 økte  $D_{65,6\text{ }^\circ\text{C}}$ -verdien til 3,8 og z-verdien økte til 12,9 °C (Sumner *et al.* 1991). I tillegg til at lavere vannaktivitet gir høyere varmeresistens, er det også vist at effekten vannaktiviteten har på varmeresistensen varierer med varmebehandlingstemperaturen (Fernández *et al.* 2007). I et medium med  $a_w$  0,90 var det mindre variasjon ved økning av varmebehandlingstemperaturer enn en tilsvarende økning av temperaturen i en varmebehandling av bakterier dyrket i medier med  $a_w$  0,93, 0,96 og 0,99.

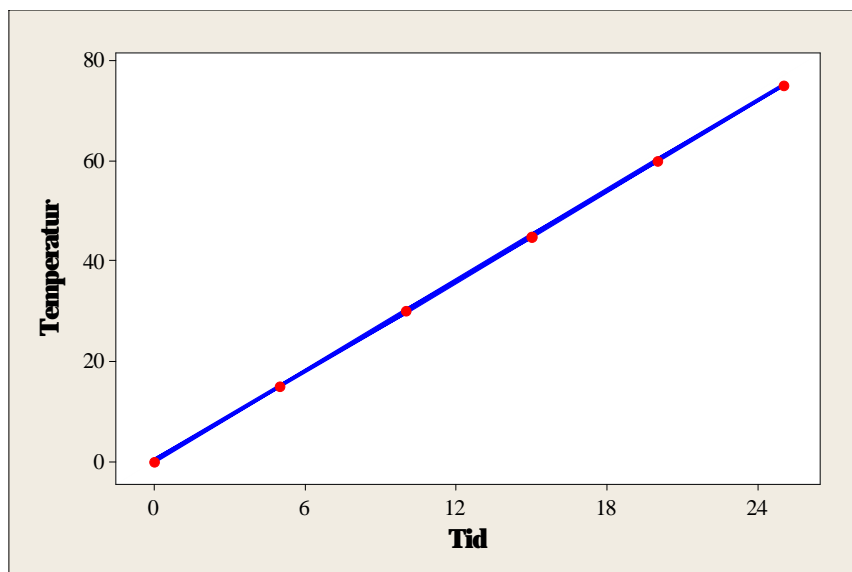
### 2.3.4 pH

Forsøk med forskjellig pH viser ingen klare trender for varmebehandling. Ved syresjokk, korte eksponering for pH 4, var det en liten økning av  $D_{58}$ -verdier hos *L. monocytogenes* (Farber and Pagotto 1992). Dog var *L. monocytogenes* mer varmesensitiv ved behandling i kåljuice, når man gikk fra pH 5,6 til pH 4,6 (Beuchat *et al.* 1986). Juneja og Elben (1999) fant ut at varmeresistensen ble redusert ved pH 4 sammenlignet med pH 8.

## 2.4 Isoterm varmebehandling og "come-up" tid



**Figur 2.2. Viser en isoterm varmebehandling med "come-up" tid (1) og nedkjølingtid (2).**



**Figur 2.3. Viser en ikke-isoterm varmebehandling**

Det kan skilles mellom to typer varmebehandling, isoterm (Fig 2.2) og ikke-isoterm (Fig 2.3). Ved en isotermisk varmebehandling holdes temperaturen konstant, og ved en ikke-isoterm varmebehandling reguleres temperaturen opp eller ned etter et bestemt intervall. I Figur 2.3 ser man en ikke-isoterm varmebehandling hvor temperaturen reguleres opp. Isoterm varmebehandling brukes i forsøkssammenheng når man ønsker å bestemme verdier på varmeresistens.

Varmebehandlingstemperaturen er temperaturen som blir brukt under en varmebehandling. "Come-up" tid er tiden det tar for en prøve å komme opp i varmebehandlingstemperaturen (Fig 2.2). En lang "come-up" tid kan medføre en svakere varmebehandling enn den som var tiltenkt. Samme effekten får man ved nedkjøling (Fig 2.2). Ved å benytte kapillærrør i varmebehandlingforsøk kan "come-up" tiden neglisjeres, dette fordi rørens utforming gjør at både kjøling og oppvarming skjer umiddelbart. I varmeresistensforsøk med kapillærrør må bakteriene være løst i viskøse løsninger som for eksempel melk eller peptonvann. Ønsker man å teste varmeresistens i tykkere matmedier må det benyttes større glassrør.

## 2.5 Beregning av varmeresistens

Bigelow og Esty var pionerer innen moderne temobakteriologi, da de 1920 beskrev prinsippene for bakteriologisk varmedrap.

Tilnærmingen som blir brukt er at inaktiveringsraten er 1.ordens kinetikk, det vil si at alle bakterier i en populasjon er like sensitive til varme, og vil dø med konstant hastighet.

Drapseffekten kan etter denne tilnærmingen kan beskrives med likningen (1)

$$N = N_0 e^{-kt} \quad (1)$$

hvor  $N$  er forandring i bakteriekonsentrasjonen etter varmebehandling,  $N_0$  er startkonsentrasjonen til cellene i mediet,  $t$  er tiden, og  $k$  er hastighetskonstanten spesifikk for temperatur (1/tidsenheter).

For å forenkle uttrykket blir bakteriekonsentrasjonen i likning 1 innenfor matvitenskap uttrykt i briggske logaritmer (2).

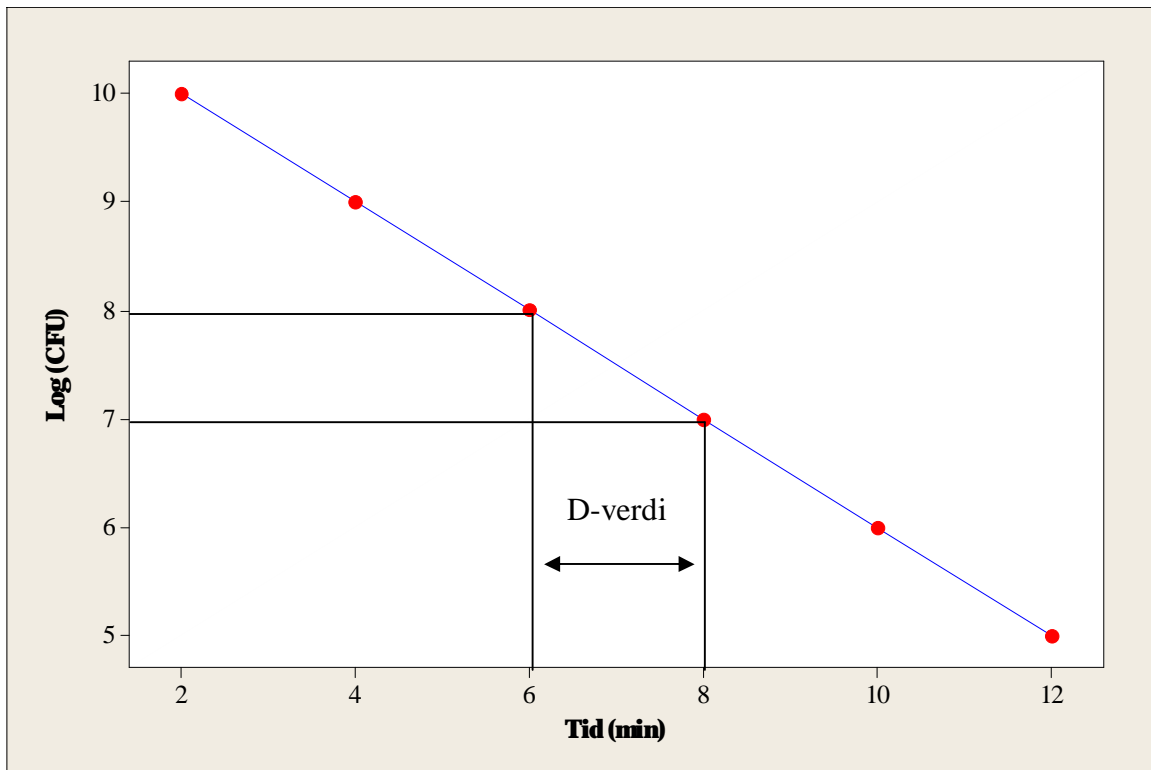
$$\log(N) = \log(N_0) - kt \quad (2)$$

Ved å plote logaritmen av de overlevende bakteriene mot tid, får man en semilogaritmisk lineær kurve (Fig 2.4). Ut i fra denne kurven kan D-verdien beregnes med formelen i likning 3.

$$D = \frac{a}{k} \quad (3)$$

hvor  $a$  er stigningstallet til kurven, og  $D$  er D-verdien i minutter.

D-verdien er definert som tiden i minutter som trengs for å innaktivere 90 % (en logenhet) av en bakterie populasjon.



**Figur 2.4 D-verdi. Figuren viser prinsippet med D-verdi.**

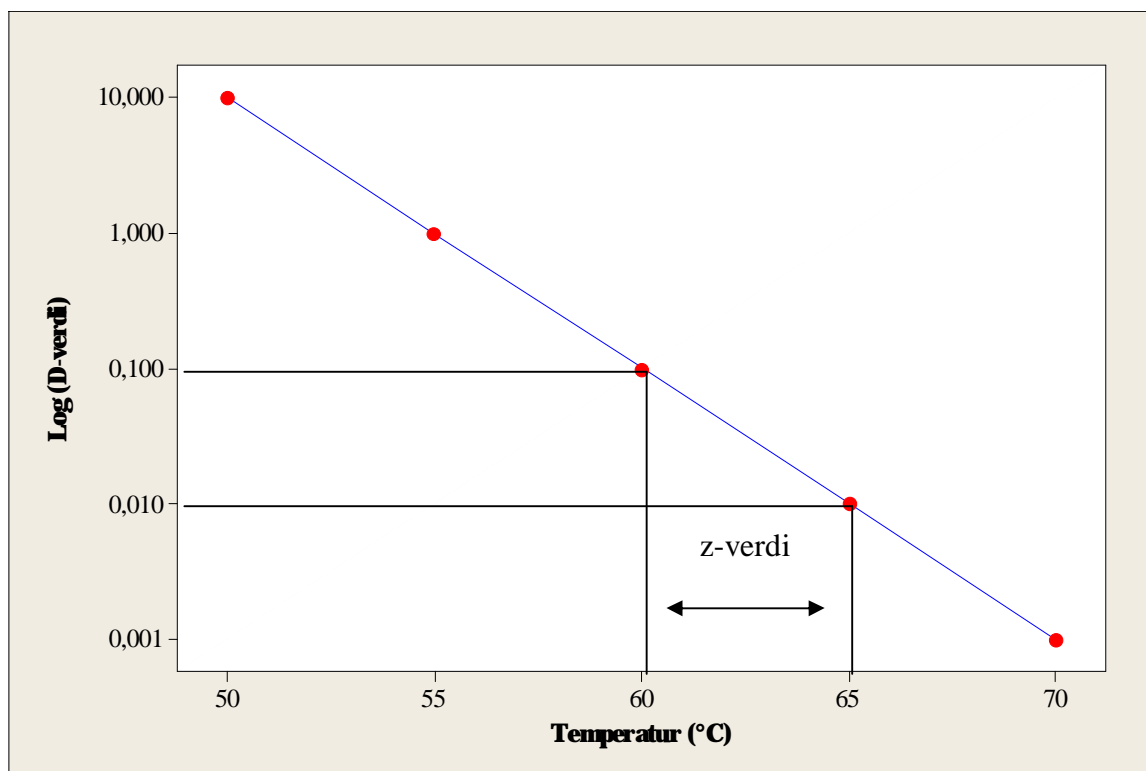
Stigningstallet for grafen i Figur 2.4 er  $-0,5x$ , som kan settes inn i likningen for D-verdien (3), og gi en D-verdi på 2 minutter.

Ved å plote logaritmen til ulike D-verdier mot tilhørende temperatur får man en graf hvor z-verdien (4) kan beregnes ut i fra stigningstallet.

$$= \dots (4)$$

Z-verdien er definert som antall grader ( $^{\circ}\text{C}$ ) som trengs for å forandre D-verdien med en logaritmisk enhet (Fig 2.5).





**Figur 2.5. Z-verdi.** Figuren viser prinsippet bak z-verdien. I dette tilfellet er z-verdien 5 °C.

Stigningstallet for grafen er  $-0,2x$ , som kan settes inn i likningen for z-verdien (4) og gi en z-verdi på 5 °C

### 2.5.1 Statistikk

Lineær regresjonslinje blir brukt for å finne den best tilpassede lineær linjen i et sett med eksperimentelle data på en graf. Stigningstallet til linjen gjør det mulig å konstruere en prognose om hvordan resultatene hadde blitt utenfor området hvor eksperimentelle data er samlet inn. Ut i fra stigningstallet kan man også beregne D- og z-verdiene (3 og 4).

Regresjonskoeffisienten,  $R^2$ , er et mål på spredningen av de eksperimentelle punktene rundt trendlinjen. Den lineære regresjonen er best når den er 1, på skalaen fra 0-1.

### 2.5.2 Avvik fra 1.ordenskinetikk

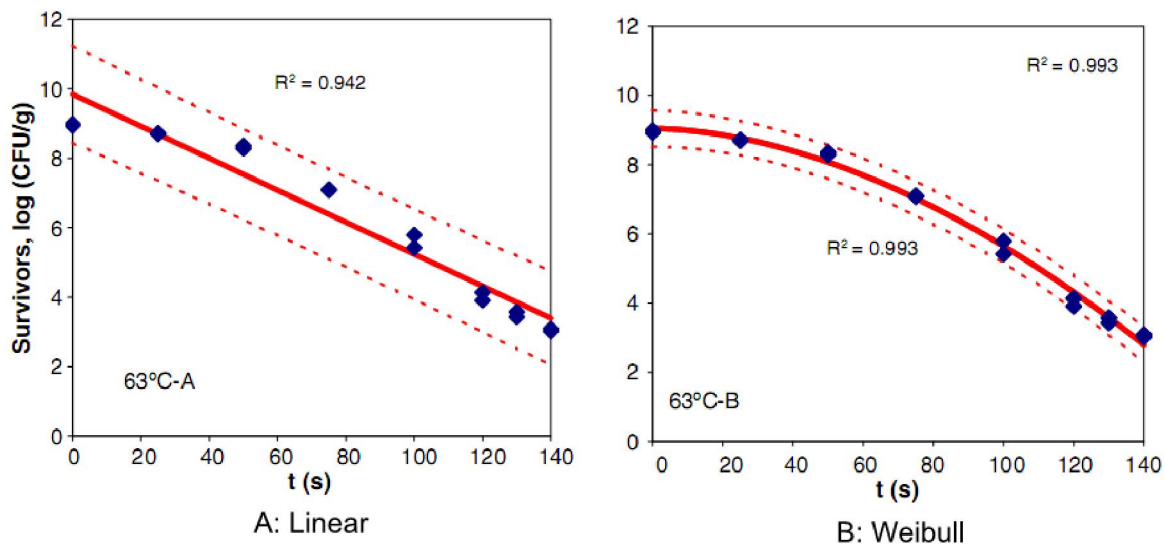
Den mest brukte modellen for inaktivisering av bakterier er lineær førsteordens kinetikk, men i utgangspunktet er de fleste overlevelseskurver ikke lineære. (Ahn and Balasubramaniam

2007;Corradini and Peleg 2007;Huang 2009;Peleg and Cole 1998). Weibull fordeling er blitt fremstilt som et alternativ til lineær varmebehandlingskinetikk fordi den kan beskrive hale- og skuldereffekter (Corradini and Peleg 2007;Peleg and Cole 1998;van Boekel 2002).

Weibullmodellen kan utledes direkte fra lineærmodellen:

$$\log(N) = \log(N_0) - \left(\frac{t}{D_0}\right)^n \quad (5)$$

Modellen (5) er mer generell enn tradisjonell lineær kinetikk, og den tillater at kurven bøyer av nedover eller oppover avhengig av  $n$ . Hvis  $n > 1$  forsterkes effekten av varmebehandlingstiden, og kurven bøyer nedover. Hvis  $n < 1$  vil kurven bøye oppover, og det vil si at varmebehandlingstiden har mindre effekt. Denne parameteren tar hensyn til skulde- og haleeffekten. I Figur 2.6 vises logaritmen av overlevende *L. monocytogenes* i kvernet storfekjøtt, plottet mot tid. Graf A viser den lineære tilpassningen og graf B viser tilpassing etter Weibullmodellen. Den høyere regresjonsverdien indikerer at Weibullmodellen ( $R^2=0,993$ ) er en bedre modell enn den lineære modellen( $R^2=0,942$ ).



**Figur 2.6. Viser logaritmen overlevende *L. monocytogenes* plottet mot tid, og regresjonen er tilpasset den lineære modellen (A) og Weibullmodellen (B). Reprodusert fra (Huang 2009)**

## 3.0 Materialer og metoder

---

*Oppskrifter på medier er sammen med ulikt utstyr angitt i avsnitt 7.*

### 3.1 Test organisme

*Listeria innocua* stammene CCUG 35613 og ATCC 33090 ble brukt som surrogater for *L. monocytogenes* i varmebehandlingsforsøkene.

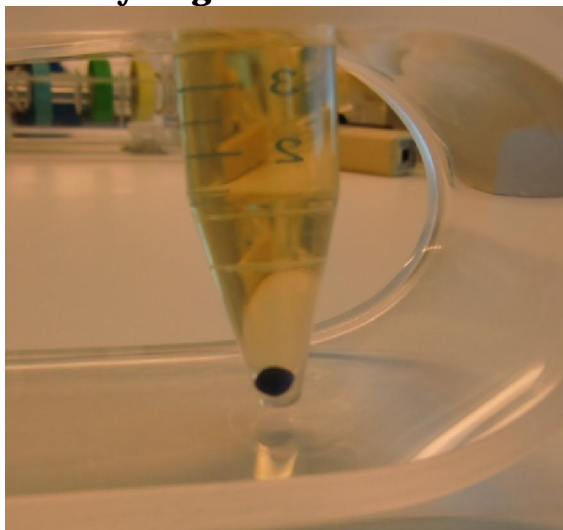
#### 3.1.1 Frysing av kulturer i Microbank

Microbank® (Prolab Diagnostic) er et frysesystem for oppbevaring av mikroorganismer, og er en steril beholder som består av porøse ringer i en cryopreservative løsning.

*L. innocua* stammene CCUG 35613 og ATCC 33090 ble dyrket opp fra eksisterende kultur på Nofima Norconserv. Bakteriene ble høstet fra TSAYE-skål med en steril podestav og overført til Microbank®. Microbanken ble ristet 5 ganger, slik at bakterien skulle trekke inn i porene. I siste trinn ble den cryopreservative løsningen fjernet og bakteriene lagret ved -80 °C. Det ble laget tre Microbank® for hver bakteriestamme. Ved et senere tidspunkt ble bakteriene dyrket opp for å undersøke om overføringen hadde vært vellykket og om det var tegn til forurensing. Dette ble gjort ved først å inkubere hver bakteriestamme i 10 ml TSBYE ved 37 °C over natten. Deretter ble bakteriene sådd ut på TSAYE-agar og inkubert ved 30 °C i 24 timer.

”Tryptic soy broth med 0,6% gjærekstrakt” (TSBYE) har blitt brukt i en rekke forsøk som vekstkultur for *L. innocua* (Ahn and Balasubramaniam 2007; Calderon-Miranda *et al.* 1999; Miller *et al.* 2006; Miller *et al.* 2009). ”Tryptic soy agar med 0,6% gjærekstrakt” (TSAYE) er et fast medium som har omtrent den samme sammensetningen som TSBYE. TSAYE er tidligere brukt av (Calderon-Miranda *et al.* 1999; Friedly *et al.* 2008; Miller *et al.* 2006; Miller *et al.* 2009) som vekstmedium etter drapsforsøk.

### 3.1.2 Dyrking av bakterier



**Figur 3.1** Microbank-ring i TSBYE.

For å få en ustresset bakteriekultur til varmebehandlingen har bakteriene blitt dyrket i to trinn. I trinn en ble en Microbankring (Fig 3.1) fra fryselagring overført til 10 ml TSBYE og inkubert ved 37 °C grader til stasjonærfase, ca 20 timer. I neste trinn ble 2 µl bakteriekultur fra stasjonærfasen overført til 20 ml TSBYE i en erlendmeyerkolbe. Denne ble plassert i risteinkubator ved 150 RPM og 37 °C i 12 timer. Disse forholdene ga en bakteriesuspensjon på ca. 10<sup>9</sup> CFU/ml med bakterier i tidlig stasjonærfase.

### 3.1.3 Vekstforsøk med bioscreen

Bioscreen er et spektrofotometer med automatisk avlesing, temperaturkontroll og mulighet for mange prøver samtidig. Kapasiteten til bioscreen er 2 brett med 100 brønner per brett.

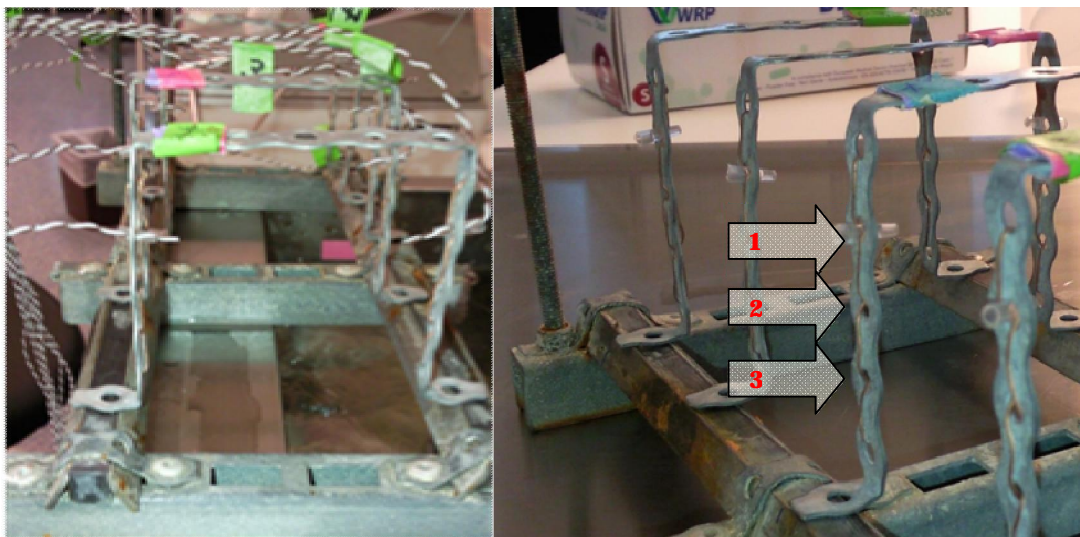
Spektrofotometeret måler optisk tetthet (OD) det vil si hvor mye lys som absorberes av et stoff ved en bestemt bølgelenge. Optisk tetthet måles ofte ved 600 nm. I forbindelse med bakterievekst, vil en økning av bakteriekonsentrasjon gi en økning av absorbans. Siden bakterien formere seg med binærdeling kan veksten deles inn i fire faser, først en nøle/lagfase, så en eksponentiell fase, stasjonærfase og tilsatt en dødsfase. I denne oppaven var det ønskelig å finne ut når *L. innocua* nå er tidlig stasjonærfase, da bakterien har høyest resistens.

*L. innocua* stammene CCUG 35613 og ATCC 33090 ble fra mikrobank inkubert i TSBYE ved 37 °C grader i 24 timer, dette var likt forholdene i avsnitt (3.3). Disse bakteriene ble

videre fortynnet til  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  og  $10^{-6}$ . Fra hver fortynning ble det satt 3 paralleller, med 250  $\mu$ l i hver brønn. Maskinen ble så satt til å lese av ved 600 nm hvert 10 minutt i 24 timer ved en konstant temperatur på 37 °C.

## 3.2 Varmebehandling

### 3.2.1 Temperaturmåling i vannbad



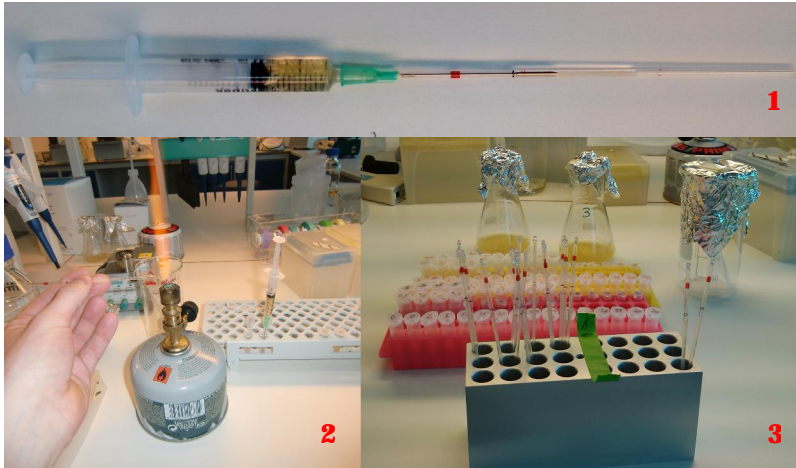
**Figur 3.2. Oversikt over sensorplassering. Øverste og nederste hull var ikke egnet for kapillærrør. Posisjon 1 har et plastrør montert, dette ble brukt for å holde sensorene i riktig posisjon**

For å bekrefte at temperaturfordelingen i vannbadet var jevn og stabil, ble det gjort forsøk ved hjelp av temperaturloggingsutstyr. Temperaturloggingsutstyret bestod av 10 sensorer, og disse ble fordelt over 5 kapillærrørsholdere hvor hver av posisjonene ble testet i separate forsøk (Fig 3.2). Den øverste posisjonen (1) var 4 cm fra bunnen (0,9 cm fra vannoverflaten), den i midten (2) var 7,0 cm fra bunnen, og den nederste (3) var 5,5 cm fra bunnen (Fig 3.2). Temperaturloggingen ble gjort uten lokk, da varmebehandlingsforsøkene gjennomføres uten lokk.

Referansetemperaturen ble målt med kalibrert termometer, vannbadet ble stilt inn slik at temperaturen i vannet samsvarte med referansetermometeret. Temperaturen ble lest av hvert 2 sekund i totalt 15 minutter ved hjelp av dataprogram. Logging ble utført ved 70 °C for 2 av vannbadene på labben til Nofima Norconserv, henholdsvis og Lauda.

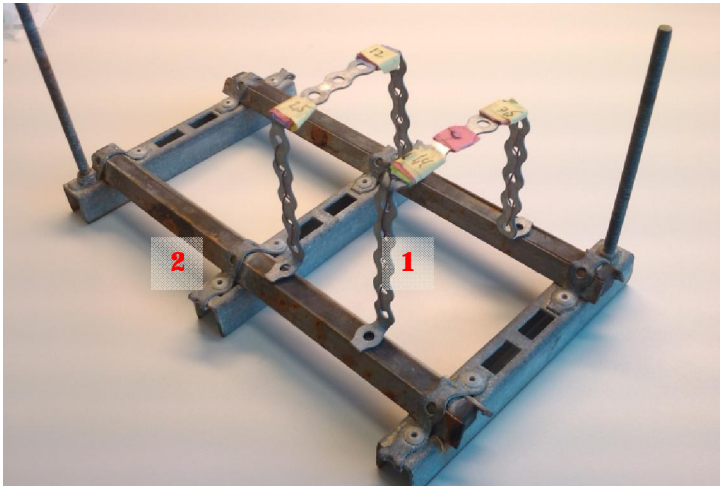
### 3.2.2 Varmebehandling i kapillærrør

Fra tidlig stasjonærfase inokulum ble 1 ml overført til 1,5 ml sterile eppendorfrør og sentrifugert ved 16000G i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og pellet resuspendert i 1 ml TSBYE.



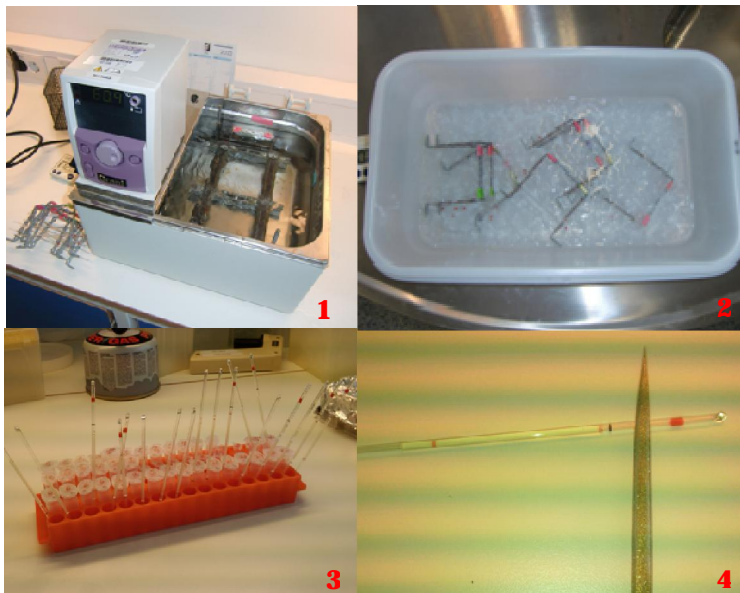
**Figur 3.3. 1. Bilde viser hvordan kapillærrøret ble fylt med en bakteriesuspensjon ved hjelp av en steril sprøyte/kanyle. 2. Viser hvordan enden på røret forsegles ved hjelp av en gassbrenner. 3. Rørene stilles i en loddrett posisjon for å bekrefte at de er lufttette.**

Ved hjelp av en steril sprøyte med lang nål ble 100  $\mu$ l *L. innocua* inokulum overført til 200  $\mu$ l sterile kapillærrør (BLAURAND ® intraMARK 708757) (Fig 3.3). På forhånd var 100  $\mu$ l merket av på rørene med tusj. Merkene ble satt slik at bakteriesuspensjonen ble liggende med like stor avstand til begge endene. Rørene ble så forseglet i hver ende ved hjelp av gassbrenner (Fig 3.3). Etter forseglingen ble rørene stilt på høykant for å bekrefte at rørene var lufttette (Fig 3.3). En eventuell luftlekkasje vil føre til at væsken siger.



**Figur 3.4 Kapillærrør stativet. Kapillærrør holderne (1) festes til magnetskinnene (2).**

For varmebehandlingen ble det benyttet et kapillærrørstativ (Fig 3.4), dette bestod av magnetskinner som gjør at kapillærrørholderne lett kan fjernes under varmebehandlingen (Landa 2008). I hver holder kunne det festes 3 kapillærrør.



**Figur 3.5. 1. Varmebehandling i vannbad. 2 kjøling på is. 3. Lufttøking 4 Filing av endene**

Varmebehandlingen foregikk i vannbad uten lokk (Fig 3.5). Etter endt varmebehandling ble prøvene plassert på is i 20-30 sekunder for å stoppe inaktivering av bakterieceller (Fig 3.5).

Etter nedkjølingen ble kapillærrørene vasket i sprit og lufttørket (Fig 3.5). Rørene ble åpnet ved å file et hakk i hver ende (Fig 3.5), og deretter ble endene brukket av slik at innholdet kunne tømmes i 1,5 ml eppendorfrør.

Varmebehandling i kapillærrør har blitt mye brukt innen varmebehandlingsforsøk (Fairchild *et al.* 1994; Jin *et al.* 2008; Sorqvist 1994)

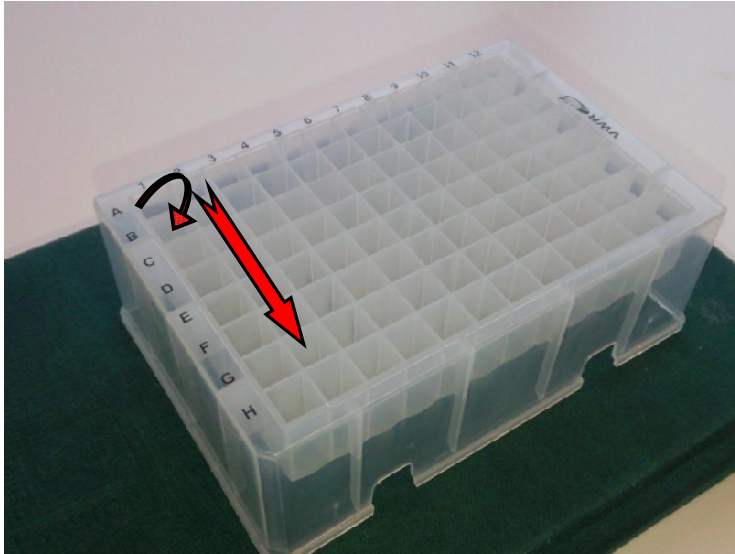
Begge stammene ble varmbehandlet ved 57, 58, 59, 60, 61, 62 og 63 °C. Ved fastsatte tider ble det gjort minst 6 uttak for hver av stammene. Ved hvert uttak var det to paralleller. Kapillærrør med bakteriesuspensjon som ikke var blitt varmebehandlet ble platet ut for hvert forsøk. Dette var for å bekrefte at oppdyrkingen hadde godt bra, for eksempel at startkonsentrasjonen ikke var unormalt lav. En normal startkonsentrasjon lå på rundt  $10^9$  CFU/ml i bakteriesuspensjonen.

### **3.3 Beregning av resultater**

For å kunne finne effekten av varmebehandlingsforsøkene ble det benyttet utplating på TSAYE. Dette baserer seg på at hver tellbare koloni har opphav i én bakterie som har overlevd varmebehandlingen. Antall bakterier oppgis i colony forming unit per milliliter (CFU/ml).



### 3.3.1 Fortynninger i dypbrønnsbrett



**Figur 3.6.** En VWR fortynningsbrønn med 96 brønner à 1,2 ml. Pilene illustrerer hvordan fortynningen foregår.

I forkant av utplatingen måtte det gjøres fortynninger av den varmebehandlede bakteriesuspensjonen, da det i de fleste tilfeller ville vært flere overlevende bakterier enn det som hadde vært mulig å telle (Fig 3.6). Fortynningsmediet var TSBYE. Fra hvert eppendorfrør med bakteriekultur ble det overført 50  $\mu$ l til brønnene i rad A som inneholdt 450  $\mu$ l TSBYE. Denne tierfortynningen ble homogenisert med en multikanalpipette, og deretter ble 100  $\mu$ l overført til brønnene i rad B som inneholdt 900  $\mu$ l TSBYE. Prosedyren med å overføre 100  $\mu$ l til 900 $\mu$ l TSBYE ble videreført nedover kolonnene til ønsket fortynning ble oppnådd. Prøvene som skulle plates ut fra rad A ble overført til 500  $\mu$ l PCR-rør, for de resterende radene ble det benyttet 1,5 ml eppendorfrør. Årsaken til at PCR-rør ble benyttet for prøvene i rad A var at prøvenålen på utplatingmaskinen ikke hadde kommet dypt nok ned i et eppendorfrør for å hente opp en prøve (*se avsnitt 3.3.2 om utplatingen*).

### 3.3.2 Regenerering etter varmebehandling



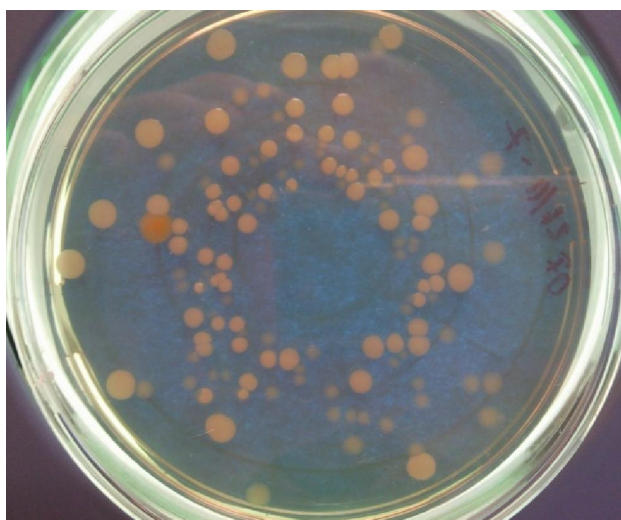
**Figur 3.7. Utplatingsmaskinen EDDY JET.**

EDDY JET (Fig 3.7) er et utplatingsutstyr som benytter spiralnokuleringsystemet, og er en alternativ og tidsbesparende metode i forhold til tradisjonell utplating. Den er tidsbesparende fordi det ikke er nødvendig med mange fortyndninger, en bakterieskål dekker en fortyndning fra  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  (IUL instruments).

Prinsippet til spiralnokuleringsystemet er at et kjent volum av en prøve settes på agarplaten logaritmisk med minkende volum (Archimedesspiral) fra sentrum av platen og ut til kanten (fig 3.8) Volumet for et gitt areal på agarplaten blir på denne måten kjent. Volumet til væsken,  $V_s$ , per millimeter av spiralsporet er gitt ved (6):

$$= ( \quad ) ( \quad ) \quad (6)$$

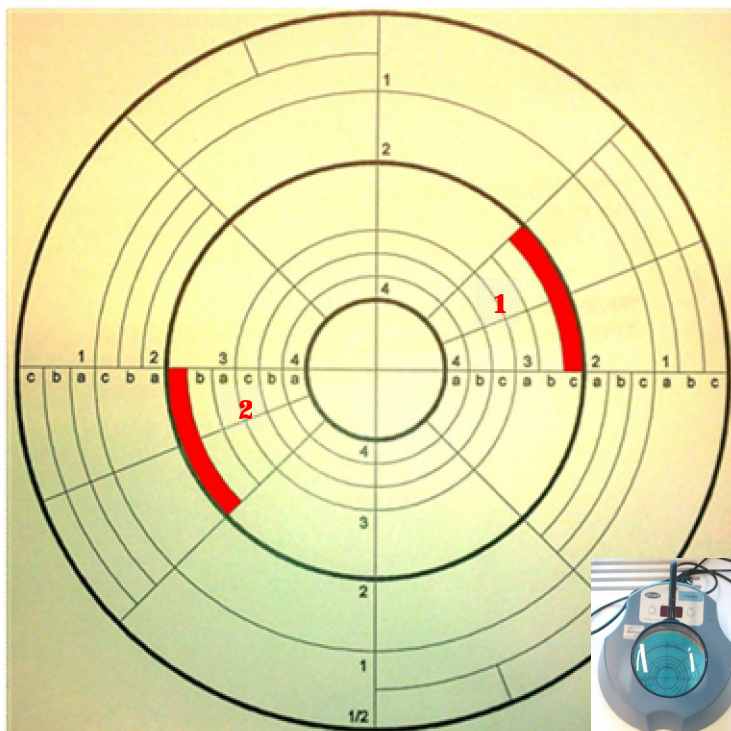
Hvor DF er antall mikroliter væske avsatt per kvadratmillimeter og A er distansen mellom nærliggende spiral i millimeter. (Walsh *et al.* 1985)



**Figur 3.8. Viser utplatede bakterier utført med EDDY JET**

For regenerering etter varmebehandling ble bakteriene sådd ut på TSAYE ved hjelp av EDDY JET. I de fleste forsøkene ble det sådd ut 2 fortynninger basert på hvilke fortynninger det kunne forventes en tellbar vekst. EDDY JET hentet prøvene med en steril nål fra rørene nevnt i avsnitt 3.3.1. Rørene måtte plasseres manuelt en og en under nålen. Samme nålen ble benyttet innad i fortynningsrekkene, men ble byttet for hver nye prøve. For forsøkene var EDDY JET stilt inn i en modus hvor 49,2  $\mu$ l av fortynningene ble platet ut.

### 3.3.3 Telling



**Figur 3.9. Telleplate for EDDY JET spreder, og koloniteller. Segmentet 3c (markert i rødt) tilsvarte ytterste delen av en 10cm petriskål. Telling av koloniene startet i segment 3c. Koloniteller i høyre hjørne.**

Siden det avsatte volumet på agarskålen var kjent, kunne en telleplansje benyttes (Fig 3.9). Området 3 og 4 var tilpasset 10 cm petriskåler. Resterende områder var for skåler med større diameter.

Det ble telt i to motstående områder (1 og 2) som tilsvarte 25 % av skålens overflate. Kolonitellingen startet i segment 3c på en av sidene (for eksempel 1). I hvert segment måtte det telles minst 20 kolonier. Hvis 20 kolonier ikke ble telt, måtte et nytt segment innover i telleplansjen tas i bruk (3c → 4a). Det samme ble gjort på motstående areal (for eksempel 2), men innenfor de samme segmentene som ble brukt i første areal (for eksempel 1). Summen av de to tellingene ble delt på det kjente volumet til de to segmentene (appendiks 7.2). For at tellingen skulle gå lettere ble det brukt en koloniteller (Fig 3.9).

Resultatet fra tellingene ble lagt inn Excel og behandlet i minitab for å kunne beregne D- og z-verdier. I Minitab ble statistiske parametere som justert regresjonskoeffisient ( $R^2$  adjust) og standardfeilen (SE) beregnet.

## 4.0 Resultater

---

### 4.1 Temperaturmåling av vannbad

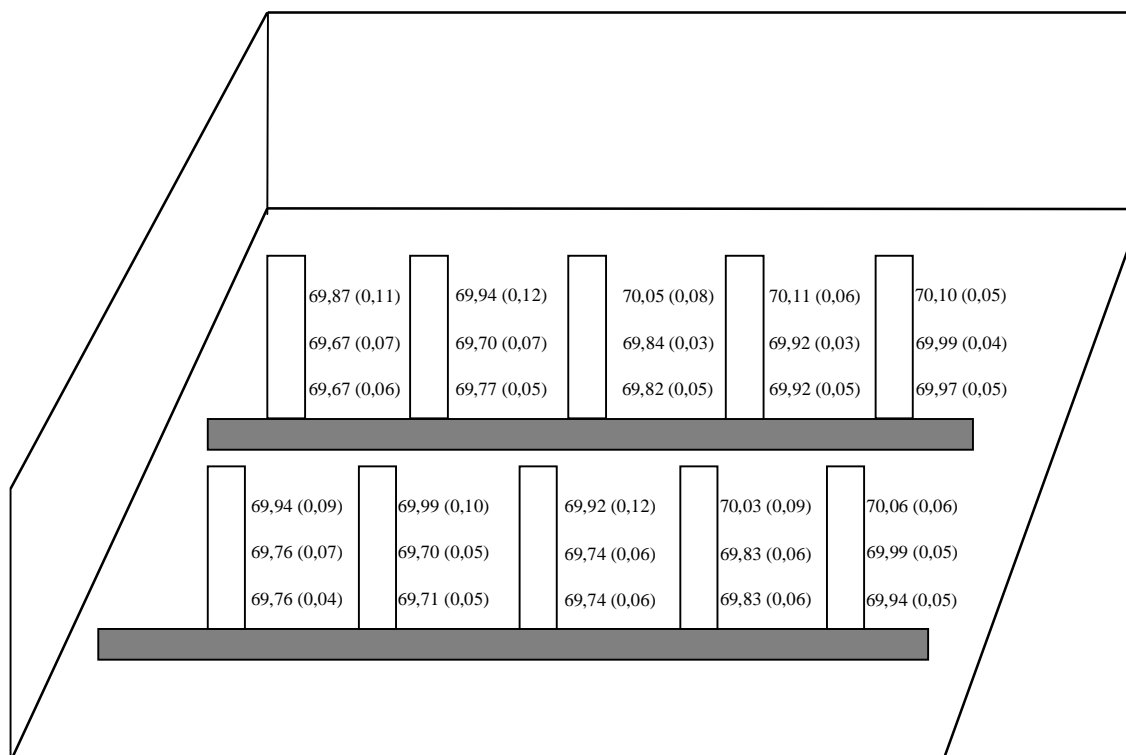
Temperaturfordelingen ble målt i Grant og Lauda vannbad ved 70 °C. For å bekrefte at vannbadet leverte stabil og rett varme til kapillærrørstativet ble det plassert temperatursensorer i alle 3 posisjonene (Fig 3.2), og deretter ble temperaturen avlest hvert 2. sekund i 15 minutter. I Tabell 4.1 vises gjennomsnittstemperaturen for hver posisjon i de to vannbadene, samt minimumstemperaturen, maksimumstemperaturen og differansen mellom disse.

**Tabell 4.1. Gjennomsnittstemperatur fra 15 minutters tidsintervall, samt minimums- og maksimumstemperaturen og differansen mellom høyeste og laveste målte temperatur.**

Vannbad	Posisjon	Gjennomsnitt temp. °C	Min °C	Maks °C	(Maks-Min) °C
Grant	1	70,00	69,87	70,11	0,24
Grant	2	69,81	69,67	69,99	0,33
Grant	3	69,81	69,67	69,97	0,30
Lauda	1	69,77	69,64	69,94	0,29
Lauda	2	69,73	69,60	69,93	0,33
Lauda	3	69,72	69,56	69,93	0,38

Både Lauda- og Grantvannbadet hadde jevn gjennomsnittstemperatur. Forskjellene var minimale med tanke på usikkerheten i måleutstyret som var på  $\pm 0,2$  °C. På differansetemperaturene var det størst avvik på posisjon 2 og 3 i begge vannbadene, og største avviket var 0,18 °C når usikkerheten i måleutstyret trekkes i fra.

Figur 4.1 viser kapillærrørstativet i Grant-vannbadet. Gjennomsnittstemperaturene ved 70 °C med standardavvik er skrevet inn der sensorene var plassert (Fig 4.1).

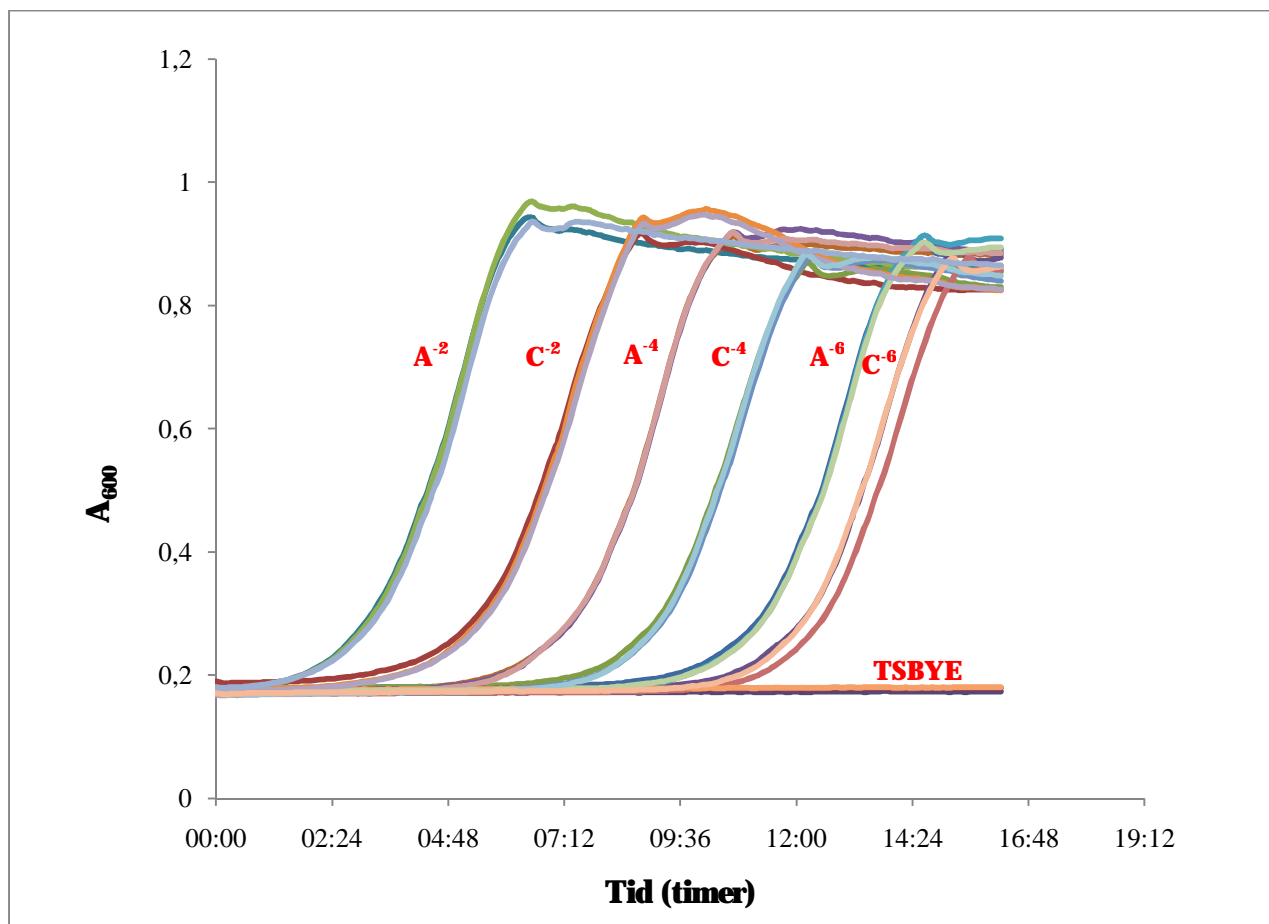


**Figur 4.1. Skjematisk fremstilling av kapillærrørstativet i Grant-vannbadet. De vertikale søylene forestiller kapillærrørholderne, og de horisontale illustrerer magnetskinnene. Temperaturene (°C), med standardavviket, er skrevet inn der hvor sensorene var plassert.**

Målingene for Grant-vannbadet, illustrert i Figur 4.1, viste lavest standardavvik ved de to nederste posisjonene. Her lå standardavviket på mellom 0,03 og 0,07 °C. I den øverste posisjonen var standardavviket betydelig høyere, og 0,12 °C var høyeste avvik. Lauda-vannbadet hadde de samme tendensene, hvor de to laveste posisjonene hadde lavere standardavvik. Generelt sett hadde Lauda-vannbadet lavere standardavviksverdier enn Grant. På grunnlag av resultatene ble bare de to nederste posisjonene på kapillærrørholderne benyttet under varmebehandlings forsøk. Selv om forsøkene viste at Lauda-vannbadet hadde jevnere temperaturfordeling og bedre stabilitet, var det Grant-vannbadet som ble mest brukt. Dette skyldes kapasitetsmessige årsaker.

## 4.2 Vekstforsøk

Det ble gjort vekstforsøk ved 37 °C, for å undersøke når *L. innocua* ATCC 33090 og *L. innocua* CCUG 35613 nådde tidlig stasjonærfase ved ulike fortynninger. Bakteriene ble fortynnet fra en bakteriesuspensjon dyrket etter forholdene i avsnitt 3.1.2. Det var 3 paralleller for hver fortynning.



**Figur 4.2.** Figuren viser A<sub>600</sub> av bakterievekst som funksjon av tid ved 37 °C. Bokstavene ved grafene indikerer hvilke stammer det er (C=CCUG 35613, A=ATCC 33090) og tallet indikerer tierfortynningen. TSBYE var med som blank prøve. Hver graf bestod av 3 paralleller.

**Tabell 4.2.** Tabell over hvor lang tid det tok før *L. innocua* stammene nådde tidlig stasjonærfase

Fortynning	Tid CCUG 35613 (timer)	Tid ATCC 33090 (timer)
10 <sup>-2</sup>	6:30	8:30
10 <sup>-4</sup>	12:00	11:00
10 <sup>-6</sup>	15:00	14:30

Figur 4.2 og Tabell 4.2 viste at CCUG 35613 nådde stasjonærfase noe tidligere enn ATCC 33090. For varmebehandlingsforsøkene i denne oppgaven ble bakteriene dyrket opp fra en  $10^{-4}$  fortynning slik at bakteriene kunne brukes etter 12 timer. Tidsforskjellene vedrørende stasjonærfase ble vurdert som neglisjerbar, da det som var viktig var at bakteriene var ute av den eksponentielle vekstfasen. *L. innocua* er tidligere blitt vist å ha betydelig mindre varmeresistens ved eksponentiell vekstfase enn i stasjonærfase (Miller *et al.* 2009). For *L. innocua* 10528 var  $D_{60\text{ °C}}$  0,47 min ved eksponentiell fase og 2,21 min ved stasjonærfase. *L. innocua* 2030c var  $D_{60\text{ °C}}$  0,40 ved eksponentiell vekstfase og 1,83 ved stasjonærfase.

For CCUG 35613 ble det observert at parallellene ikke fulgte hverandre ved  $10^{-6}$  fortynningen (Fig 4.2). Dette kan skyldes fortynningsfeil. Det vil si at det i en eller flere av brønnene ble plassert ut for mye eller for lite bakterier. Det er større sannsynlighet at en slik feil kan ha skjedd ved høye fortynninger ( $10^{-6}$ ), fordi det er utført flere pipetteringer for å komme til denne fortynningen.

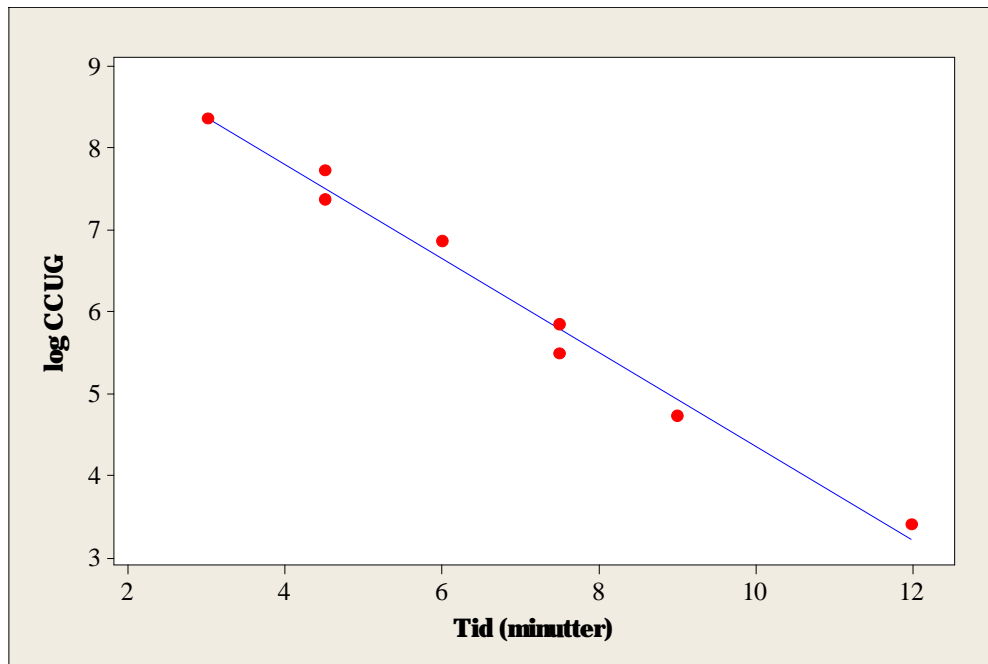
Flat TSBYE-kurve indikerte at det ikke var kontaminering av vekstmediet (Fig 4.2).

### 4.3 Varmedrapsforsøk

Kapillærrørsmetoden ble brukt for varmebehandling ved 57, 58, 59, 60, 61, 62 og 63 °C av *L. innocua* ATCC 33090 og *L. innocua* CCUG 35613. Det ble utført 2 forsøk med begge stammene til hver temperatur. I forsøkene var det ønskelig å innaktivere flest mulig bakterier, og dermed ble forsøkene kjørt ned mot deteksjonsgrensen. Disse eksperimentene hadde en deteksjonsgrense på mellom log 3 og log 4 (CFU/ml). Den høye deteksjonsgrensen skyldes liten prøvemengde, og at det derfor måtte gjøres en fortynning for å benytte EDDYJET. Med de gitte forhold varerte varmebehandlingstiden fra 42 minutter ved 57 °C til 3 minutter ved 63 °C. Etter varmebehandlingen ble løsningene fortynnet og bestemte fortynninger platet ut på TSAYE ved hjelp av EDDYJET. Bakteriene inkubert ved 30 °C og fulgt opp i 5 døgn. Resultatene ble behandlet i Excel og Minitab, slik at D-verdiene og z-verdiene kunne beregnes.

Figur 4.3 viser et eksempel på en graf fra et varmebehandlingsforsøk. Dette forsøket er utført på *L. innocua* CCUG 35613 ved 60 °C. Hvert punkt består av gjennomsnittet til 2 paralleller.



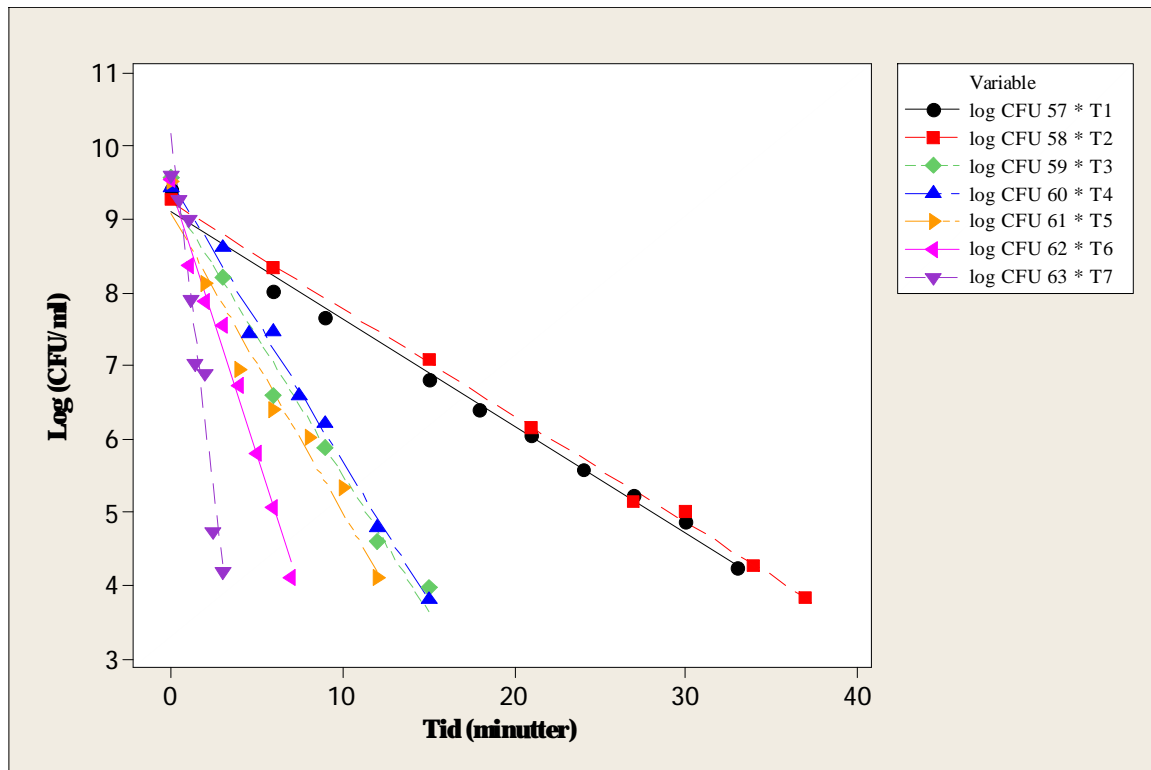


**Figur 4.3. Overlevende (CFU/ml) *L. innocua* CCUG 35613 ved 60 °C plottet mot tid.**

Regresjonslinjen i Figur 4.3 har et stigningstall på  $0,572 \pm 0,029$  og en regresjonskoeffisient ( $R^2$ -adj) på 0,983.

D-verdien ble for alle forsøk beregnet med formel fra teoriavsnittet (3). For forsøket i Figur 4.3 var D-verdien *L. innocua* CCUG 35613 1,75 minutter ved varmebehandling på 60 °C.

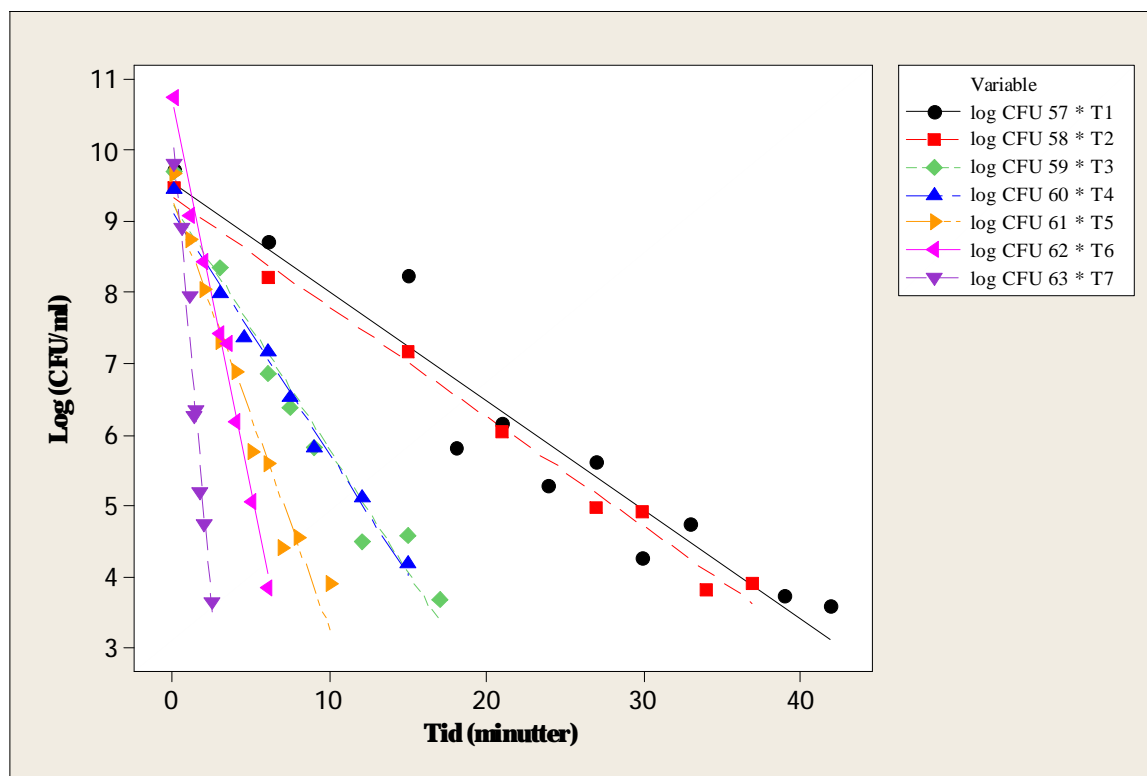
Data fra varmebehandlingsforsøkene med *L. innocua* CCUG 35613 ble lagt inn i en pivottabell i Excel og plottet for å illustrere effekten av temperatur og tid. Grafene i Figur 4.4 og 4.5 viser gjennomsnittlig log CFU/ml som funksjon av tid ved hver varmebehandlingstemperatur.



**Figur 4.4** Overlevende *L. innocua* CCUG 35613 ved ulike varmebehandlingstemperaturer som funksjon av tid.

Som vist i Fig 4.4 tok det 35 min å oppnå 5-log innaktivering ved 57 °C, mens det tok 3 minutter å oppnå 5-log innaktivering ved 63 °C. En kunne forvente en stadig raskere innaktivering for hver temperatur, og at kurvene hadde en vifte form. Dette var ikke tilfellet da grafene ved 57 °C og 58 °C, og 59 °C og 60 °C tilsynelatende var like. Dette vil bli diskutert nærmere i forbindelse med Fig 4.6 og 4.7.

Også fra forsøkene med *L. innocua* ATCC 33090 ble dataene lagt inn i en pivottabell i Excel og deretter plottet (Fig 4.5)



**Figur 4.5** Overlevende *L. innocua* ATCC 33090 ved ulike varmebehandlingstemperaturer som funksjon av tid.

Varmebehandlingsgrafene for *L. innocua* ATCC 33090 (Fig 4.5) fulgte de samme trendene som *L. innocua* CCUG 35316 (Figur 4.4). Også her så man at 57 °C og 58 °C, og 59 °C og 60 °C tilsynelatende var like. Dette vil bli diskutert nærmere i forbindelse med Fig 4.6 og 4.7. Ved 57 °C var grafen ujevn. Dette skyldes at det ene forsøket var mer unøyaktig enn andre forsøk, noe som kan ses på regresjonskoeffisienten i Tabell 4.4.

**Tabell 4.3 D-verdier (min) og regresjonskoeffisient for *L. innocua*CCUG 35613**

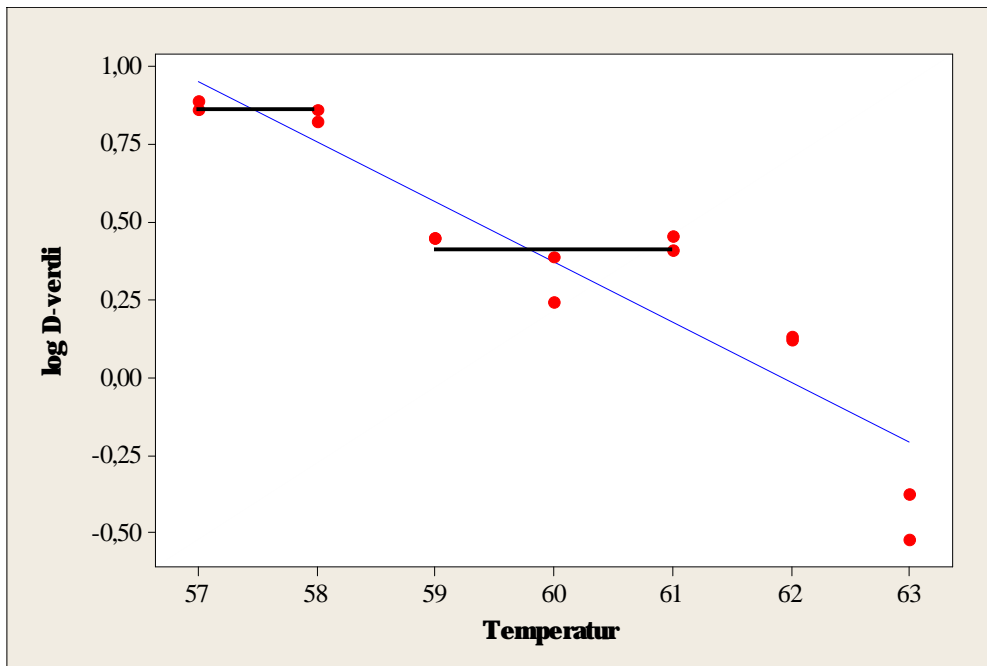
Temperatur °C	D-verdi	R <sup>2</sup>	SE
57	7,69	0,991	0,03
57	7,25	0,98	0,05
58	6,67	0,993	0,03
58	7,3	0,972	0,07
59	2,82	0,975	0,07
59	2,8	0,965	0,09
60	1,74	0,983	0,05
60	2,45	0,971	0,08
61	2,84	0,931	0,12
61	2,55	0,963	0,08
62	1,35	0,958	0,07
62	1,32	0,965	0,06
63	0,3	0,964	0,09
63	0,42	0,934	0,12

**Tabell 4.4 D-verdier (min) og regresjonskoeffisient for *L. innocua*ATCC 33090**

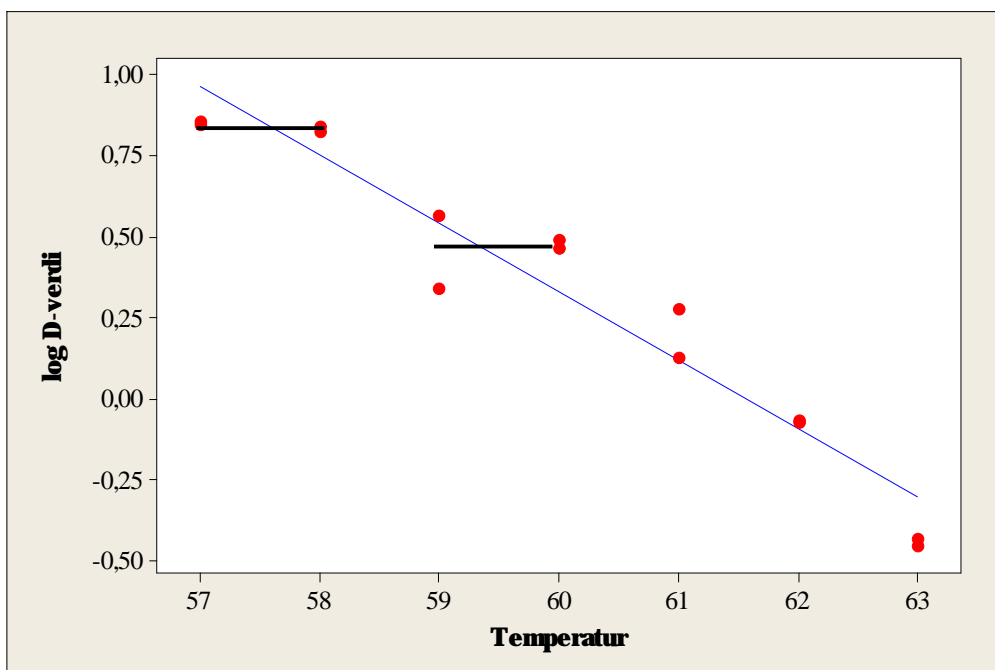
Temperatur °C	D-verdi	R <sup>2</sup>	SE
57	7,2	0,987	0,05
57	7,04	0,955	0,08
58	6,67	0,974	0,07
58	6,94	0,962	0,09
59	2,19	0,993	0,04
59	3,7	0,934	0,11
60	2,91	0,963	0,09
60	3,11	0,966	0,06
61	1,33	0,98	0,06
61	1,9	0,976	0,06
62	0,83	0,985	0,05
62	0,86	0,985	0,05
63	0,34	0,987	0,05
63	0,39	0,953	0,10

Varmedrapsforsøkene i kapillærrør med *L. innocua*CCUG 35613 og *L. innocua*ATCC 33090 viste en god tilnærming til lineær drapskinetikk med regresjonskoeffisienter som var større enn 0,931 (Tabell 4.3 og 4.4). For et forsøk utført i nesten samme temperaturområdet (52,5 - 65 °C) med *L. innocua* 10528 ble det oppnådd lignende verdier (Miller *et al.* 2006).

Logaritmen for D-verdiene til *L. innocua*CCUG 35613 (Tab 4.3) og *L. innocua* ATCC 33090 (Tab 4.4) ble plottet mot temperaturen i henholdsvis Figur 4.5 og Figur 4.6. Likningen til de respektive regresjonslinjene ble brukt for å beregne gjennomsnittlig D<sub>60 °C</sub>-verdier. Ut fra stigningstallet til regresjonslinjene ble z-verdiene (Tabell 4.5) beregnet etter formel (4).



**Figur 4.6.** Log D-verdi for *L. innocua* CCUG 35613 som funksjon av temperatur (°C). Logaritmene av D-verdien i tabell 4.3 plottet mot de respektive varmebehandlingstemperaturene.  $R^2 = 0,839$



**Figur 4.7.** Log D-verdi for *L. innocua* ATCC 33090 som funksjon av temperatur (°C). Logaritmene av D-verdien i tabell 4.4 plottet mot de respektive varmebehandlingstemperaturene.  $R^2 = 0,924$

Som nevnt i forbindelse med Figur 4.4 og Figur 4.5 var enkelte av varmebehandlingsgrafene påfallende like. De like grafene tilsvarer de markerte punkter i Figur 4.6 og 4.7 (horisontal linje). For begge stammene så man at D-verdiene var tilnærmet like for 57 °C og 58 °C grader, og tilsvarende ble observert mellom 59 °C og 60 °C, for CCUG 35613 var også D<sub>61</sub>-verdien lik. Det var lite sannsynlig at likheten skyldes tilfeldigheter, ettersom dette inntraff ved begge stammene og at det lå mye data bak punktene. En mulighet, i hvert fall for punktene mellom 57 og 58 °C, kan være at det er en skuldereffekt. En skuldereffekt indikerer at de lavere temperaturene (57 °C) ikke har en log lineær sammenheng med de høyere temperaturene (58-63 °C) i forsøket. Avsnitt 2.5.2 omtaler avvik fra lineær 1.orden kinetikk. En annen mulighet kan være at det er blitt begått en systematisk feil under de gjeldene forsøk. Forsøkene ble utført mot slutten av forsøksperioden, noe som av treningsmessige årsaker burde bety at reproduserbarheten var høy. En annen faktor som kan ha påvirket resultatet er hvor mange stammer det ble gjennomført forsøk med den aktuelle forsøksdagen. Enkelte dager ble det bare utført forsøk med en stamme, noe som førte til en mindre arbeidsmengde. En liten arbeidsmengde kan ha ført til høyere nøyaktighet, og motsatt kan store arbeidsmengder ha ført til lavere nøyaktighet. Ved 57 °C og 58 °C ble forsøkene utført med begge stammene ved de ulike forsøksdagene.

Følgene av D-verdilighetene ved 57 °C og 58 °C, og 59 °C og 60 °C, var en dårlig regresjonskoeffisient for log-D-verdi-plottet for begge stammene. *L. innocua* CCUG 35613 (Fig 4.6) fikk en lav regresjonskoeffisient på 0,839. Regresjonskoeffisient til *L. innocua* ATCC 33090 (Fig 4.7) var bedre med en R<sup>2</sup>-verdi på 0,924. Regresjonskoeffisienten for begge forsøkene var dårlige sammenlignet med litteratur med liknende forsøk, som har R<sup>2</sup> større enn 0,99 (Alvarez-Ordóñez *et al.* 2009; Miller *et al.* 2009).

Regresjonslinjen til log-D-verdiplottet til *L. innocua* CCUG 35613 hadde en regresjonslinje med stigningstall 0,1937±0,0233. Regresjonslinjen for *L. innocua* ATCC 33090 hadde et stigningstall på 0,2122±0,0168. Stigningstallene ga grunnlag for beregning av D<sub>60 °C</sub>- og z-verdiene som er oppgitt i Tabell 4.5.

**Tabell 4.5. De samlede resultater med  $D_{60^\circ\text{C}}$ ,  $z$  og  $R^2$  verdier for *L. innocua* ATCC 33090 *L. innocua* CCUG 35613**

	<b>Gjennomsnittlig <math>D_{60^\circ\text{C}}</math></b>	<b><math>z</math>-verdi (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	<b><math>R^2</math>-verdi</b>
<i>L. innocua</i> CCUG 35613	2,29±0,05	5,15±0,12	0,839
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	2,40±0,04	4,71±0,08	0,924

D-verdi

Den gjennomsnittlige  $D_{60^\circ\text{C}}$ -verdien for *L. innocua* CCUG 35613 var den 2,29±0,05 minutter, og for *L. innocua* ATCC 33090 var den 2,40±0,04 minutter. Det var svært liten forskjell (1,2 sek) mellom stammene.

I et tidligere forsøk (Ahn and Balasubramaniam 2007), med subkultur i TSBYE og restutisjon på TSA, ble  $D_{60^\circ\text{C}}$ -verdien til *L. innocua* ATCC 33090 funnet å være 2,43 minutter.

Bakteriene som ble varmebehandlet var høstet etter 20 timer ved 30  $^\circ\text{C}$  (tidlig stasjonærfase).  $D_{60^\circ\text{C}}$  verdien var lik den som ble funnet for ATCC 33090 i denne oppgaven.

Miller *et al.* (2006) brukte *L. innocua* NCTC 10528 som ble dyrket i TSBYE ved 30  $^\circ\text{C}$  i 20 timer (tidlig stasjonærfase), varmebehandlet ved 60  $^\circ\text{C}$  med TSBYE som varmebehandlingsmedium, og regenerert på TSAYE ved 30  $^\circ\text{C}$ . Dette ga en  $D_{60^\circ\text{C}}$ -verdi på 2,73 minutter, en D-verdi som var 15 til 20 sekunder større enn den som ble funnet i denne oppgaven.

Aguirre *et al.* (2009) fant for ATCC 33090 en  $D_{57^\circ\text{C}}$ -verdi på 2,03 minutter. Da ble bakteriene dyrket opp i TSBYE og platet ut på TSAYE etter varmebehandlingen. Under varmebehandlingen ble det brukt en salinløsning, en løsning med 0,75 % NaCl. Den gjennomsnittlige  $D_{57^\circ\text{C}}$ -verdien for forsøkene i denne oppgaven var for ATCC 33090 10,37 minutter og for CCUG 35613 8,74 minutter. Den store forskjellen kan forklares med at det ble brukt salin som varmemedium. Hvis det hadde blitt brukt et laboriemedium ville sammensetningen (f.eks. proteiner, stivelse og fett) kunne økt varmeresistensen. (Aguirre *et al.* 2009) hadde også utført like forsøk med andre bakterier. Da disse D-verdiene ble sammenlignet med annen litteratur hvor næringsmedier hadde blitt brukt, viste de samme tendensene seg. D-verdiene var betydelig høyere ved bruk av laboriemedier enn D-verdiene man fikk ved å varmebehandle i salin.

Alvarez-Ordóñez *et al.* (2009) benyttet *L. innocua* CECT 910, som tilsvarer *L. innocua* ATCC 33090, i varmeinntakiveringsforsøk. Da ble det funnet en D-verdi for 59 °C på 1,04 minutter. Det var betydelig lavere enn den beregnede D<sub>59 °C</sub>-verdien for forsøkene i denne oppgaven som var på 3,91 minutter for ATCC 33090. Forskjellen kan forklares med at det ble brukt et annet vekstmedium. BHI-broth ble brukt i subkultur, og ved restitusjon ble det brukt BHI-agar. Varmebehandlingsmediumet var også ulikt, Alvarez-Ordóñez brukte 0,2 M Sorensen buffer (binatrium-monokalsium fosfat). En annen vesentlig forskjell var at bakteriene ble varmebehandlet ved sen stasjonærfase. Det er kjent at bakterier tåler mest i tidlig stasjonærfase.

### Z-verdi

Z-verdien er et mål på effekten av temperaturforandring. Den forteller temperaturforandringen som kreves for at varmeinntakiveringen av en målorganisme skal reduseres eller økes med en logaritmisk enhet. Z-verdien var for CCUG 35613  $5,15 \pm 0,12$  °C og for ATCC 33090  $4,71 \pm 0,08$  °C (Tabell 4.3). Det var liten signifikant forskjell mellom z-verdiene (0,24 °C). Relevante z-verdier i Tabell 2.1 ble sammenlignet z-verdiene oppnådd i dette forsøket. *L. innocua* NCTC 10528, 6,73 °C (Miller *et al.* 2006), *L. innocua* CECT 910, 5,65 °C (Alvarez-Ordóñez *et al.* 2009), *L. innocua* NCTC 10528, 6,87 °C og *L. innocua* 2030c 5,95 °C (Miller *et al.* 2009) var alle høyere z-verdier enn de som ble funnet i dette studiet. Z-verdiene det ble sammenlignet mot var alle fra varmebehandlede bakterier hvor det ble brukt ikke-selektive laboratoriemedier under oppformering og restitusjon.

## **4.4 Videre arbeid**

Denne oppgaven tar for seg varmeresistensen til *L. innocua* i et laboratoriemedium uten noen modifikasjoner. Det kunne også vært interessant og sett på endringer i varmeresistens ved å forandre på faktorer i oppvekstfasen. For eksempel kunne man tatt ut bakterier i en annen vekstfase, det kunne blitt benyttet andre temperaturer, og man kunne tilsatt salt eller sukker i oppformeringsmediet. For å relatere forsøkene mot ProSpect kunne det blitt gjort forsøk i matmatriser som inneholdt fisk.



## 5.0 Konklusjon

---

Utgangspunktet for denne masteroppgaven var å skaffe kunnskaper om *L.monocytogenes* surrogaten *L. innocua*, og dens varmeinaktiveringskinetikk med relevans til matsikkerhet i fiskeprodukter. Varmeresistensen for *L. innocua* CCUG 35613 og *L. innocua* ATCC 33090 ble undersøkt. For *L. innocua* CCUG 35613 var  $D_{60\text{ °C}} = 2,29 \pm 0,05$  minutter og  $z = 5,15 \pm 0,12$  °C, og for *L. innocua* ATCC 33090  $D_{60\text{ °C}} = 2,40 \pm 0,04$  minutter og  $z = 4,71 \pm 0,08$  °C. Det var liten signifikant forskjell mellom stammene.  $D_{60\text{ °C}}$  verdiene så ut til å være like de funnet i andre publikasjoner,  $z$ -verdiene var lavere. Begge stammene i oppgaven ville med gjeldene betingelser blitt inaktivert i pasteuriseringsprosessen på 70 °C i 2 minutter, som er kravet for produkter som skal ha holdbarhet i mindre enn 10 dager. Dog må man forvente at varmeresistensen ville vært høyere i en matmatrix.

## 6.0 Referanser

---

Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Ad Hoc group on vulnerable groups- Report in the increased incidence of Listeriosis in the -UK FSA/1439/0709. 2009.

Aguirre,J.S., Pin,C., Rodriguez,M.R. and de Fernando,G.D.G. (2009) Analysis of the Variability in the Number of Viable Bacteria after Mild Heat Treatment of Food. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6992-6997.

Ahn,J. and Balasubramaniam,V.M. (2007) Inactivation kinetics of *Listeria innocua* ATCC 33090 at various temperature heating-up and pressure building-up rates. *Food Science and Biotechnology* **16**, 255-259.

Alvarez-Ordóñez,A., Fernandez,A., Bernardo,A. and Lopez,M. (2009) Heat-Resistance Prediction of *Listeria Innocua* Grown at Different Temperatures. *Journal of Food Safety* **29**, 474-483.

Barbosa,W.B., Cabedo,L., Wederquist,H.J., Sofos,J.N. and Schmidt,G.R. (1994) Growth Variation Among Species and Strains of *Listeria* in Culture Broth. *Journal of Food Protection* **57**, 765-&.

Beuchat,L.R., Brackett,R.E., Hao,D.Y.Y. and Conner,D.E. (1986) Growth and Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in Cabbage and Cabbage Juice. *Canadian Journal of Microbiology* **32**, 791-795.

Bigelow,W.D.,Esty,J.R.,1920.The thermal death point in relation to time of Typical thermophilic organisms. *Journal of Infectious Diseases* **27**,602–617.

Boyle,D.L., Sofos,J.N. and Schmidt,G.R. (1990) Thermal-Destruction of *Listeria monocytogenes* in A Meat Slurry and in Ground-Beef. *Journal of Food Science* **55**, 327-329.

Calderon-Miranda,M.L., Barbosa-Canovas,G.V. and Swanson,B.G. (1999) Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology* **51**, 19-30.

Casadei,M.A., de Matos,R.E., Harrison,S.T. and Gaze,J.E. (1998) Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products as affected by the growth medium. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 234-239.

Corradini,M.G. and Peleg,M. (2007) A Weibullian model for microbial injury and mortality. *International Journal of Food Microbiology* **119**, 319-328.

Crawford,R.G., Beliveau,C.M., Peeler,J.T., Donnelly,C.W. and Bunning,V.K. (1989) Comparative Recovery of Uninjured and Heat-Injured *Listeria-Monocytogenes* Cells from Bovine-Milk. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1490-1494.

Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W. and Scott, V.N. (2001) Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **64**, 410-429.

EFSA -European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008, EFSA Journal; 2010 8(1):1496.

European Commission. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 2005.

Ref Type: Report

European Commission - Health & consumer protection directorate. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health - ON *Listeria Monocytogenes* (23 September 99). 1999. Health & consumer protection directorate - general.

Ref Type: Report

Faber, J. M. and Peterkin, P. I. (2000) *Listeria monocytogenes*. In *The Microbiological Safety and Quality of Food* pp. 1178-1232.

Fain, A.R., Line, J.E., Moran, A.B., Martin, L.M., Lechowich, R.V., Carosella, J.M. and Brown, W.L. (1991) Lethality of Heat to *Listeria monocytogenes*: Scott-A - D-Value and Z-Value Determinations in Ground-Beef and Turkey. *Journal of Food Protection* **54**, 756-761.

FAIR programme- European Commission. Harmonization of safety criteria for minimally processed food - Inventory report- FAIR concerted action FAIR CT96-1020. 1997.

Fairchild, T.M. and Foegeding, P.M. (1993) A Proposed Nonpathogenic Biological Indicator for Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1247-1250.

Fairchild, T.M., Swartzel, K.R. and Foegeding, P.M. (1994) Inactivation Kinetics of *Listeria innocua* in Skim Milk in A Continuous-Flow Processing System. *Journal of Food Science* **59**, 960-963.

Farber, J.M. and Pagotto, F. (1992) The Effect of Acid Shock on the Heat-Resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **15**, 197-201.

Fernández, A., López, M., Bernardo, A., Condón, S. and Raso, J. (2007) Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* **24**, 372-379.

Foegeding, P.M. and Stanley, N.W. (1991) *Listeria innocua* Transformed with An Antibiotic-Resistance Plasmid As A Thermal-Resistance Indicator for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **54**, 519-523.

Folkehelseinstituttet. Årsrapport - Matbårne infeksjoner og utbrudd i 2009. 2010a.

Ref Type: Report

Folkehelseinstituttet. E-bøker-Smittevernboke- Smittsomme sykdommer fra a til å-Listeriose. <http://www.fhi.no> . 2010..

Electronic Citation

Friedly,E.C., Crandall,P.G., Ricke,S., O'Bryan,C.A., Martin,E.M. and Boyd,L.M. (2008) Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *Journal of Food Science* **73**, M174-M178.

Gaze,J.E., Brown,G.D., Gaskell,D.E. and Banks,J.G. (1989) Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beef steak and carrot. *Food Microbiology* **6**, 251-259.

Golden,D.A., Beuchat,L.R. and Brackett,R.E. (1988) Evaluation of Selective Direct Plating Media for Their Suitability to Recover Uninjured, Heat-Injured, and Freeze-Injured *Listeria monocytogenes* from Foods. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1451-1456.

Harrison,M.A. and Huang,Y.W. (1990) Thermal Death Times for *Listeria monocytogenes* (Scott-A) in Crabmeat. *Journal of Food Protection* **53**, 878-880.

Heddleson,R.A. and Doores,S. (1994) Factors Affecting Microwave-Heating of Foods and Microwave-Induced Destruction of Foodborne Pathogens - A Review. *Journal of Food Protection* **57**, 1025-1037.

Huang,L.H. (2009) Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground beef under isothermal and dynamic temperature conditions. *Journal of Food Engineering* **90**, 380-387.

Jemmi,T. and Stephan,R. (2006) Listeria monocytogenes: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* **25**, 571-580.

Jin,T., Zhang,H., Boyd,G. and Tang,J. (2008) Thermal resistance of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* K12 in liquid egg determined by thermal-death-time disks. *Journal of Food Engineering* **84**, 608-614.

Jorgensen,F., Hansen,T.B. and Knochel,S. (1999) Heat shock-induced thermotolerance in *Listeria monocytogenes* 13-249 is dependent on growth phase, pH and lactic acid. *Food Microbiology* **16**, 185-194.

Jorgensen,F., Stephens,P.J. and Knochel,S. (1995) The Effect of Osmotic Shock and Subsequent Adaptation on the Thermotolerance and Cell Morphology of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 274-281

Juneja,V.K. and Elben,B.S. (1999) Predictive thermal inactivation model for *Listeria monocytogenes* with temperature, pH, NaCl, and sodium pyrophosphate as controlling factors. *Journal of Food Protection* **62**, 986-993.

Juneja,V.K., Foglia,T.A. and Marmer,B.S. (1998) Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*. Effect of pH, acidulant, and growth temperature. *Journal of Food Protection* **61**, 683-687.

Landa, I. Isotermal varmebehandling av *Bacillus pumilus* sporer. Masteroppgave 2008.

- Linton,R.H., Pierson,M.D. and Bishop,J.R. (1990) Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. *J. Food Prot.* **53**, 762-766.
- Linton,R.H., Webster,J.B., Pierson,M.D., Bishop,J.R. and Hackney,C.R. (1992) The Effect of Sublethal Heat-Shock and Growth Atmosphere on the Heat-Resistance of *Listeria monocytogenes* Scott-A. *Journal of Food Protection* **55**, 84-87.
- Lorentzen,G., Ytterstad,E., Olsen,R.L. and Skjerdal,T. (2010) Thermal inactivation and growth potential of *Listeria innocua* in rehydrated salt-cured cod prepared for ready-to-eat products. *Food Control*
- Lou,W.Q. and Yousef,A.E. (1996) Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *Journal of Food Protection* **59**, 465-471.
- Mattilsynet. Rapport etter funn av *Listeria monocytogenes* ved Varø gardsmeieri- Saksnr: 07 / 77317- 1 400522. 2007.
- Miller,F.A., Brandao,T.R.S., Teixeira,P. and Silva,C.L.M. (2006) Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology* **112**, 261-265.
- Miller,F.A., Gil,M.M., Brandao,T.R.S., Teixeira,P. and Silva,C.L.M. (2009) Sigmoidal thermal inactivation kinetics of *Listeria innocua* in broth: Influence of strain and growth phase. *Food Control* **20**, 1151-1157.
- Muriana,P.M., Hou,H.Y. and Singh,R.K. (1996) A flow-injection system for studying heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg. *Journal of Food Protection* **59**, 121-126.
- Murray,E., Webb,R.A. and Swann,M.B.R. (1926) A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed *bacillus*, *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol* **52**, 306-311.
- Pagan,R., Condon,S. and Sala,F.J. (1997) Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3225-3232.
- Patel,J.R. and Beuchat,L.R. (1995) Evaluation of Enrichment Broths for Their Ability to Recover Heat-Injured *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 366-372.
- Peleg,M. and Cole,M.B. (1998) Reinterpretation of Microbial Survival Curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **38**, 353-380.
- Pirie,J.H.H. (1940) *Listeria*. Change of name for a genus of bacteria. *Nature* **145**, 264.
- Rowan,N.J. and Anderson,J.G. (1998) Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2065-2071.

- S.J.Walker, P.Archer and J.G.Banks (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Microbiology* **68**, 157-162.
- Schmid,M.W., Ng,E.Y.W., Lampidis,R., Emmerth,M., Walcher,M., Kreft,J., Goebel,W., Wagner,M. and Schleifer,K.H. (2005) Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 1-18.
- Seeliger,H.P.R. (1981) Non-Pathogenic *Listeriae* – *Listeriae innocua* Sp-N (Seeliger et Schoofs, 1977). *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Series A-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology* **249**, 487-493.
- Smith,J.L. and Archer,D.L. (1988) Heat-Induced Injury in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology* **3**, 105-110.
- Smith,J.L. and Marmer,B.S. (1991) Temperature Shift Effects on Injury and Death in *Listeria monocytogenes* Scott-A. *Journal of Food Safety* **11**, 73-80.
- Smith,J.L., Marmer,B.S. and Benedict,R.C. (1991) Influence of Growth Temperature on Injury and Death of *Listeria-Monocytogenes* Scott A During A Mild Heat-Treatment. *Journal of Food Protection* **54**, 166-169.
- Sorqvist,S. (1994) Heat-Resistance of Different Serovars of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 383-388.
- Sumner,S.S., Sandros,T.M., Harmon,M.C., Scott,V.N. and Bernard,D.T. (1991) Heat-Resistance of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in Sucrose Solutions of Various Water Activities. *Journal of Food Science* **56**, 1741-1743.
- van Boekel,M.A.J.S. (2002) On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 139-159.
- Walsh,T.J., Venanzi,W.E. and Dixon,D.M. (1985) Quantification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata* by a spiral inoculation system: Correlation with pour plate and spread plate methods. *Journal of Clinical Microbiology* **22**, 745-747.

## 7.0 Appendiks

---

### 7.1 Medier

TSAYE – ”Tryptic soy agar med 0,6 % gjærekstrakt”

20g TSA [Oxoid CMO131]

3g gjær [Merck 1.03353.0500]

500 ml Elixvann

- Blandes med magnetrører.
- Autoklaveres ved 121 °C i 15min.
- Støpes i 10 cm skåler.
- Oppbevares ved 4 °C.

TSBYE – ”Tryptic soy broth med 0,6% gjærekstrakt”

15g TSB [Oxoid CMO129]


3g gjær [Merck1.03353.0500]

500 ml Elixvann

- Blandes med magnetrører.
- Autoklaveres ved 121 °C i 15min.
- Oppbevares ved 4 °C.

## 7.2 EDDY JET Utplatingsvolumer

**Tabell 7.1 Avsatt volum for EDDYJET i de ulike segmentene.**



**TABLE OF VOLUME (µl) FOR DIFFERENT SPIRAL SPREADINGS (100mm PLATE)**

	(0) E Mode 50µl	(1,17) C Mode & FAST 40µl	(2) C Mode 100µl	(3) D Mode 49,2µl	(4) D Mode 50µl	(5,13) Exp. & Slow 3000 Mode 50µl	EDDY JET
3c	2.56	1.52	4.56	2.16	3.00	1.16	3c
3c+3b	6.44	3.96	11.52	5.48	7.00	4.72	3c+3b
3c+3b+3a	12.08	7.68	21.52	10.56	13.20	10.08	3c+3b+3a
3+4c	20.36	13.36	35.92	18.28	22.00	18.28	3+4c
3+4c+4b	32.32	22.00	56.80	30.00	34.00	30.12	3+4c+4b
3+4c+4b+4a	50.00	37.30	92.20	49.20	50.00	50.00	3+4c+4b+4a

(15,16)

For utplatingene utført i denne oppgaven ble det benyttet D-mode med 49,2µl utplattet suspensjon. Tabellen viser volumet utplattet i de ulike segmentene på hele skålen. Man må derfor dele volumet på 4 fordi segmentene tilsvarer bare ¼ av arealet til skåloverflaten. Hvis man for eksempel har telt kolonier i segment 3c+3b+3a må man dele på 21,52/4. Det deles på 4 fordi 21,52 µl er volumet satt av rundt hele skålen i segmentene 3c+3b+3a.

## 7.3 Annet utstyr

### Vannbad:

Lauda Ecoline Staredition E300 O12

Grant - Grant Instruments

### Koloniteller:

Stuart- Colony Counter SC6

### Temperaturloggingsutstyr:

E+E Elektronik- EE31