

Maja Sigerseth Jacobsen

# Overlevelse av *Salmonella enterica* serovar Agbeni og *Salmonella enterica* serovar Typhimurium på tørket frukt og nøtter.

Masteroppgave i Industriell kjemi og bioteknologi

Veileder: Lisbeth Mehli

Juni 2020



# Forord

Denne masteroppgaven, på 30 studiepoeng, er en individuell besvarelse som avslutning på den 2-årige mastergradutdanningen i industriell kjemi og bioteknologi, ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Arbeidet med oppgaven utgjorde det fjerde semesteret av utdanningen og ble avsluttet i juni 2020. Labarbeidet i denne masteroppgaven ble utført på laboratorier ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, Akrinn, campus Kalvskinnet, Trondheim.

Etter forberedelser og planlegging hadde belastningsforsøket akkurat kommet i gang når COVID19 og pandemien førte til et lukket campus og universitet. Det førte til omorganisering av det praktiske arbeidet, og bare minimum av arbeidet som opprinnelig var planlagt ble gjennomført. Det ble færre uttak i lagringsperioden enn planlagt. Identifiseringsarbeid med bakteriekolonier, samt kvantifisering av *Salmonella* med real-time PCR, var ikke gjennomførbart i på grunn av smittevernberedskap ved NTNU. Instituttet var likevel velvillig til at noe praktisk arbeid kunne utføres under streng kontroll.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder Lisbeth Mehli for god veiledning og kontinuerlig oppmuntring gjennom hele perioden. Jeg vil også takke medstudenter for selskap, både på og utenfor laboratoriet, samt flere verdifulle diskusjoner. Tilslutt vil jeg takke familie, venner og kjæreste for deres tålmodighet og støtte i alle disse årene.

Maja Jacobsen

Trondheim, Juni 2020

## Sammendrag

Tørket frukt og nøtter har lav vannaktivitet ( $a_w$ ), og de fleste bakterier kan ikke vokse i slike omstendigheter. Noen matbårne patogener, slik som *Salmonella*, kan imidlertid overleve i flere måneder i mat med lav  $a_w$  ved introduksjon inn i produktene. Dette kan utgjøre en betydelig risiko for utbrudd av salmonellose. Denne studien ble utført for å vurdere *Salmonella* sin evne til å overleve på tørkede kokosterner, ananasterner, rosiner og mandler, påvirket av serotype og inokulumkonsentrasjon. Produktene i denne studien ble valgt på grunn av at de har ulik kjemisk sammensetning (vann, karbohydrater, fett, proteiner osv.), samt etter forslag fra en kommersiell aktør.

Vannaktiviteten og pH-verdien til alle produktene ble målt, siden dette er faktorer som kan påvirke overlevelsen av *Salmonella*. Før inokulering ble den mikrobiologiske kvaliteten til produktene undersøkt. Det ble ikke påvist *Salmonella* i noen av produktene. De enkelte produktene ble deretter inokulert med høy og lav konsentrasjon (hhv. 6 og 3 log CFU/ml) av både *Salmonella enterica* serovar Agbeni og *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Etter de hadde fått tørke ble prøvene lagret ved 22 °C i totalt 82 dager, og analysert for tilstedeværelse av bakteriene etter 33 dager, 61 dager og 82 dager.

S. Typhimurium ble ikke observert i noen av de inokulerte produktene. S. Agbeni ble derimot påvist i mandler ( $a_w$  0.31, pH 6.38) etter 61 dager, men ikke 82 dager. I kokosterner ( $a_w$  0.45, pH 6.23) ble S. Agbeni påvist etter 33 dager, men ikke 61 dager. Serotypen ble ikke påvist i ananas ( $a_w$  0.50, pH 4.30) og rosiner ( $a_w$  0.37, pH 3.87). Det var ikke signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) på overlevelsen av *Salmonella* fra høy og lav inokulumkonsentrasjon.

Funnene understreker behovet for å sikre at denne typen produkter ikke inneholder S. Agbeni, og at kontaminering ikke skjer under prosessering. De viser også at ikke alle serotyper av *Salmonella* overlever like godt på ulike typer tørket frukt og nøtter. De unike overlevelsesegenskapene til S. Agbeni, sammenliknet med S. Typhimurium, fremhever behovet for tilstrekkelige strategier som skal forhindre høyrisiko serotyper i matindustrien.

## Abstract

Dried fruits and nuts have a low water activity ( $a_w$ ) and most bacteria can not grow under these circumstances. However, some pathogenic bacteria, such as *Salmonella*, can survive for months in low- $a_w$  food if they are introduced into the products. If they are contaminated, these products may pose a risk to consumers. This thesis examines the ability of *Salmonella* to survive on dried coconut, pineapple, raisins and almonds, affected by serotype and inoculum concentration. The products were chosen based on their differences in chemical composition (water, fats, carbohydrates, protein etc.), as well as suggestions from a distributor of these types of products.

The water activity and pH-value of the products were analyzed, since these are factors that might affect the survival of *Salmonella*. Prior to inoculation, there was a microbiological examination of the products. *Salmonella* was not detected in any of the products. The products were then inoculated with a high and low concentration, respectively 6 and 3 log CFU/ml, of *Salmonella enterica* serovar Agbeni and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. After drying, the inoculated products were stored at 22 °C for up to 82 days. *Salmonella* was then enumerated from the samples three times, after 33, 61 and 82 days.

S. Typhimurium were not observed in any of the inoculated products. S. Agbeni, on the other hand, were identified in almonds ( $a_w$  0.31, pH 6.38) after 61 days but not 82 days, and in dried coconut ( $a_w$  0.45, pH 6.23) after 33 days but not 61 days. S. Agbeni were not found in dried pineapple ( $a_w$  0.50, pH 4.30) and raisins ( $a_w$  0.37, pH 3.87). There was no statistically significant difference ( $p < 0,05$ ) in survival of *Salmonella* from high and low inoculum concentration.

These findings emphasize the importance of avoiding the contact of these fruits with contaminated surfaces after processing. They also show that the survival on these products can be serotype dependent. The unique survival characteristics of S. Agbeni versus S. Typhimurium highlight the need for adequate strategies to prevent high-risk serotypes in the food industry.

## Liste over forkortelser

BHI	Brain Heart Infusion
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Colony Forming Unit
FHI	Folkehelseinstituttet
LB	Luria Bertani
MLCB	Mannitol Lysine Crystal violet Brilliant green
MSIS	Meldingssystem for smittsomme sykdommer
NMKL	Nordisk metodikkomité for næringsmidler
OD	Optical Density
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
RVS	Rappaport-Vassiliadis Soya peptone
TSB	Tryptic soy broth
UV/Vis	Ultraviolet–Visible spectroscopy
VBNC	Viable but nonculturable
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate

# Innholdsfortegnelse

Forord . . . . .	i
Sammendrag . . . . .	ii
Abstract . . . . .	iii
Liste over forkortelser . . . . .	iv
1 Introduksjon . . . . .	1
2 Teoretisk bakgrunn . . . . .	3
2.1 <i>Salmonella</i> - nomenklatur, sykdom og kjennetegn . . . . .	3
2.2 <i>Salmonella</i> sin overlevelse i produkter med lav vannaktivitet . . . . .	5
2.3 Andre faktorer som påvirker overlevelse og vekst av <i>Salmonella</i> i mat . . . . .	7
2.3.1 Surhet og pH . . . . .	7
2.3.2 Temperatur . . . . .	7
2.3.3 Næringsinnhold og tilsetningsstoffer . . . . .	8
2.3.4 Serotypeavhengig overlevelse . . . . .	10
2.4 Mekanismer for motstandsdyktighet av <i>Salmonella</i> i produkter med lav vannaktivitet . . . . .	11
2.4.1 Krysstoleranse . . . . .	13
2.4.2 Filamentering . . . . .	13
2.4.3 Viable but nonculturable (VBNC) cells . . . . .	14
3 Materialer og metoder . . . . .	15
3.1 Utvalg av tørre produkter i denne studien . . . . .	15
3.2 Analyser av pH og vannaktivitet . . . . .	16
3.3 Mikrobiologiske analyser av produktene (nullprøve) . . . . .	16
3.3.1 NMKL metode nr. 91. Prøvetaking og forbehandling av mat og fôr for kvantitativ mikrobiologisk undersøkelse . . . . .	16
3.3.2 NMKL metode nr. 71. <i>Salmonella</i> - påvisning i næringsmidler . . . . .	17

3.3.3	Metode for deteksjon av <i>Staphylococcus aureus</i> og <i>Enterobacteriaceae</i> . . . . .	17
3.4	Serotyper av <i>Salmonella</i> brukt i denne studien . . . . .	18
3.5	Vekstforsøk med absorbansmåling og beregning av kimtall . . . . .	19
3.6	Forberedelse av inokulum og inokulering av prøvene . . . . .	19
3.7	Mikrobiologiske analyser av <i>Salmonella</i> fra inokulerte prøver	21
3.8	Statistiske analyser . . . . .	21
4	Resultater . . . . .	22
4.1	Vekstforsøk med absorbansmåling og beregning av kimtall . . . . .	22
4.2	Analyser av pH og vannaktivitet . . . . .	23
4.3	Mikrobiologisk kvalitet av produktene . . . . .	23
4.4	Overlevelse av <i>Salmonella</i> på tørkede kokosterner, ananasterninger, rosiner og mandler . . . . .	24
4.5	Statistiske analyser . . . . .	26
5	Diskusjon . . . . .	27
5.1	Forskjellen på de to serotypene . . . . .	27
5.2	Mikrobiologisk kvalitet . . . . .	28
5.3	Overlevelse av <i>S. Agbeni</i> og <i>S. Typhimurium</i> på de utvalgte produktene . . . . .	28
5.4	Inokulering og effekt av inokulumkonsentrasjon . . . . .	31
6	Konklusjon . . . . .	32
7	Forslag til videre arbeid . . . . .	33
	Bibliografi . . . . .	42



# 1 Introduksjon

Mattrygghet er viktig og innebærer at maten vi spiser ikke skal inneholde fremmedelementer, miljøgifter eller smittestoffer som gjør oss syke. Matbåren sykdom er en av de mest alvorlige helseproblemene i verden, og påvirker både folkehelse og utvikling. Selv om det finnes mange patogene bakterier som kan føre til matforgiftningsutbrudd, er det tydelig at infeksjoner forårsaket av *Salmonella* representerer en betydelig belastning i både utviklingsland og utviklede land. På verdensbasis anslås det at *Salmonella* er ansvarlig for 80,3 millioner tilfeller av matbåren sykdom (Majowicz et al., 2010).

Mat med lav  $a_w$  ( $a_w < 0,70$ ) ble tidligere ansett som mikrobiologisk trygg, siden bakterier ikke kan vokse under slike omstendigheter. Denne typen mat har imidlertid vist seg å være innblandet i økte antall tilbakekallinger og utbrudd av matbårne sykdommer (Farakos og Frank, 2014; Beuchat et al., 2013; Chitrakar et al., 2019). Den infeksjøs agens i flertallet av disse utbruddene og tilbakekallingene er *Salmonella* spp. (Farakos og Frank, 2014, s. 3). Tørket frukt og nøtter er produkter med lav  $a_w$  som har blitt assosiert med utbrudd av *Salmonella*. Fordi disse produktene ofte blir spist direkte, eller brukt som ingredienser i annen spiseklar snacks (f.eks. frokostblandinger, sjokoladebarer osv.), vil kun et lite antall celler være nok til å utgjøre en risiko for sykdom (Finn et al., 2013a).

De siste årene har det vært en økende mengde litteratur om overlevelsen til patogene bakterier i tørre produkter. Data fra tidligere studier har vist at *Salmonella* kan overleve på nøtter som mandler, peanøtter, pekannøtter, valnøtter og pistasjnøtter over lengre perioder (Uesugi et al., 2006; Kimber et al., 2012; Beuchat og Mann, 2010; Blessington et al., 2012). Det har også blitt vist at *Salmonella* kan overleve lenge på ulike typer tørket frukt, som for eksempel kokos, tranebær, rosiner og jordbær (Meedeniya, 2009; Beuchat og Mann, 2014). Disse observasjonene, sammen med økte antall utbrudd, understreker behovet for å bedre forstå forholdene som påvirker overlevelse av *Salmonella* i tørkede frukt- og nøtteprodukter. Det kan gjøres ved en såkalt belastningsstudie. En mikrobiologisk belastningsstudie er en praktisk studie for å vurdere oppførselen til ønskede organismer, om de skulle være til stede i et produkt. Det innebærer at man bevisst inokulerer produktet med en organisme. Produktet blir deretter lagret og testet for disse organismene i løpet av et bestemt tidsintervall.

Målet med denne studien er å evaluere overlevelsen av *Salmonella* på overflaten av mandler, tørket ananas, rosiner og tørket kokos som er (i) inokulert med to forskjellige konsentrasjonsnivåer og (ii) inokulert med to ulike serotyper av *Salmonella enterica*: *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium. Våren 2019 var det et sykdomsutbrudd i Norge, som stammet fra en tørket fruktmix, og utbruddet omfattet 56 smittetilfeller med *Salmonella* Agbeni (Mattilsynet, 2020). Det er derfor interessant å inkludere denne serotypen i belastningsstudien.

S. Agbeni er en sjelden serotype og i perioden 2010-2018 var det kun registrert fem enkelttilfeller i databasen til nasjonalt referanselaboratorium for enteropatogene bakterier ved Folkehelseinstituttet (FHI) (Mattilsynet, 2020). Det er også beskrevet få utbrudd med denne varianten fra andre land. I 2011 var det 8 tilfeller av S. Agbeni i Canada fra ukjent kilde (Taylor et al., 2012). I 2017 var det 76 tilfeller av S. Agbeni i USA knyttet til skilpadder (Koski et al., 2018), og i 2018 var det 7 tilfeller i USA, assosiert med konsum av rå kakemix (Ladd-Wilson et al., 2019). *Salmonella* Typhimurium er derimot en vanlig serovariant som utgjør, sammen med *Salmonella* Enteritidis, ca. 70% av samtlige ikke-tyfoide isolater av *Salmonella* i Norge (Folkehelseinstituttet, 2019).

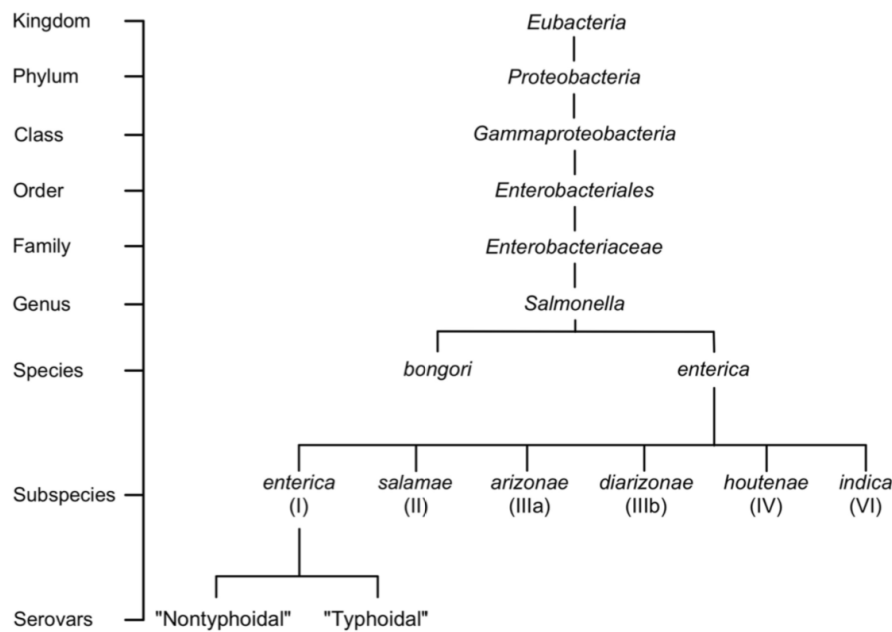
Noen serotyper av *Salmonella* er mer utbredt i spesifikke matprodukter enn andre (Andino og Hanning, 2015). Dette fenomenet er ikke helt forstått, men flere studier foreslår at *Salmonella* reagerer på en serotypeavhengig måte på stressfaktorer i mat, slik som forskjeller i temperatur, kjemikalier og næringsstoffer (González-Gil et al., 2012; Lianou og Koutsoumanis, 2013; Andino et al., 2014). Produktene i denne studien ble valgt på bakgrunn av at de har ulik kjemisk sammensetning (vann, karbohydrater, fett, proteiner osv.). Valget ble også påvirket av forslag fra en kommersiell aktør. Belastningsstudien skal forsøke å gi svar på om det er forskjell på overlevelsen av de to serotypene, hvilke produkter som gir mest optimale forhold for overlevelse av *Salmonella*, og hvilken rolle inokulumkonsentrasjonen spiller på overlevelsen.

## 2 Teoretisk bakgrunn

De vanligste infeksjonene som overføres via næringsmidler i Norge i dag skyldes *Campylobacter*, *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia* og *Listeria*, i tillegg til de tradisjonelle matforgiftningsbakteriene *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* og *Staphylococcus aureus* (Folkehelseinstituttet, 2018). Ikke alle de nevnte bakteriene kan overleve like godt i mat med lav vannaktivitet. Selv om noen sporedannende matbårne patogener er i stand til å overleve veldig lenge i matvarer med lav vannaktivitet (f.eks. *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* og *Clostridium botulinum*), må disse mikroorganismene formere seg til relativt høye bestander før de er i stand til å produsere giftstoffer som forårsaker sykdom (Chitrakar et al., 2019). Antall utbrudd av *Salmonella* viser at det er denne bakterien som er mest bekymringsverdig i tørre matprodukter (Farakos og Frank, 2014, s. 25).

### 2.1 *Salmonella* - nomenklatur, sykdom og kjennetegn

*Salmonella* er en slekt i familien *Enterobacteriaceae*, som er en familie av gram-negative, fakultativt anaerobe og stavformede bakterier. De fermenterer glukose og andre sukkerarter, reduserer nitrat til nitritt og produserer katalase. Familien inkluderer også andre slekter enn *Salmonella*, slik som *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Shigella* spp. og *Yersinia* spp. (Bennett et al., 2015, s. 2503). Slekten *Salmonella* består av to arter, *Salmonella enterica* og *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* er den vanligste årsaken til gastroenteritt (Percival og Williams, 2013). Arten er delt inn i seks underarter: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* og *indicia* (figur 1). Underartene består av mer enn 2500 ulike serotyper som baserer seg på deres spesifikke antigene struktur. Dette gjør at samme art kan forårsake ulike symptomer (Gal-Mor et al., 2014; Blackburn og McClure, 2002). *S. Enteritidis* og *S. Typhimurium* er de to serotypene som forekommer mest i Norge (Folkehelseinstituttet, 2019). Hver serotype kan igjen ha flere ulike varianter. Fagtyping kan brukes til å typebestemme visse bakterier, ved hjelp av de bakteriofagene som lever i dem. Fagtyping kan være nyttig ved matforgiftningsubrudd, siden det bidrar til smitteutredning (Humphrey, 2004).



**Figur 1: *Salmonella* sin taksonomi og generelle klassifikasjoner.** Slekten *Salmonella* er klassifisert i arter, underarter og serotyper basert på White-Kauffman-Le Minor-ordningen. Serotypene av *Salmonella enterica* deles ofte inn i tyfoide og ikke-tyfoide, denne referansemetoden er imidlertid ikke en del av den offisielle *Salmonella*-klassifiseringsordningen. (MacKenzie et al., 2017)

*Salmonella* kan påvirke et stort antall individer fra en enkelt matkilde (Blackburn og McClure, 2002, s. 307). De viktigste smittekilene av *Salmonella* på verdensbasis er fjørfekjøtt, svinekjøtt og egg. Likevell vil bakterien kunne dukke opp i nær sagt hvilket som helst næringsmiddel på grunn av sin evne til å overleve, vokse og spre seg i miljøet og produksjonskjeden (Granum, 2015, s. 102). Infeksjoner forårsaket av *Salmonella*, også kalt salmonellose, kan føre til akutt gastroenteritt, eller sjeldnere bakteriemi og enterisk feber.

Gastroenteritt er en infeksjon i tykktarmen som vanligvis oppstår 18–48 timer etter inntak av *Salmonella*. Sykdomsbildet er preget av diaré, feber og magesmerter. Infeksjonen er vanligvis selvbegrensende og varer 2-5 dager, men kan i sjeldne tilfeller være langvarig og alvorlig. Enterisk feber skyldes blodforgiftning med bakterieinvasjon fra tarmen med *S. typhi* eller *S. paratyphi* A, B og C (Percival og Williams, 2013, s. 209-222). I motsetning til alle *Salmonella*-variantene som gir opphav til salmonellose er *S. typhi* og *S. paratyphi* spesifikt patogene for mennesker. Smitten vil derfor alltid komme direkte eller indirekte fra en person (Granum, 2015, s. 108). Tyfoidfeber og paratyfoidfeber kan gi et likt sykdomsbilde, men tyfoidfeber er mer alvorlig grunnet høyere dødelighetsrate (Percival og Williams, 2013, s. 209-222).

Alle tilfeller av salmonellose har vært nominativt meldepliktig til Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) siden 1975 (Folkehelseinstituttet, 2019). De forbedrede metodene for å undersøke matbårne sykdommer, sammen med fremskritt i samlingen og delingen av matforgiftningsstatistikker mellom land, har hjulpet å identifisere kildene til mange av disse organismene. Dette har også tydelig vist at *Salmonella* er en av de viktigste årsakene til matbårne sykdomsutbrudd på verdensbasis (Blackburn og McClure, 2002, s. 307).

## 2.2 *Salmonella* sin overlevelse i produkter med lav vannaktivitet

Tørking er en tradisjonell metode som i lang tid har blitt brukt til preservering av mat, siden lavere vanninnhold gir lengre holdbarhet (Finn et al., 2013a). Tilgjengeligheten av vann til mikroorganismer i næringsmidler blir uttrykt ved hjelp av  $a_w$ . Verdien gis som forholdet mellom vandamptrykket over en prøve ( $p$ ) og vandamptrykket over rent vann ( $p_0$ ), ved en gitt temperatur (formel 1) (Coultate, 2016, s. 400).

$$a_w = p/p_0 \tag{1}$$

Vannaktiviteten er viktig fordi den er med på å kontrollere mikrobiologisk vekst. Mikroorganismer stiller ulike krav til  $a_w$  for å kunne vokse, og generelt vil lav  $a_w$  i en matvare gjøre levevilkårene vanskelige. Bakterier, sopp og mugg kan ikke formere seg i produkter hvor  $a_w$  er under deres minimumskrav (Coultate, 2016, s. 401). *Salmonella* vil ikke vokse i mat med en  $a_w$ -verdi under 0,93 (Bailey et al., 2009). Selv om mikroorganismer ikke kan formere seg ved lav  $a_w$ , vil vegetative celler og sporer kunne forbli levedyktige i flere måneder dersom de blir introdusert inn i råvarene (Beuchat og Mann, 2014).

På grunn av lav vannaktivitet ( $a_w$ ) har tørkede produkter hatt et relativt godt rykte med hensyn på mattrygghet. Enkelte patogene bakterier har imidlertid evnen til å overleve i tørre omgivelser i lengre perioder. Betydelig mattrygghetsrisiko vil derfor kunne oppstå dersom det skjer en forurensning etter et dødelig prosesseringstrinn. Dette gjelder spesielt for mat som spises direkte, uten noen form for varmebehandling eller ekstra inaktiveringstrinn, slik som for eksempel tørket frukt og nøtter. Flere av de rapporterte matbårne utbruddene forbundet med mat med lav  $a_w$  involverer *Salmonella* (Farakos og Frank, 2014). I en undersøkelse, angående forurensning av *Salmonella* i mat med lav  $a_w$ , rapporterte Podolak et al. (2010)

at dårlig sanitærpraksis, lite fasiliteter, dårlig utstyrsdesign, feil ved vedlikehold og dårlig kontroll av ingredienser er hovedårsakene til kontaminering.

Den estimerte infeksjonsdosen av *Salmonella* er dokumentert til å være svært varierende. Det er stor sannsynlighet for infeksjon fra doser  $> 10^5$ , men fra mat som inneholder et høyt innhold av fett og/eller protein (f.eks. sjokolade og ost) kan det skje en infeksjon ved inntak av  $< 10$  til 100 celler (Teunis et al., 2010). En frivillighetsstudie indikerte at smittedosen for 5 ulike serovarer av *Salmonella* var  $10^5$ - $10^6$  organismer (Kothary og Babu, 2001). Fra tidligere utbrudd av *Salmonella* fra sjokolade, som har et høyt fettinnhold, har det blitt dokumentert at lave mengder celler var til stede i de forurensede produktene (Greenwood og Hooper, 1983; Kapperud et al., 1990; Werber et al., 2005). Teoretisk sett kreves det bare at en levedyktig *Salmonella*-bakterie når tynntarmen og begynner den raske multiplikasjonen for å gi symptomer (Greenwood og Hooper, 1983).

Mengden av bakterieceller som er nødvendig for å forårsake infeksjon hos mennesker påvirkes av flere faktorer. En faktor er graden av resistens hos verten, som er svekket hos barn, eldre og personer som har immunsuppressive sykdommer eller som får immunsuppressiv behandling. Andre faktorer er innholdet i maten og den fysiologiske tilstanden til bakteriecellene. For eksempel kan *Salmonella* som har blitt forhåndseksponert for høye konsentrasjoner av syre være i bedre stand til å motstå påfølgende eksponering for magesyre. Det samme kan gjelde for celler som har vært eksponert for høye temperaturer, som kan oppstå som en konsekvens av ufullstendig tilberedning (Humphrey, 2004). Det er også mulig at høye mengder fett, slik som i for eksempel sjokolade, kan beskytte *Salmonella* mot magesyren. Dette vil kunne gjøre det lettere for cellene å passere gjennom og kolonisere den nedre delen av mage-tarmkanalen (D'Aoust, 1977).

## 2.3 Andre faktorer som påvirker overlevelse og vekst av *Salmonella* i mat

Faktorer andre enn  $a_w$  som kan påvirke overlevelse og vekst av *Salmonella* i mat kan være surhet og pH, konkurrerende mikroflora, naturlig eller tilsatte antimikrobielle stoffer, temperatur, lagringsforhold, emballasje (Bailey et al., 2009, s. 110), produkt-sammensetning og serotype (Farakos og Frank, 2014). *Salmonella* har blitt vist å kunne tilpasse seg ekstreme miljøforhold, og har et komplekst reguleringsystem som responderer på det ytre miljøet. Stressresponser i *Salmonella* blir kontrollert av et utvalg av regulatorer. Disse regulatorene vil til slutt resultere i et økt og/eller redusert uttrykk for et sett med gener, som både er unike for den spesifikke stress-responsen, og overlapper med andre stressresponser (Spector og Kenyon, 2012). Et godt eksempel på slike regulatorer er sigmafaktorer, som endrer spesifisiteten til RNA polymerase. Noen av disse sigmafaktorene gir økt transkripsjon for å produsere stressproteiner. Disse proteinene øker sjansen bakterien har til å overleve miljøendringer/stress. RpoS (RNA polymerase S) er den mest studerte. RpoS blir produsert hovedsaklig som en respons på sult, men er også involvert i respons på endringer i pH og temperatur (Humphrey, 2004; Nickerson og Curtiss, 1977).

### 2.3.1 Surhet og pH

Den optimale pH-verdien for vekst av *Salmonella* er 6,5-7,5 (Chung og Goepfert, 1970; Bailey et al., 2009). Selv om dette er optimum, er de i stand til å vokse i surere miljø. Minimum pH-verdi hvor *Salmonella* er i stand til å opprettholde vekst er ikke definert og vil variere avhengig av serotype og inkubasjonstemperatur (Chung og Goepfert, 1970). Studien til Chung og Goepfert (1970) ga vekst av *Salmonella* ved pH-verdier så lav som  $4,05 \pm 0,05$ .

### 2.3.2 Temperatur

De fleste serotyper av *Salmonella* vokser ved et temperaturområde på 5–47 °C, med optimaltemperatur på 35–37 °C. De er følsomme for varme, og drepes vanligvis ved temperaturer  $\geq 70$  °C (Graziani et al., 2017, s. 133-169).

Generelt øker varmebestandigheten til *Salmonella* med redusert  $a_w$  (Podolak et al., 2010). Varmebestandigheten til *Salmonella* i produkter med lav fuktighet påvirkes imidlertid av mange faktorer. Disse inkluderer for eksempel tidligere påkjenning av varme eller syre, hvilken serotype man har av bakterien og komposisjon av maten (Doyle og Mazzotta, 2000). Shachar og Yaron (2006) studerte hvilke faktorer

som påvirker resistensen av *Salmonella* mot varme i peanøttsmør. De antydde at kombinasjonen av høyt fettinnhold og lav  $a_w$  i peanøttsmør hadde en beskyttende effekt. *Salmonella* i peanøttsmøret var motstandsdyktig mot varme, til og med ved en temperatur så høy som 90 °C.

Overlevelse av *Salmonella* er høyere ved kjøle- og frysetemperaturer. Belastningsstudien utført av Beuchat og Mann (2014) viste at dødeligheten av *Salmonella* på diverse typer tørket frukt var høyere ved 25 °C enn ved 4 °C. Studien til Beuchat og Heaton (1975) på pekannøtter og Uesugi et al. (2006) på mandler viste også at *Salmonella* overlevde lengre ved lavere temperaturer. Nøtter har relativt høyt fettinnhold og ideelt bør slike produkter lagres ved lavere temperaturer for å forhindre harskning. Problemet er at dette kan øke overlevelsen av mikroorganismer, inkludert matbårne patogener som *Salmonella* (Uesugi et al., 2006).

### 2.3.3 Næringsinnhold og tilsetningsstoffer

De fleste matprodukter er bederverlig og krever beskyttelse mot ødeleggelse under tilberedning, lagring og distribusjon for å gi dem ønsket holdbarhet. Matprodukter kan bli utsatt for forurensning av bakterier, sopp og mugg, men også endring av farge (Lucera et al., 2012). Farge er en viktig kvalitetsparameter siden den er avgjørende for at forbrukerne skal akseptere matprodukter (Deng et al., 2019), og mikrobiell vekst er et stort problem fordi det potensielt kan forårsake matbåren sykdom. For å forhindre vekst av ødeleggende og sykdomsfremkallende mikroorganismer, samt bevare fargen til matvarer, brukes det flere preservasjonsteknikker. Preservasjonsteknikkene kan innebære tilsetningsstoffer som for eksempel konserveringsmidler og antioksidanter (Lucera et al., 2012).

Bruningsreaksjoner er en gruppe enzymatiske og ikke-enzymatiske reaksjoner. Det er de enzymatiske reaksjonene som gir brun farge på diverse typer frukt. Når kuttet frukt har tilgang på oksygen, vil enzymet polyfenoloksidase katalysere oksidasjonen av fenolforbindelser til kinoner, som produserer brune pigmenter (Queiroz et al., 2008). Det anslås at enzymatisk bruning står for over 50% av tapene i frukt, og tropiske og subtropiske frukter er de mest utsatte for disse reaksjonene. Samtidig er denne bruningen ønsket for noen typer frukt, slik som for svsker og rosiner. (Whitaker og Lee, 1995, s. 2-7).



Siden brunig som regel reduserer ernæringsmessige og sensoriske egenskaper, er det utviklet flere teknikker og mekanismer for å kontrollere slik aktivitet. Forbehandling hjelper til med å forhindre at lysfarget frukt blir mørkere under tørking og lagring, og det fremskynder tørking av frukt med motstandsdyktige skall. Mest utbredt er svoveldioksid og sulfitter, men på grunn av skadelige helseeffekter forårsaket av disse forbindelsene er mengden strengt regulert i matvarer (Queiroz et al., 2008). I tillegg til at  $SO_2$  hemmer oksidativ brunig, begrenser det også biologisk aktivitet som for eksempel vekst av sopp, mugg og bakterier (Coultate, 2016, s. 312).

Forbehandling med organiske syrer er også mye brukt. Organiske syrer er naturlig forekommende forbindelser, som er til stede i mange matvarer med planteopprinnelse. Organiske syrer tilsettes ofte til matvarer som syrningsmidler, smaksstoffer eller konserveringsmidler og noen inaktiverer eller hemmer veksten av ødeleggende mikroorganismer (Oulkheir et al., 2015; Dipersio et al., 2004).

Eksempler på syrer som brukes til produksjon av tørket frukt er askorbinsyre, sitronsyre, fosforsyre og vinsyre (Somogyi et al., 1996, s. 49). Askorbinsyre (vitamin C) kan brukes til å kontrollere brunig av mat og fungerer som en antioksidant ved å redusere kinonene før de undergår sekundære reaksjoner som fører til brunig (McEvily et al., 1992). Syrene bidrar også til å senke pH og siden polyfenoloksidase-reaksjonene skjer ved pH lik 5-7,5, vil lavere verdier inhibere enzymatisk aktivitet og dermed hindre brunig (Queiroz et al., 2008). Syrene vil også kunne bidra til å hemme vekst av ødeleggende og sykdomsfremkallende mikroorganismer. Chung og Goepfert (1970) viste at flere organiske syrer, deriblant sitronsyre, virker bakteriostatisk mot *Salmonella* ved ulike pH-nivåer. Dipersio et al. (2003) viste at tilsetning av 0,21 prosent sitronsyre til Gala epler reduserte *Salmonella* med 0.7–1.1 Log CFU før dehydrering og lagring. Den samme effekten ble observert med askorbinsyre.

I tillegg til alt dette inneholder tørket frukt ofte høye mengder sukker på grunn av tilsetning til produkter, og/eller økt naturlig innhold av sukker på grunn av redusert vanninnhold. Data fra flere studier antyder at høye nivåer av sukrose kan ha en beskyttende effekt på død av *Salmonella* (Hiramatsu et al., 2005; Kotzekodou, 1998; Nummer et al., 2012).

### 2.3.4 Serotypeavhengig overlevelse

For å overleve plutselige og potensielt dødelige endringer i miljøene de møter, må bakterier som tidligere nevnt kunne føle og reagere på stress. Bakterielle matbårne patogener møter på mange stressfaktorer under matproduksjon, prosessering, lagring, distribusjon og tilberedning. Disse kan være pH, temperatur, oksygenmengde, tørking, næringsknapphet, konserveringsmidler og en rekke andre faktorer (Begley og Hill, 2015). Ulike serotyper, eller til og med forskjellige stammer innenfor en gitt serotype, kan reagere ulikt på forskjellige typer stress (Rychlik og Barrow, 2005; Begley og Hill, 2015). En studie av Lianou og Koutsoumanis (2013) undersøkte den ideoende syre- og varmemotstanden til 60 stammer tilhørende ulike serotyper. Resultatene demonstrerte tydelig at syre- og varmebestandigheten til *S. enterica* var stammespesifikk. Inaktiveringsraten varierte mer mellom stammene når de var utsatt for syre, enn når de ble utsatt for varme.

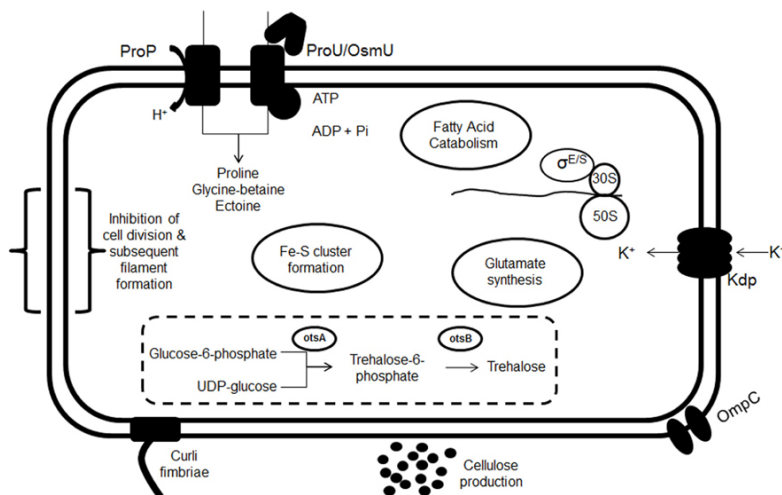
Det har i det siste vært en økende forekomst av uvanlige serotyper av *Salmonella* (f.eks. S. Hartford, S. Thompson og S. Tennessee) i mat med lav  $a_w$  (Fong og Wang, 2016). Mangfoldet av serotyper og stammer som er involvert i utbrudd assosiert med slike produkter, understreker behovet for å studere overlevelseskarakteristikken til disse (Fong og Wang, 2016; Finn et al., 2013a). Enkelte studier har derfor evaluert og sammenliknet overlevelsen av ulike serotyper av *Salmonella* i matprodukter med lav  $a_w$ .

En relativt ny studie av Fong og Wang (2016) viste at det var en serotype-spesifikk respons i de tre matproduktene som ble testet. Ut i fra de fem serotypene S. Hartford, S. Tennessee, S. Thompson, S. Enteritidis og S. Typhimurium, ble S. Hartford vist å være mest vedvarende i alle de tørre produktene. S. Typhimurium ble identifisert som den minst overlevelsesdyktige. Tilsvarende fant Farakos et al. (2014) signifikante forskjeller i overlevelsen av ulike serotyper av *Salmonella* i whey protein pulver. De som var mest overlevelsesdyktig var S. Tennessee og S. Agona, etterfulgt av S. Montevideo og S. Typhimurium i synkende rekkefølge. Ut i fra de nevnte studiene, og flere andre (Andino et al., 2014; González-Gil et al., 2012), er det tydelig at overlevelsessevnen til *Salmonella* kan være stamme- og serotypeavhengig.

## 2.4 Mekanismer for motstandsdyktighet av *Salmonella* i produkter med lav vannaktivitet

Til tross for omfattende studier på overlevelsesegenskapene til *Salmonella enterica* i ulike produkter/modellsystemer med redusert  $a_w$  (Beuchat og Mann, 2014; Shachar og Yaron, 2006; Hiramatsu et al., 2005; Gruzdev et al., 2011), er det mye som ikke er kjent om fysiologien til bakterien under tørking og sult. De underliggende molekylære mekanismene for overlevelse og utholdenhet i slike produkter er ikke fullstendig etablert.

Det er likevel kjent at serovarer av *S. enterica* har en rekke mekanismer som forsvaret mot skadelige effekter av tørking. Mens visse cellekomponenter kan bidra til å bremse tørkeprosessen og hindre fullstendig uttørking, ser andre ut til å opprettholde cellens levedyktighet, ved å beskytte membraner og proteiner. Allment antatte mekanismer for uttørkingstoleransen til *Salmonella* inkluderer: økt kaliumtilstrømning via kdp transporter, økt transport av osmobeskyttende molekyler ved hjelp av oppregulering av genene proP, proU og osmU, syntese av glutamat og trehalose, og oppregulering av sigma-faktorer (rpoE og rpoS) og fettsyrekatabolisme (figur 2) (Mandal og Kwon, 2017).



**Figur 2:** Oppsummering av responser som forekommer når en bakteriecelle introduseres inn i et miljø med lav  $a_w$ . Disse inkluderer økt opptak av  $K^+$ , transport av osmobeskyttende molekyler (proP, proU og osmU), syntese av glutamat og trehalose, oppregulering av RpoE and RpoS. Fe-S ansamlinger og økning i antall osmC-poriner er også observert. (Finn et al., 2013a)

Evnen til å tilpasse seg endringer i osmolariteten i det ytre miljø er av grunnleggende betydning for vekst og overlevelse. Prokaryote celler har derfor utviklet en rekke osmoadaptive strategier. Bakterier kan erfare osmotisk stress under en overgang til et hyperosmotisk miljø, eller på grunn av dehydrering. Endringer i osmolaritet utgjør en betydelig påkjenning på bakterieceller ved å enten forårsake svelling eller dehydrering og krymping (Sleator og Hill, 2002). Når bakterier utsettes for dehydrering, må de balansere det indre osmotiske trykket med det ytre miljøet for å holde seg levedyktige, og for å hindre at de avgir mer vann enn de burde (Finn et al., 2013a).

Den første responsen *Salmonella* har mot dehydrering er en økning i inntaket av kaliumioner ( $K^+$ ). To hovedtransportsystemer er ansvarlige for denne funksjonen: Trk, et konstitutivt lavaffinitetssystem og det raskt induserte Kdp-systemet, som har en høy affinitet til ( $K^+$ ) (Spector og Kenyon, 2012). For å opprettholde elektronøytraliteten øker cellen deretter mengden glutamat ved hjelp av glutamatsyntese. Denne prosessen katalyseres av to enzymer kalt glutamatdehydrogenase og glutamatsyntase (Csonka, 1989).

Ved pågående hyperosmotisk stress induseres trehalosesyntese av produktene fra otsAB-operon, og nivåene av  $K^+$  og glutamat begynner å synke. Trehaloseproduksjon er avhengig av den alternative sigmafaktoren RpoS for induksjon av otsAB (Kempf og Bremer, 1998). Trehalose ser ut til å hjelpe cellen med å opprettholde struktur, men også funksjonen til proteiner og membranlipider under langvarig tørking (Elbein et al., 2003; Furuki et al., 2009; Leslie et al., 1995). Trehalose antas å stabilisere membraner og proteiner ved hjelp av hydrogenbindinger, og i tillegg fungerer som et vannstatningsmolekyl. Slik forhindres skadelige reaksjoner og cellens struktur opprettholdes (Crowe et al., 1998; Leslie et al., 1995).

Andre osmobeskyttende molekyler som vil kunne hjelpe cellen å begrense tapet av vann er prolin, glycin-betain og ectoin. De beskytter cellen mot tørke, men også høye saltkonsentrasjoner. Gener involvert i opptaket av disse molekylerne inkluderer blant annet proP, proU og osmU (Finn et al., 2013b). Finn et al. (2013b) fant at proP var spesielt kritisk for overlevelsen av *S. Typhimurium* på en overflate av rustfritt stål.

Når glukose ledes mot trehaloseproduksjon, må celler skaffe energi til cellulære prosesser fra en alternativ kilde. Cellene trenger energi til for eksempel importen av osmobyttende molekyler. Det er blitt foreslått at celler henter denne energien ved fettsyrekatabolisme som er en svært kostnadseffektiv energikilde. Bakterien vil oppregulere gener involvert i nedbrytningen av fettsyrer, som igjen vil bidra med energi og økning av cellens osmotoleranse (Andino og Hanning, 2015; Finn et al., 2013a). Det har også blitt oppdaget en oppregulering av gener involvert i produksjonen av Fe-S-klynger ved uttørking. Den prosessen kan også være knyttet til cellens energibehov (Finn et al., 2013b).

#### 2.4.1 Krysstoleranse

Eksponering av bakterier til en type stress kan føre til krysstoleranse mot andre former for stress. Gruzdev et al. (2011) undersøkte toleransen til dehydrerte og ikke-dehydrerte *Salmonella*-celler mot en rekke stressfaktorer som NaCl, gallesalter, organiske syrer ved pH 3.0, tørr varme, UV-stråling og ulike sanitetsmidler. De tørkede cellene demonstrerte betydelig høyere toleransenivåer mot 9 av 10 testede stressfaktorer. Leyer og Johnson (1993) fant at eksponering av *S. Typhimurium* til svakt sure forhold (pH 5.8), økte toleransen til bakterien mot blant annet lavere pH-verdier, varme og salt.

#### 2.4.2 Filamentering

*Salmonella* og flere andre bakterier kan danne filamenter. Det er ukjent om dannelsen av filamenter er en overlevelsesstrategi eller en konsekvens av stress (Stackhouse et al., 2012). Under filamentering blir alle cellekomponentene replikert, men cellen deler seg ikke. Dette resulterer i en lang ansamling av partielle *Salmonella*-celler. Disse har vist seg å ha økt toleranse mot tørre omgivelser og høye temperaturforhold. Når cellene reintrodueres til forhold med høyere  $a_w$ , vil de filamenterte cellene kunne skille seg fra hverandre og danne individuelle celler (Jones et al., 2013).

Mattick et al. (2000) fant at *S. Enteritidis* og *S. Typhimurium* dannet filamenter når omgivelsene hadde lav  $a_w$ . Noen av disse filamentene var minst 200  $\mu\text{m}$  lang. Bruk av konvensjonelle mikrobiologiske kvantifiseringsteknikker vil kunne undervurdere det virkelige celletallet (CFU) dersom filamenter er tilstede, siden slike celler ikke danner kolonier på agar. Dersom filamenter forekommer i et matprodukt vil det derfor kunne true mattryggheten (Stackhouse et al., 2012).

### 2.4.3 Viable but nonculturable (VBNC) cells

Det var lenge antatt at en bakteriecelle var død da den ikke lenger var i stand til å vokse på rutinemessige kulturmedier. Siden pionerstudien av Xu et al. (1982) kom for over 35 år siden, har det vært en økende mengde litteratur fra forskere over hele verden, som dokumenterer eksistensen av en “viable but nonculturable (VBNC) state“ i en lang rekke bakterier.

Mange patogener, inkludert *S. Typhimurium*, men også ikke-patogener er kjent for å kunne bli VBNC. Det betyr at cellene går inn i en slags sovende tilstand, hvor de kan miste evnen til å danne kolonier på medium, men forblir levedyktig. Det kan være problematisk med tanke på påvisning av bakterier. Dersom det igjen blir gunstige betingelser for cellene, vil bakterieveksten gjenopprettes (Oliver, 2005).

Mange former for stress kan fremkalle denne tilstanden i bakterier, som for eksempel sult (Chmielewski og Frank, 1995), inkubasjon utenfor det normale temperaturområdet (Besnard et al., 2002), osmotisk stress (Wong og Wang, 2004) og lav pH (Cunningham et al., 2009).

### 3 Materialer og metoder

#### 3.1 Utvalg av tørre produkter i denne studien

Prøvene av tørket frukt i denne studien ble valgt på grunn av at de har ulik kjemisk sammensetning, samt etter forslag fra representanter for en kommersiell aktør. Næringsinnhold og hvilke tilsetninger som finnes i produktet er viktig informasjon siden det kan være med å påvirke overlevelsen av *Salmonella* (tabell 1).

Tørkede ananas- og kokosterninger, rosiner og mandler ble innhentet fra samme kommersielle aktør. Hvert produkt kom i en pakke på 1000 g og alle prøvene er tatt fra samme lotnummer (9268, 9284, 9263 og 9147). Produktene ble lagret ved romtemperatur frem til bruk.

**Tabell 1: Informasjon om innholdet i produktene.** Hvert produkt er presentert med deres prosentandel råvare, tilsetninger og næringsinnhold (fett, karbohydrat og protein per 100 g).

Produkt	Prosentandel råvare	Tilsetninger	Fett (g)	Karbohydrat (g)	Protein (g)
Kokosterninger	34 %	hvetestivelse glukose- fruktosesirup sukker dekstrose fortykningsmidler	21,4	60,0	2,3
Ananasterninger	51 %	sukker sitronsyre svoveldioksid	0,0	93,0	0,0
Rosiner XL mørke	min 99 %	solsikkeolje	0,5	75,5	3,1
Mandler	100 %	-	49,4	9,5	21,2

## 3.2 Analyser av pH og vannaktivitet

De enkelte produktene (10 g) ble tilsatt 100 ml avionisert vann. Etter 10 min, når produktene hadde blitt litt mykere, ble ca. 5 g overført til rør sammen med ca. 20 ml av vannet. Dette ble mikset ved hjelp av en Ultra-Turrax homogenisator (T25, Ika Works Inc., USA). Analyser av pH ble utført av en universal pH-elektrode (VWR International, LLC) koblet til et Meterlab PHM210 pH-meter (Radiometer, Copenhagen, DK).

Vannaktiviteten til produktene ble analysert som utført av Beuchat og Mann (2014), ved direkte måling med en vannaktivitetsmåler (Aqualab CX-2, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA).

## 3.3 Mikrobiologiske analyser av produktene (nullprøve)

Før produktene kunne infiseres med *Salmonella* måtte deres mikrobiologiske kvalitet undersøkes. Uinokulert prøve ble analysert for aerobe mesofile bakterier, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* og *S. aureus* ved hjelp av henholdsvis Plate Count Agar (PCA), NMKL metode nr. 71 og petrifilmer.

### 3.3.1 NMKL metode nr. 91. Prøvetaking og forbehandling av mat og fôr for kvantitativ mikrobiologisk undersøkelse

Denne metoden ble brukt sammen med PCA og de to 3M<sup>TM</sup> petrifilmene. To paralleller av hvert produkt ble brukt i undersøkelsene. Den primære fortynningen ( $10^{-1}$ ) ble laget i en stomacherpose, hvor ca. 10 g aseptisk utveid prøvemateriale ble fortynnet med peptonvann i forholdet 1:10. Peptonvannet ble laget av 8,5 g NaCl (LP0005, Oxoid), 1,0 g Pepton (LP0034, Oxoid) og 1000 ml destillert vann. Fortynningen ble homogenisert i 30 sek i en stomachermaskin (Masticator Homogenizer, IUL). Deretter ble det laget en 10-folds fortynningsrekke for hver prøve, ved å ta 1 ml fra den foregående fortynningen og blande med 9 ml peptonvann.



### 3.3.2 NMKL metode nr. 71. *Salmonella* - påvisning i næringsmidler

For analyse av *Salmonella* ble 25 g av alle prøvene pre-anrikt i 225 ml bufret peptonvann (CM0509, Oxoid) og inkubert ved 37 °C i 18 timer. Deretter ble 0,1 ml pre-anrikt prøve overført til det flytende selektive mediet Rappaport-Vassiliadis Soya peptone (RVS) broth (CM0866, Oxoid). RVS ble forvarmet til inkubasjonstemperatur før inkubasjon med prøve i 24 timer ved 42 °C.

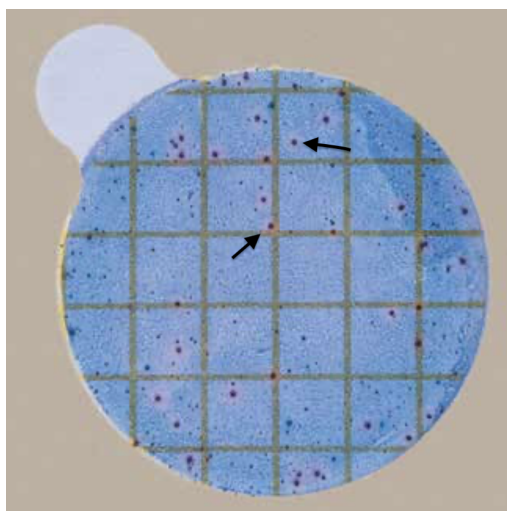
En steril loop ble brukt til å ta prøve fra RVS og inokulere overflaten på Xylose Lysin Deoxycholate (XLD) agar (CM0469, Oxoid). Platene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Deretter ble prosedyren gjentatt på Mannitol Lysine Crystal violet Brilliant green (MLCB) agar (CM0783, Oxoid), som også ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

XLD agar er et selektivt medium for isolering av *Salmonella* og *Shigellae* fra kliniske prøver og matvarer. Vekst av *Salmonella* gir røde kolonier med svart senter. MLCB agar er også et medium for isolering av *Salmonella* (ikke *Salmonella typhi* eller *Salmonella paratyphi A*). Selektiviteten til dette mediet er relativt svak, og mediets ytelse kan påvirkes negativt av sterkt forurensede prøver. På grunn av disse begrensningene bør MLCB agar ikke brukes alene, men sammen med XLD. *Salmonella* vokser som store lilla-svarte kolonier på grunn av  $H_2S$ -produksjon (Mooijman, 2012).

### 3.3.3 Metode for deteksjon av *Staphylococcus aureus* og *Enterobacteriaceae*

For kvantifisering av *S. aureus* og arter fra slekten *Enterobacteriaceae* ble det brukt petrifilmer fra 3M<sup>TM</sup>. Forbehandling og fortykning av prøvene ble utført i henhold til kapittel 3.3.1. Deretter ble 1 ml av fortykningene, som i dette tilfellet var -1 til -4, tilført petrifilmene.

3M<sup>TM</sup> Petrifilm Staph Express-systemet brukes til å telle DNase-positive *Staphylococcus*-arter i mat- og drikkeindustrien. Petrifilmen er selektiv og differensiell for *S. aureus*. Kolonier av *S. aureus* er rødfiolette. Dersom det er bakgrunnsflora tilstede, kan 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Staph Express Disk brukes til å identifisere *S. aureus*. DNA-et vil da reagere med toluidinblått og danne rosa soner som er lette å identifisere (figur 3) (3M Food Safety, 2020).



**Figur 3: Petrifilm for deteksjon av *Staphylococcus aureus* med 3M Petrifilm Staph Express Disk.** Kolonier med rosa soner telles som *S. aureus* (3M Food Safety, 2020).

3M™ Petrifilm™ *Enterobacteriaceae* Count Plates brukes til kvantifisering av *Enterobacteriaceae* i mat og drikke. Bakterier i familien *Enterobacteriaceae* vises som røde kolonier assosiert med gule soner, røde kolonier assosiert med gassbobler, eller røde kolonier assosiert med gule soner og gassbobler (Silbernagel og Lindberg, 2002).

### 3.4 Serotyper av *Salmonella* brukt i denne studien

To serotyper ble brukt i dette prosjektet: *Salmonella* Agbeni (VI61548) (levert av Gro Johannessen, seniorforsker, Veterinærinstituttet) og *Salmonella* Typhimurium (11732T) fra Culture Collection University of Gothenburg (CCUG).

*S. Agbeni*, isolert fra den utbruddsassosierte fruktmiksen som ble tilbakekalt i 2019, ble levert som en swab-kultur og deretter overført på XLD-agar. *S. Typhimurium* kom som frysetørrede celler. Disse ble tilsatt 1 ml Brain Heart Infusion (BHI) Broth, før 100  $\mu$ l ble overført til to rør med 5 ml BHI og to plater XLD. Deretter ble kulturene podet om fra XLD og BHI til nye XLD-plater. Bakteriene ble også frosset ned ved å tilsette TSB + 20 % glyserol (2,5 ml) til agarplatene, bruke en L-formet spreder til å løse opp koloniene og deretter tilsette ca. 1 ml av denne løsningen til rør som ble lagret ved -80 °C.

### 3.5 Vekstforsøk med absorbanmåling og beregning av kimtall

Det har tidligere blitt vist at det er mulig å finne en korrelasjon mellom kimtall (CFU/ml) og absorban (Kim et al., 2012). For å finne dette forholdet og bruke denne informasjonen videre i prosjektet, ble det utført et vekstforsøk med *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium. For hvert isolat ble en podeøse (1  $\mu$ l) med bakteriekolonier høstet fra Xylose Lysin Desoxycholate (XLD) agar (CM0469, Oxoid), overført til rør med 5 ml Luria Bertani (LB) broth og inkubert ved 37°C. LB-broth er et ofte brukt ernæringsrikt medium for dyrking av bakterier. Mediet som først ble først beskrevet av Bertani (1951) ble laget med 5 g gjærekstrakt (Oxoid, LP0021) og 15 g trypton water (Oxoid, CM0087), som tilsvarer 10 g trypton og 5 g NaCl.

Deretter ble absorbanen ( $OD_{600}$ ) av bakteriecellene i LB-broth målt hver andre time, i løpet av en 14 timers periode, ved bruk av et UV/VIS spektrofotometer (UV-1700, Shimadzu, Japan). En fortynningsrekke ble også laget hver andre time. Fortynningene fra  $10^{-4}$  til  $10^{-7}$  ble platet ut på PCA (CM0325, oxoid) for kvantifisering.

### 3.6 Forberedelse av inokulum og inokulering av prøvene

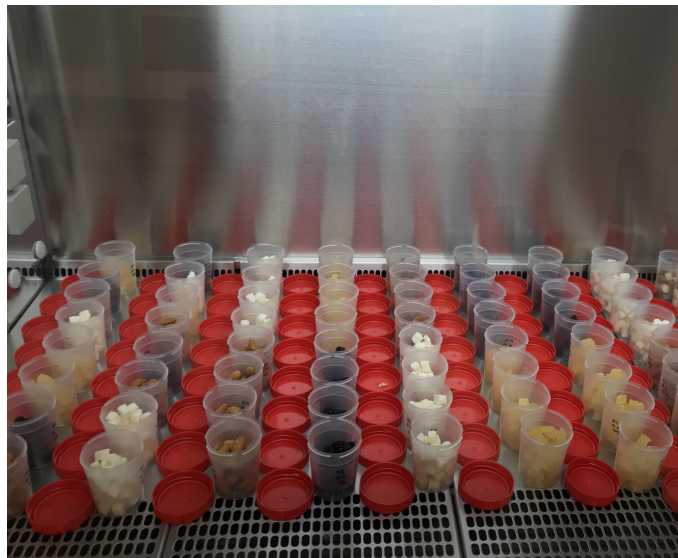
Mandler, tørkede kokosterner og ananasterner, samt rosiner ble inokulert med to serotyper av *Salmonella enterica*: *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium. S. Agbeni var årsaken til utbruddet i Norge våren 2019, og S. Typhimurium er en av de vanligste stammene i Norge.

Fra produsenten ble det foreslått å inokulere med to forskjellige konsentrasjoner, en høy og en lav. Den infektive dosen av celler angis ofte å være  $10^6$  (Granum, 2015, s. 108). Teunis et al. (2010) melder også om stor infeksjonsfare fra doser  $> 10^5$ . Høy dose ble derfor bestemt til  $10^6$  eller 6 Log CFU/ml per 45 g produkt. Den lave dosen ble bestemt til  $10^3$  eller 3 Log CFU/ml per 45 g.

Inokulumet ble laget ved å skrape celler fra XLD-agarplater og blande med peptonvann. Absorbanen ble målt og cellekonsentrasjonen ble justert til valgt høy og lav dose etter resultatene fra det innledende vekstforsøket (kap. 4.1). Formel 2 ble brukt til å regne ut hvor mye av det initielle inokulumet som krevdes for å danne 1 ml inokulum med de to sluttkonsentrasjonene.

$$C_1 + V_1 = C_2 + V_2 \quad (2)$$

Totalt 1 ml inokulum ble overført til sterile bokser (100 ml), aseptisk fylt med 45 g prøve. Boksene ble ristet manuelt i ca. 30 sekunder, til inokulumet var gjevnt fordelt og alle bitene av produkt var tydelig fuktig. Lokkene ble fjernet og prøvene fikk tørke i 24 timer, i henhold til belastningsstudien utført av Uesugi et al. (2006). Boksene med inokulerte prøver ble lagret mørkt i totalt 82 dager ved romtemperatur (22 °C). Det ble utført tre uttak med omtrent 2-3 ukers mellomrom.



**Figur 4: Inokulerte prøver.** Bokser med tørket kokos, ananas, rosiner og mandler ble inokulert med høy og lav konsentrasjon av *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium, og satt på tørk i sterilskap i 24 timer. Foto: Maja Jacobsen

### **3.7 Mikrobiologiske analyser av *Salmonella* fra inokulerte prøver**

Prøvene ble analysert for tilstedeværelse av bakteriene etter 33 dager, 61 dager og 82 dager. For hver prøve ble tre paralleller på ca. 10 g overført til en stomacherpose og fortynnet med peptonvann i forholdet 1:10. Dette ble homogenisert i en stomacher (Masticator Homogenizer, IUL) i ett minutt på 1500 rpm. En 10-folds fortynningsrekke med fem fortynninger ble laget for hver parallell. Fortynningene ble mikset med vortex (Fisherbrand) og 100  $\mu$ l ble overført på XLD-agar. Platene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer, før kvantifisering av kolonier.

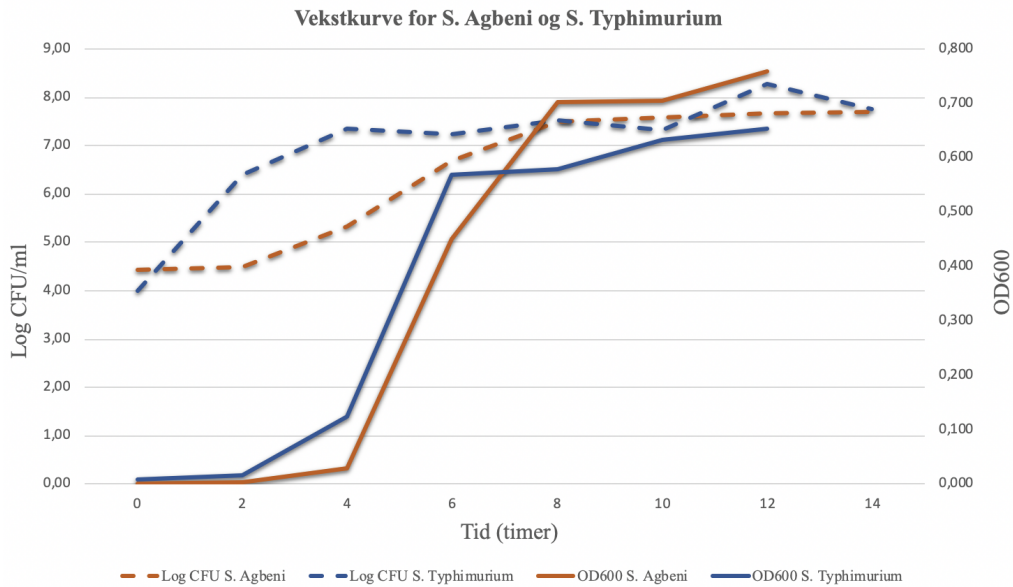
### **3.8 Statistiske analyser**

IBM SPSS Statistics versjon 26 ble brukt til analyser av oppsamlet data. Two way ANOVA (analysis of variance) ble brukt for å vurdere om det er signifikant forskjell ( $p < 0,05$ ) på kokos og mandler med hensyn på overlevelse av *S. Agbeni*, og om det er signifikant forskjell på høy og lav inokulumkonsentrasjon med hensyn på overlevelse av *S. Agbeni*.

## 4 Resultater

### 4.1 Vekstforsøk med absorbansmåling og beregning av kintall

Figur 5, med verdier fra vekstforsøket, gir viktig informasjon om korrelasjonen mellom absorbans ( $OD_{600}$ ) og kintall (Log CFU/ml) for *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium. Denne korrelasjonen ble brukt til preparering av inokulum. Figuren viser at 7 Log CFU/ml for *S.* Agbeni og 8 Log CFU/ml for *S.* Typhimurium gir en  $OD(600nm)$  lik 0,55 og 0,65. Ønsket inokulum ble regnet ut i fra disse verdiene.



**Figur 5: Vekstkurve for *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium.** Bakteriene ble lagret ved 37 °C i 24 timer og veksten uttrykt som OD ved 600 nm og korresponderende logtransformerte kintall (Log CFU/ml).

Vekst av *S.* Agbeni var generelt litt langsommere. *S.* Typhimurium og *S.* Agbeni nådde stasjonærfasen etter henholdsvis 6 og 8 timer (figur 5).

## 4.2 Analyser av pH og vannaktivitet

Vannaktiviteten til produktene varierte fra 0,31 for mandler til 0,50 for ananas, og pH-verdien varierte fra 3,87 for rosiner til 6,38 for mandler (Tabell 2).

**Tabell 2: Vannaktivitet ( $a_w$ ) og pH-verdi.** Verdiene fra målingene av  $a_w$  og pH til de enkelte produktene er avrundet til to desimaler.

Type	$a_w$	pH
Rosin	0,37	3,87
Ananas	0,50	4,30
Kokos	0,45	6,23
Mandler	0,31	6,38

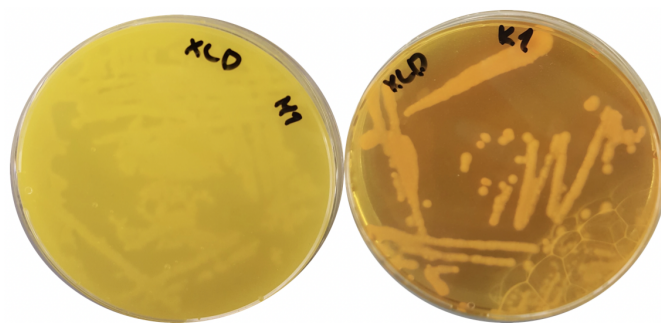
## 4.3 Mikrobiologisk kvalitet av produktene

Resultatene fra analysene av aerobe mesofile bakterier, *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* og *S. aureus* er presentert i tabell 3. Hverken *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, eller *Salmonella* ble detektert i produktene.

**Tabell 3: Mikrobiologisk kvalitet av produktene før inokulering med *Salmonella*.** Antallet er gitt i Log CFU/ml og som et gjennomsnitt av to paralleller. ID står for "ikke detektert".

Type	Totalantall			
	aerobe bakterier	<i>S. aureus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Salmonella</i>
Rosin	2,53	ID	ID	ID
Ananas	2,63	ID	ID	ID
Kokos	2,60	ID	ID	ID
Mandler	2,61	ID	ID	ID

Selv om det ikke befant seg *Salmonella* i noen av produktene, var det utypisk vekst på XLD-platene for prøvene av mandler og kokos (figur 6). Det var også vekst på MLCB-agar fra tilsvarende prøver.

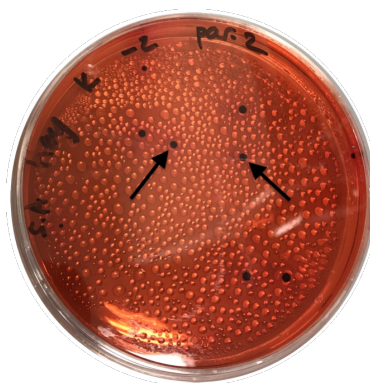


**Figur 6: Gulhvitt vekst på XLD.** Utypisk vekst fra kokos og mandler etter NMKL metode nr. 71 for påvisning av *Salmonella*. Foto: Maja Jacobsen

#### 4.4 Overlevelse av *Salmonella* på tørkede kokosterninger, ananasterninger, rosiner og mandler

De enkelte produktene ble inokulert med høy og lav inokulumkonsentrasjon av *S. Agbeni* og *S. Typhimurium*. Det var kun *S. Agbeni* som ble detektert i produktene og bakterien befant seg bare på kokos og mandler.

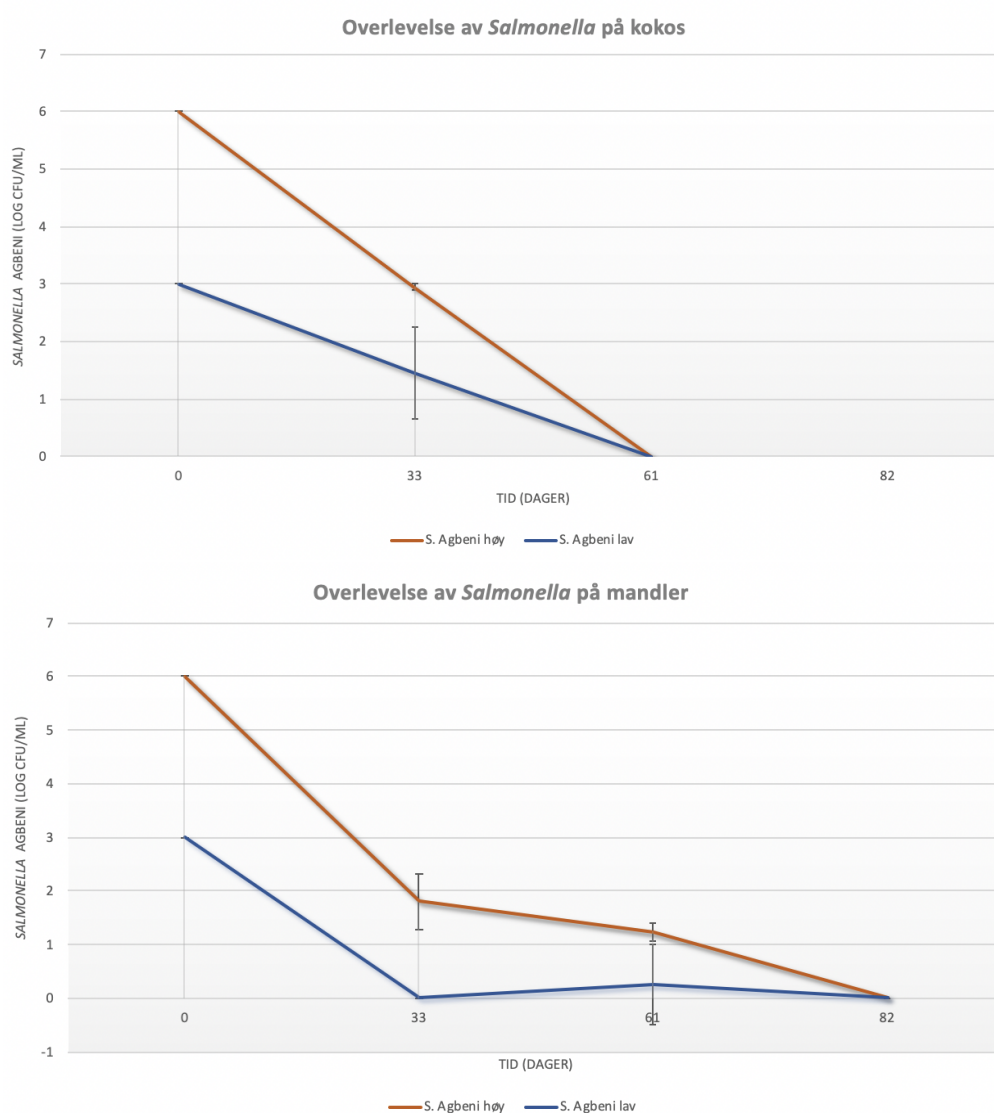
Det ble ikke påvist bakgrunnskolonier på noen av platene fra de inokulerte prøvene. Koloniene var lettgjennkjennelig som *Salmonella* på grunn av deres unike kolonimorfologi (sorte senter) på XLD (Figur 7).



**Figur 7: Sorte kolonier av *Salmonella Agbeni* på XLD-agar.** Foto: Maja Jacobsen



På kokos ble populasjonen av *S. Agbeni* redusert til et udetekterbart nivå etter 61 dager, mens på mandler tok det 82 dager (figur 8). Grafen for kokos viser en lineær nedgang i celletall, mens grafen for mandler viser en ikke-lineær nedgang. Standardavvik for hvert uttak er også gitt, og der standardavviket er høyere har det vært større ulikheter mellom parallellene.



**Figur 8: Overlevelse av *Salmonella* Agbeni på kokosterninger og mandler.** Produktene (45 g) ble inokulert med høy (6 Log CFU/ml) og lav (3 Log CFU/ml) inokulumkonsentrasjon, og lagret mørkt ved 22 °C opp til 82 dager. Grafene er fremstilt med gjennomsnittsverdier fra tre paralleller og standardavvik er gitt for hvert uttak.

## 4.5 Statistiske analyser

Det var ingen signifikant forskjell på kokos og mandler med hensyn på overlevelsen av *S. Agbeni*. Det var heller ingen signifikant forskjell på overlevelsen fra høy og lav inokulumkonsentrasjon.

## 5 Diskusjon

Mat med lav vannaktivitet ( $a_w$ ) har blitt implisert med økt frekvens i sykdomsutbrudd de siste årene, hvor *Salmonella* ofte har vist seg å være smittekilden (Beuchat et al., 2013). Målet bør derfor være å fremme kunnskap om atferden til *Salmonella* i matvarer og matingredienser med lav  $a_w$ . Hovedmålet med denne belastningsstudien var å vurdere overlevelsen av to serotyper av *Salmonella enterica*, *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium, på tørket kokos, ananas, rosin og mandler. Ønsket var at studien skulle gi informasjon om eventuelle forskjeller i overlevelsen til de to serotypene og hvilke produkter som gir mest optimale forhold for overlevelse. Produktene ble inokulert med to ulike inokulumkonsentrasjoner, en høy og en lav. En del av oppgaven var å vurdere effekten av inokulumkonsentrasjon på overlevelsen av serotypene.

### 5.1 Forskjellen på de to serotypene

Denne studien viser tydelig at den tilpassede serotypen S. Agbeni kan overleve på mandler og kokos. I tillegg til matforgiftningsutbruddet i 2019 fra en tørket frukt-mix (Mattilsynet, 2020), bekrefter disse resultatene at S. Agbeni er en serotype som trives godt i enkelte tørkede produkter. S. Typhimurium ble ikke observert i noen produkter. Det støtter videre ideen om at noen serotyper av *Salmonella* er mer utbredt i spesifikke matprodukter enn andre, og at de reagerer på en serotype-avhengig måte på produktene, som tidligere foreslått av blant andre Andino et al. (2014), Joerger et al. (2009) og González-Gil et al. (2012).

Tidligere studier har vist at S. Typhimurium ikke overlever spesielt godt i tørre produkter (Fong og Wang, 2016; Farakos et al., 2014), og det er i overensstemmelse med resultatene for produktene av tørket frukt og nøtter brukt i denne studien. S. Typhimurium har likevel blitt linket til et utbrudd fra tørket kokos i 2018 (CDC, 2018) og av den grunn er det ikke usannsynlig at serotypen kan overleve i slike produkter. Det faktum at S. Agbeni overlevde i opp mot 82 dager, men ikke S. Typhimurium, kan være problematisk fordi S. Typhimurium ofte blir brukt som en modell på *Salmonella enterica* sin uttørkingstoleranse (Gruzdev et al., 2011, 2012; Finn et al., 2013b). Dette kan føre til utelukkelse av serotyper med en høyere risiko.

## 5.2 Mikrobiologisk kvalitet

Det ble påvist relativt like antall aerobe bakterier (log CFU/ml) på de fire produktene etter nullprøvene av de ikke-inokulerte produktene. Hverken *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* eller *Salmonella* ble detektert i noen av produktene. Det ble likevel observert utypisk vekst på XLD-agar fra kokos og mandler. Veksten var gulhvit og tyder dermed på at det kan være en av følgende bakterier: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, eller *Serratia* (Oxoid, 2020). I et fordypningsprosjekt, som ledet opp til denne masteroppgaven, ble det utført 16S sekvensering av tilsvarende gulhvite kolonier på XLD fra rosiner og aprikos (Jacobsen, 2019). BLAST av sekvensene viste at de fleste treffene som ga høyest score hørte til familien *Enterobacteriaceae*, slik som de nevnte bakteriene ovenfor også gjør.

Siden det ikke var noe vekst på petrifilmene for deteksjon av *Enterobacteriaceae*, blir det vanskelig å si hvilken bakterie som befant seg i produktene. Den utypiske veksten dukket ikke opp igjen på XLD-agar etter inokulering med *Salmonella*. For å være helt sikker på at de sorte koloniene som vokste opp på XLD var *S. Agbeni* var det planlagt å utføre PCR og sekvensering av koloniene. På grunn av tidsbegrensningene som COVID19 medførte, ble ikke det prioritert.

## 5.3 Overlevelse av *S. Agbeni* og *S. Typhimurium* på de utvalgte produktene

Denne studien skulle undersøke hvilke av produktene som ga mest optimale forhold for overlevelse av *S. Agbeni* og *S. Typhimurium*. *S. Typhimurium* ble ikke påvist i noen av produktene. Etter 33 dager ble *S. Agbeni* kun påvist på mandler og kokos, og etter 61 dager ble den kun påvist på mandler. Resultatene tyder på at mandler og kokos var de produktene som ga mest optimale forhold for overlevelse av *S. Agbeni*. De statistiske analysene tilsa at det ikke var signifikant forskjell på overlevelsen av *S. Agbeni* på mandler og kokos.

Beuchat og Mann (2014) viste at *Salmonella* overlevde 21 dager på rosiner ved 25 °C. Temperaturen er ikke så langt fra 22 °C, som ble brukt i denne studien. På grunn av COVID19 ble ikke det første uttaket utført før etter 33 dager. Siden *Salmonella* kun overlevde i 21 dager på rosiner i studien til Beuchat og Mann (2014), er det mulig at et tidligere uttak i denne studien kunne sagt noe mer om overlevelsen på rosiner og ananas. Tidligere studier har demonstrert at det kan skje et øyeblikkelig fall i populasjonen etter inokulering, på grunn av tørkeeffekten som oppstår når man tilsetter hydrerte celler til produkter med lav  $a_w$  (Kimber et al.,

2012; Komitopoulou og Peñaloza, 2009; Uesugi et al., 2006). Et uttak kort tid etter inokulering kunne bidratt til mer kunnskap om hvor raskt bakterieantallet sank, spesielt for *S. Typhimurium* som ikke ble funnet i noen av produktene etter 33 dager.

Selv om *S. Typhimurium* ikke ble funnet i produktene med metoden brukt i denne studien, utelukker det nødvendigvis ikke at det var celler tilstede. Det tyder bare på at det var lave nivåer av bakterien. Det samme gjelder for de lave nivåene detektert av *S. Agbeni*. I grafene til overlevelsen av *S. Agbeni* på kokosterner og mandler er det lagt inn et standardavvik for hvert uttak. De høyeste standardavvikene er gitt for lav inokulumkonsentrasjon, siden det var større variasjoner mellom parallellene. For eksempel fra uttak nr. 2 av mandler, inokulert med lav konsentrasjon, ble det observert 2 kolonier fra parallell 1, men ingen kolonier fra de to andre parallellene. Dette illustrerer et problem man kan støte på ved analyser av patogene bakterier i mat. Ved lave konsentrasjoner av bakterien kan det være som å lete etter “nåla i høystakken”. Enkle mikrobiologiske metoder, som direkte plating av prøven på selektive agarmedier kan ha problemer med å oppdage små bestander (Zourob et al., 2008, s.39).

Metoden brukt til kvantifisering av *Salmonella* i denne studien var direkte plating på XLD-agar. Det er mulig at celler kunne blitt kvalitativt detektert dersom en annen metode hadde blitt brukt, som for eksempel NMKL nr. 71 med preanriking før plating på agar. Kimber et al. (2012) brukte utsåing på agarplater for kvantifisering av bakteriene, men prøvene ble anrikt når nivåene falt under deteksjonsgrensen. Dersom *Salmonella* forekommer i lavt antall er preanriking og resusitering ofte nødvendig for å kunne påvise bakterien (Granum, 2015, s. 101). Real-time PCR er en annen kvantifiseringsmetode som kunne vært brukt i denne studien. PCR er blitt standardisert de siste 5 årene av ISO og brukes nå til påvisning av sykdomsfremkallende bakterier i matvarer (Malorny et al., 2003). Den neste generasjonen PCR, real-time PCR, tilbyr muligheten for også å estimere antall bakterier (Malorny et al., 2008).

Det er kjent at mange former for naturlig stress kan føre til at bakterieceller kommer inn i en tilstand hvor de er levedyktige, men ikke kan kultiveres, kjent som “viable but nonculturable (VBNC) state” (Oliver, 2005). *S. Typhimurium* er også vist å kunne danne filamenter under tørkestress. Filamenter er lange ansamlinger med partielle *Salmonella*-celler. De partielle cellene vil ikke dukke opp på medium, men kan skille seg fra hverandre og danne individuelle celler ved rehydrering (Jones et al., 2013). VBNC-celler og filamenterte celler kan ikke utelukkes i denne studien.

Vannaktiviteten til produktene var ikke veldig ulik, og *S. Agbeni* overlevde best på produktene med høyest  $a_w$  og lavest  $a_w$ . Høyest  $a_w$  ble målt til å være 0,451 for kokos og lavest  $a_w$  var 0,312 for mandler. Dette indikerer at andre faktorer enn  $a_w$  også påvirker overlevelsen av *Salmonella*. Resultatene er i overensstemmelse med tidligere observasjoner av Juven et al. (1984), som antyder at overlevelsen av *Salmonella* i et tørt produkt ikke kan forutsies på basis av  $a_w$  alene. Juven et al. (1984) demonstrerte at det ikke var noen særlig forskjell på overlevelsen av *Salmonella* på produkter med  $a_w$  lik 0,43 og 0,52, men at overlevelsen generelt var høyere ved disse to vannaktivitetene enn ved 0,75. Det kan derfor være at vannaktivitetene i dette prosjektet ikke er ulik nok til å kunne gi utslag på overlevelsen. Andre faktorer som ingredienssammensetning (f.eks. fett, sukker osv.) kan bidra til langvarig overlevelse av *Salmonella* under lave  $a_w$ -forhold på grunn av såkalt synergistisk effekt (He et al., 2011; Hiramatsu et al., 2005).

Uttørkede *Salmonella*-celler kan overleve i lang tid i matvarer med lav vannaktivitet, spesielt i matvarer med høyt fettinnhold (Podolak et al., 2010). Fra tabell 1 er det tydelig at kokosterninger og mandler er de produktene med mest fett. Per 100 g har produktene henholdsvis 21,4 g fett og 49,4 g fett, versus 0,0 g og 0,5 g for ananas og rosiner. Næringsinnholdet til ananasterninger og rosiner er hovedsaklig karbohydrater. Det kan tenkes fettinnholdet er en av faktorene som har vært med å påvirke overlevelsen av *S. Agbeni*. Dette underbygges av at flere matforgiftningsutbrudd med serotyper av *Salmonella enterica* har blitt assosiert med forbruk av matvarer med høyt fettinnhold og redusert vannaktivitet (Shachar og Yaron, 2006).

Den direkte eksponeringen av bakteriecellene til surhet kan være lav, siden *Salmonella* ble overført til overflaten av tørket frukt og mandler. Dette gjør det vanskeligere å avgjøre om pH er en faktor som påvirker overlevelsen. På en annen side er kokos og mandler ulike med hensyn på  $a_w$  og tilsetninger, men pH-verdien er ganske lik. Målingene av pH i tabell 2 tilsier at denne verdien skiller mandler og kokos fra rosin og ananas, med målinger på henholdsvis 6,23 og 6,38 kontra 3,87 og 4,30. Det ser derfor ut til at *S. Agbeni* overlever best på frukt/nøtter med høyere pH-verdi. Disse resultatene er i samsvar med Beuchat og Mann (2014) som viste at *Salmonella* overlevde lengst på produktene med høyest pH-verdi.

## 5.4 Inokulering og effekt av inokulumkonsentrasjon

I denne oppgaven ble *S. Agbeni* og *S. Typhimurium* dyrket på agarmedie før inokulering. Tidligere har det blitt vist at *Salmonella* dyrket på agarmedier har en tendens til å overleve lengre enn når cellene ble dyrket i flytende medium (Komitopoulou og Peñaloza, 2009; Bowman et al., 2015; Uesugi et al., 2006; Beuchat og Mann, 2014). En mulig forklaring er den lave  $a_w$  i agar, sammenliknet med et flytende medium. Dette kan føre til at cellene tilpasser seg forhold med lav  $a_w$  og dermed styrker overlevelsen av *Salmonella* på tørre produkter (Beuchat og Mann, 2014). Det er derfor mulig at inokuleringen i denne studien kan presentere et “verst tenkelig scenario”.

Når inokulumet med lav konsentrasjon skulle produseres ble det tatt ut en så lav mengde som  $0,1 \mu\text{l}$  av det initielle inokulumet, for å danne 1 ml inokulum med ønsket sluttkonsentrasjon. Den mengden er vanskelig å pipettere nøyaktig. For å unngå arbeid med små volum burde det vært tatt ut et høyere volum, som deretter ble fortynnet til ønsket konsentrasjon. Når inokulumet med høy konsentrasjon skulle produseres var ikke dette et problem, siden volumet som ble tatt ut var mye høyere. Inokulumløsningene burde vært platet ut på XLD og kvantifisert for å være helt sikker på at det var baktrierceller tilstede, og at startkonsentrasjonen var som ønsket. Resultatene i denne oppgaven kan være begrenset av denne usikkerheten.

Få studier har sammenlignet påvirkningen av ulike inokulumkonsentrasjoner på overlevelsen av patogener i tørr mat. Produktene ble inokulert med høyt og lavt nivå av begge serotypene. Fra figur 8 er det tydelig at nedgangen i overlevelsen av *S. Agbeni* følger den samme trenden ved høy og lav inokulumkonsentrasjon, både på kokos og mandler. Noen studier har observert raskere nedgang av bakterieceller ved lavere inokulumkonsentrasjoner (Flessa et al., 2005; Blessington et al., 2013), mens andre studier har vist at overlevelsen var uavhengig av initiell inokulumkonsentrasjon (Uesugi et al., 2006; Brar et al., 2015). Resultatene i denne studien tyder på sistnevnte, siden de statistiske analysene viste at det ikke var signifikant forskjell på overlevelsen av *S. Agbeni* fra høy og lav inokulumkonsentrasjon.

## 6 Konklusjon

Et av de mer signifikante funnene som kommer frem av denne studien er at *S. Agbeni* kan overleve i produkter med lav  $a_w$ , slik som tørkede kokosterner og mandler. Forskningen viste at *S. Agbeni* overlevde opp mot 61 dager på kokos og 82 dager på mandler. Disse funnene understreker behovet for å sikre at denne typen produkter ikke inneholder *Salmonella* og at kontaminering ikke skjer under produksjon. *S. Typhimurium* ble ikke detektert i noen av produktene. Generelt ser det derfor ut til at overlevelsen av *Salmonella* på disse produktene kan være serotypeavhengig.

Produktene ble inokulert med høy og lav inokulumkonsentrasjon. De statistiske analysene viste at det ikke var signifikant forskjell på overlevelsen av *S. Agbeni* med hensyn på de to inokulumkonsentrasjonene.

Studien bidrar til forståelse av hvordan matbårne patogener, mer spesifikt *S. Agbeni* og *S. Typhimurium*, opptrer i produkter med lav  $a_w$ . Innsikten som er oppnådd i denne studien kan være til hjelp for produsenter av tørket frukt, nøtter, eller produkter som inneholder disse komponentene. De unike overlevelsesegenskapene til *S. Agbeni*, i forhold til *S. Typhimurium*, fremhever behovet for gode strategier som skal forhindre høyrisiko serotyper i matindustrien.



## 7 Forslag til videre arbeid

Siden *Salmonella* tidligere har blitt vist å kunne overleve veldig lenge i tørre produkter, ville det vært interessant med en belastningsstudie som går over en enda lengre periode. Videre forskning kan utforske andre serotyper assosiert med produkter med lav  $a_w$ . Videre studier kunne også inkludert flere produkter med relativ høy pH og høyt fettinnhold (som f.eks. sjokolade), og evaluert overlevelsen av ulike serotyper på disse produktene.

Dersom studien skal replikeres burde den inkludere de analysene som ikke var mulig å gjennomføre i dette prosjektet. Som tidligere nevnt gjaldt dette flere uttak, identifiseringsarbeid med bakteriekolonier, samt kvantifisering av *Salmonella* med real time PCR. Det kunne også vært interessant å inkludert pH og vannaktivitetsanalyser gjennom belastningsforsøket, for å se om verdiene forandrer seg over tid.

# Bibliografi

- 3M Food Safety (2020), '3M petrifilm - interpretation guide'. Tilgjengelig fra: <https://multimedia.3m.com/mws/media/2412800/petrifilm-staph-express-interpretation-guide.pdf> (Hentet: 10. april 2020).
- Andino, A. og Hanning, I. (2015), 'Salmonella enterica: Survival, colonization, and virulence differences among serovars', *The Scientific World Journal* **2015**, 16.
- Andino, A., Pendleton, S., Zhang, N., Chen, W., Critzer, F. og Hanning, I. (2014), 'Survival of salmonella enterica in poultry feed is strain dependent', *Poultry Science* **93**(2), 441–447.
- Bailey, S., Richardson, L. J., Cox, N. A. og Cosby, D. E. (2009), *Salmonella*, 1. edn, ASM Press, Washington, DC.
- Begley, M. og Hill, C. (2015), 'Stress adaptation in foodborne pathogens', *Annual Review of Food Science and Technology* **6**(1), 191–210.
- Bennett, J. E., Dolin, R. og Blaser, M. J., eds (2015), *Mandell Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8. edn, Elsevier, Philadelphia.
- Bertani, G. (1951), 'Studies on lysogenesis i. the mode of phage liberation by lysogenic escherichia coli', *Journal of bacteriology* **62**(3), 293–300.
- Besnard, V., Federighi, M., Declerq, E., Jugiau, F. og Cappelier, J.-M. (2002), 'Environmental and physico-chemical factors induce vbnc state in listeria monocytogenes', *Veterinary Research* **33**(4), 359–370.
- Beuchat, L. R. og Heaton, E. K. (1975), 'Salmonella survival on pecans as influenced by processing and storage conditions', *Applied Microbiology* **29**(6), 795–801.
- Beuchat, L. R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R. P., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten, H. M. og Kuile, B. H. T. (2013), 'Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens', *Journal of Food Protection* **76**(1), 150–172.

- Beuchat, L. R. og Mann, D. A. (2010), 'Factors affecting infiltration and survival of salmonella on in-shell pecans and pecan nutmeats', *Journal of Food Protection* **73**(7), 1257–1268.
- Beuchat, L. R. og Mann, D. A. (2014), 'Survival of *Salmonella* on dried fruits and in aqueous dried fruit homogenates as affected by temperature', *Journal of Food Production* **77**(7), 1102–1109.
- Blackburn, C. og McClure, P. (2002), *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*, Woodhead Publishing.
- Blessington, T., Mitcham, E. J. og Harris, L. J. (2012), 'Survival of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* o157:h7, and *Listeria monocytogenes* on inoculated walnut kernels during storage', *Journal of Food Protection* **75**(2), 245–254.
- Blessington, T., Theofel, C. G., Mitcham, E. J. og Harris, L. J. (2013), 'Survival of foodborne pathogens on inshell walnuts', *International Journal of Food Microbiology* **166**(3), 341–348.
- Bowman, L. S., Waterman, K. M., Williams, R. C. og Ponder, M. A. (2015), 'Inoculation preparation affects survival of salmonella enterica on whole black peppercorns and cumin seeds stored at low water activity', *Journal of Food Protection* **78**(7), 1259–1265.
- Brar, P. K., Proano, L. G., Friedrich, L. M., Harris, L. J. og Danyluk, M. D. (2015), 'Survival of salmonella, escherichia coli o157:h7, and listeria monocytogenes on raw peanut and pecan kernels stored at 24, 4, and 22 c', *Journal of Food Protection* **78**(2), 323–332.
- CDC (2018), 'Multistate outbreak of salmonella typhimurium infections linked to dried coconut (final update)'. Tilgjengelig fra: <https://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-03-18/index.html> (Hentet 25. mai 2020).
- Chitrakar, B., Zhang, M. og Adhikari, B. (2019), 'Dehydrated foods: Are they microbiologically safe?', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**(17), 2734–2745.
- Chmielewski, R. A. N. og Frank, J. F. (1995), 'Formation of viable but nonculturable salmonella during starvation in chemically defined solutions', *Applied Microbiology* **20**(6), 380–384.
- Chung, K. C. og Goepfert, J. M. (1970), 'Growth of salmonella at low ph', *Journal of Food Science* **35**(3), 326–328.
- Coulter, T. (2016), *Food: The Chemistry of its Components*, 4. edn, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

- Crowe, J. H., Carpenter, J. F. og Crowe, L. M. (1998), ‘The role of vitrification in anhydrobiosis’, *Annual Review of Physiology* **60**, 73–103.
- Csonka, L. N. (1989), ‘Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress’, *Microbiological Reviews* **53**(1), 121–147.
- Cunningham, E., O’Byrne, C. og Oliver, J. D. (2009), ‘Effect of weak acids on listeria monocytogenes survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH’, *Food Control* **20**(12), 1141–1144.
- D’Aoust, J. Y. (1977), ‘Salmonella and the chocolate industry. a review’, *Journal of Food Protection* **40**(10), 718–727.
- Deng, L.-Z., Mujumdar, A. S., Zhang, Q., Yang, X.-H., Wang, J., Zheng, Z.-A., Gao, Z.-J. og Xiao, H.-W. (2019), ‘Chemical and physical pretreatments of fruits and vegetables: Effects on drying characteristics and quality attributes – a comprehensive review’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**(9), 1408–1432.
- Dipersio, P. A., Kendall, P. A., Calicioglu, M. og Sofos, J. N. (2003), ‘Inactivation of salmonella during drying and storage of apple slices treated with acidic or sodium metabisulfite solutions’, *Journal of Food Protection* **66**(12), 2245–2251.
- Dipersio, P. A., Kendall, P. A. og Sofos, J. N. (2004), ‘Inactivation of listeria monocytogenes during drying and storage of peach slices treated with acidic or sodium metabisulfite solutions’, *Food Microbiology* **21**(6), 641–648.
- Doyle, M. E. og Mazzotta, A. S. (2000), ‘Review of studies on the thermal resistance of salmonellae’, *Journal of Food Protection* **63**(6), 779–795.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. og Carroll, D. (2003), ‘New insights on trehalose: a multifunctional molecule’, *Glycobiology* **13**(4), 17R–27R.
- Farakos, S. M. S. og Frank, J. F. (2014), *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices*, 1. edn, Springer, New York, NY.
- Farakos, S. S., Hicks, J. W., Frye, J. G. og Frank, J. F. (2014), ‘Relative survival of four serotypes of salmonella enterica in low-water activity whey protein powder held at 36 and 70c at various water activity levels’, *Journal of Food Protection* **77**(7), 1198–1200.
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A. og Fanning, S. (2013a), ‘Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments’, *Frontiers in microbiology* **4**, 331.
- Finn, S., Händler, K., Condell, O., Colgan, A., Cooney, S., McClure, P., Amézquita, A., Hinton, J. C. D. og Fanning, S. (2013b), ‘Prop is required for the survival of desiccated

- salmonella enterica serovar typhimurium cells on a stainless steel surface', *Applied and Environmental Microbiology* **79**(14), 4376–4384.
- Flessa, S., Lusk, D. M. og Harris, L. J. (2005), 'Survival of listeria monocytogenes on fresh and frozen strawberries', *International Journal of Food Microbiology* **101**(3), 255–262.
- Folkehelseinstituttet (2018), 'Hva kan smitte gjennom mat og vann?'. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/smittsomme-sykdommer/smitte-fra-mat-vann-dyr/topp-tre/sykdommer-som-kan-smitte-gjennom-ma/> (Hentet 13. februar 2020).
- Folkehelseinstituttet (2019), 'Salmonellose - veileder for helsepersonell'. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/salmonellose---veileder-for-helsepe/> (Hentet 21. mars 2020).
- Fong, K. og Wang, S. (2016), 'Strain-specific survival of salmonella enterica in peanut oil, peanut shell, and chia seeds', *Journal of Food Protection* **79**(3), 361–368.
- Furuki, T., Oku, K. og Sakurai, M. (2009), 'Thermodynamic, hydration and structural characteristics of alpha, alpha-trehalose', *Frontiers in Bioscience* **14**, 3523–3535.
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C. og Grassl, G. A. (2014), 'Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal salmonella enterica serovars differ', *Frontiers in microbiology* **5**, 391.
- González-Gil, F., Bolloch, A. L., Pendleton, S., Zhang, N., Wallis, A. og Hanning, I. (2012), 'Expression of hila in response to mild acid stress in salmonella enterica is serovar and strain dependent', *Journal of Food Science* **77**(5), M292–M297.
- Granum, P. E. (2015), *Matforgiftning: smitte gjennom mat og vann*, 4. edn, Cappelen Damm akademisk, Oslo, Norge.
- Graziani, C., Losasso, C., Luzzi, I., Ricci, A., Scavia, G. og Pasquali, P. (2017), *Foodborne Diseases*, 3. edn, Academic Press, New York, NY.
- Greenwood, M. H. og Hooper, W. (1983), 'Chocolate bars contaminated with salmonella napoli: an infectivity study', *British Medical Journal* **286**(6375), 1394.
- Gruzdev, N., McClelland, M., Porwollik, S., Ofaim, S., Pinto, R. og Sela, S. S. (2012), 'Global transcriptional analysis of dehydrated salmonella enterica serovar typhimurium', *Applied and Environmental Microbiology* **78**(22), 7866–7875.
- Gruzdev, N., Pinto, R. og Sela, S. (2011), 'Effect of desiccation on tolerance of salmonella enterica to multiple stresses', *Applied and Environmental Microbiology* **77**(5), 1667–1673.

- He, Y., Guo, D., Yang, J., Tortorello, M. L. og Zhang, W. (2011), 'Survival and heat resistance of salmonella enterica and escherichia coli o157:h7 in peanut butter', *Applied and Environmental Microbiology* **77**(23), 8434–8438.
- Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Sakae, K. og Miyazaki, Y. (2005), 'Ability of shiga toxin-producing escherichia coli and salmonella spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods', *Applied and Environmental Microbiology* **71**(11), 6657–6663.
- Humphrey, T. (2004), '*Salmonella*, stress responses and food safety', *Nature Reviews Microbiology* **2**, 504–509.
- Jacobsen, M. (2019), Fordypningsprosjekt, Technical report, Trondheim, Norge.
- Joerger, R. D., Sartori, C. A. og Kniel, K. E. (2009), 'Comparison of genetic and physiological properties of salmonella enterica isolates from chickens reveals one major difference between serovar kentucky and other serovars: response to acid', *Foodborne Pathogens and Disease* **6**(4), 503–512.
- Jones, T. H., Vail, K. M. og McMullen, L. M. (2013), 'Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress', *Applied and Environmental Microbiology* **165**(2), 97–110.
- Juven, B. J., Cox, N. A., Bailey, J. S., Thomson, J. E., Charles, O. W. og Shutze, J. V. (1984), 'Survival of salmonella in dry food and feed', *International Journal of Food Microbiology* **47**(6), 445–448.
- Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hansen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., Jahkola, M., Montenegro, M. A. og Helmuth, R. (1990), 'Outbreak of salmonella typhimurium infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid', *Journal of Clinical Microbiology* **28**(12), 2597–2601.
- Kempf, B. og Bremer, E. (1998), 'Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments', *Archives of Microbiology* **170**, 319–330.
- Kim, D., Chung, S., Lee, S. og Choi, J. (2012), 'Relation of microbial biomass to counting units for *Pseudomonas aeruginosa*', *African Journal of Microbiology Research* **6**(21), 4620–4622.
- Kimber, M. A., Kaur, H., Wang, L., Danyluk, M. D. og Harris, L. J. (2012), 'Survival of *Salmonella*, *Escherichia coli* o157:h7, and *Listeria monocytogenes* on inoculated almonds and pistachios stored at -19, 4, and 24 °C', *Journal of Food Protection* **75**(8), 1394–1403.

- Komitopoulou, E. og Peñaloza, W. (2009), 'Fate of salmonella in dry confectionery raw materials', *Journal of Applied Microbiology* **106**(6), 1892–1900.
- Koski, L., Stevenson, L., Huffman, J., Robbins, A., Latash, J., Omoregie, E., Kline, K. og Nichols, M. (2018), 'Notes from the field: An outbreak of salmonella agbeni infections linked to turtle exposure - united states, 2017', *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* **67**(48), 1350.
- Kothary, M. H. og Babu, U. S. (2001), 'Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review', *Journal of Food Safety* **21**(1), 49–68.
- Kotzekodou, P. (1998), 'Microbial stability and fate of salmonella enteritidis in halva, a low-moisture confection', *Journal of Food Protection* **61**(2), 181–185.
- Ladd-Wilson, S. G., Morey, K., Koske, S. E., Burkhalter, B., Bottichio, L., Brandenburg, J., Fontana, J., Tenney, K., Kutumbaka, K. K., Samadpour, M., Kreil, K. og Cieslak, P. R. (2019), 'Notes from the field: Multistate outbreak of salmonella agbeni associated with consumption of raw cake mix — five states, 2018', *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* **68**(34), 751–752.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H. og Crowe, L. M. (1995), 'Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying', *Applied and Environmental Microbiology* **61**(10), 3592–3597.
- Leyer, G. J. og Johnson, E. A. (1993), 'Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in salmonella typhimurium', *Applied and Environmental Microbiology* **59**(6), 1842–1847.
- Lianou, A. og Koutsoumanis, K. P. (2013), 'Evaluation of the strain variability of salmonella enterica acid and heat resistance', *Food Microbiology* **34**(2), 259–267.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A. og Nobile, M. A. D. (2012), 'Food applications of natural antimicrobial compounds', *Frontiers in Microbiology* **3**(287), 1–13.
- MacKenzie, K. D., Palmer, M. B., Köster, W. L. og White, A. P. (2017), 'Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic salmonella strains to colonize multiple host species', *Frontiers in Veterinary Science* **4**(1), 1–19.
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., J. Angulo, F., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A. og Hoekstra, R. M. (2010), 'The global burden of nontyphoidal salmonella gastroenteritis', *Clinical Infectious Diseases* **50**(6), 882–889.
- Malorny, B., Löfström, C., Wagner, M., Krämer, N. og Hoorfar, J. (2008), 'Enumeration of salmonella bacteria in food and feed samples by real-time pcr for quantitative microbial risk assessment', *Applied and Environmental Microbiology* **74**(5), 1299–1304.

- Malorny, B., Tassios, P. T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M. og Hoorfar, J. (2003), 'Standardization of diagnostic pcr for the detection of foodborne pathogens', *International Journal of Food Microbiology* **83**(1), 39–48.
- Mandal, R. K. og Kwon, Y. M. (2017), 'Global screening of salmonella enterica serovar typhimurium genes for desiccation survival', *Frontiers in Microbiology* **8**, 1723.
- Mattick, K. L., Jørgensen, F., Legan, J. D., Cole, M. B., Porter, J., Lappin-Scott, H. M. og Humphrey, T. J. (2000), 'Survival and filamentation of salmonella enterica serovar enteritidis pt4 and salmonella enterica serovar typhimurium dt104 at low water activity', *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4), 1274–1279.
- Mattilsynet (2020), Mikrobiologisk kontroll av salmonella i tørket frukt, tørkede bær og nøtteblandinger på det norske markedet, Overvåkings- og kontrollprogram, 2019, Mattilsynet. Tilgjengelig fra: [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/smitte\\_fra\\_mat\\_og\\_drikke/bakterier\\_i\\_mat\\_og\\_drikke/kontroll\\_av\\_salmonella\\_i\\_torket\\_frukt\\_torkede\\_baer\\_og\\_notteblandinger\\_2019.37565](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/smitte_fra_mat_og_drikke/bakterier_i_mat_og_drikke/kontroll_av_salmonella_i_torket_frukt_torkede_baer_og_notteblandinger_2019.37565) (Hentet 15. April 2020).
- McEvily, A. J., Iyengar, R. og Otwell, W. S. (1992), 'Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32**(3), 253–273.
- Meedeniya, K. (2009), 'Investigations into the contamination of ceylon desiccated coconut', *Epidemiology Infection* **67**(4), 719–729.
- Mooijman, K. A. (2012), Culture media for the isolation of salmonella, in J. E. Corry, G. D. Curtis og R. M. Baird, eds, 'Handbook of culture media for food and water microbiology', RSC Pub., Cambridge, chapter 13, pp. 261–280.
- Nickerson, C. A. og Curtiss, R. (1977), 'Role of sigma factor rpos in initial stages of salmonella typhimurium infection.', *Infection and Immunity* **65**(5), 1814–1823.
- NMKL (1999), Salmonella. detection in foods., NMKL metode nr. 71. 5. utgave. Uppsala, Sverige.
- NMKL (2010), Preparation of the test sample and initial suspension of food and animal feeding stuffs for quantitative microbiological examination, NMKL metode nr. 91. 6. utgave. Roskilde, Denmark.
- Nummer, B. A., Shrestha, S. og Smith, J. V. (2012), 'Survival of salmonella in a high sugar, low water-activity, peanut butter flavored candy fondant', *Food Control* **27**(1), 184–187.
- Oliver, J. D. (2005), 'The viable but nonculturable state in bacteria', *The Journal of Microbiology* **43**(S), 93–100.



- Oulkheir, S., Khadija, Ounine, Haloui, N. E. E. og Attarassi, B. (2015), ‘Antimicrobial effect of citric, acetic, lactic acids and sodium nitrite against escherichia coli in tryptic soy broth’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **5**(3), 12–19.
- Oxoid (2020), ‘X.l.d. agar’. Tilgjengelig fra: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0469&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469&c=UK&lang=EN) (Hentet 23. mars 2020).
- Percival, S. L. og Williams, D. W. (2013), *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*, 2. edn, Elsevier Ltd., UK.
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G. og Elliott, P. H. (2010), ‘Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of salmonella in low-moisture foods’, *Journal of Food Protection* **73**(10), 1919–1936.
- Queiroz, C., Lopes, M. L. M., Fialho, E. og Valente-Mesquita, V. L. (2008), ‘Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control’, *Food Reviews International* **24**(4), 361–375.
- Rychlik, I. og Barrow, P. A. (2005), ‘Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection’, *FEMS Microbiology Reviews* **29**(5), 1021–1040.
- Shachar, D. og Yaron, S. (2006), ‘Heat tolerance of salmonella enterica serovars agona, enteritidis, and typhimurium in peanut butter’, *Journal of Food Protection* **69**(11), 2687–2691.
- Silbernagel, K. M. og Lindberg, K. G. (2002), ‘Evaluation of the 3m petrifilm *Enterobacteriaceae* count plate method for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in foods’, *Journal of Food Protection* **65**(9), 1452–1456.
- Sleator, R. D. og Hill, C. (2002), ‘Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence’, *Annual Review of Physiology* **26**(1), 49–71.
- Somogyi, L., Ramaswamy, H. S. og Hui, Y. H. (1996), *Processing Fruits: Science and Technology*, 1. edn, CRC Press.
- Spector, M. P. og Kenyon, W. J. (2012), ‘Resistance and survival strategies of salmonella enterica to environmental stresses’, *Food Research International* **45**(2), 455–481.
- Stackhouse, R. R., Faith, N. G., Kaspar, C. W., Czuprynski, C. J. og Wong, A. C. L. (2012), ‘Survival and virulence of salmonella enterica serovar enteritidis filaments induced by reduced water activity’, *Applied and Environmental Microbiology* **78**(7), 2213–2220.

- Taylor, M., Brisdon, S., Jeyes, J., Stone, J., Embree, G., Paccagnella, A., Hoang, L. og Galanis, E. (2012), 'Salmonella enterica serovar agbeni, british columbia, canada, 2011', *Emerging Infectious Diseases* **18**(9), 1542–1543.
- Teunis, P. F. M., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, I. D., Rotariu, O. og Strachan, N. J. C. (2010), 'Dose–response modeling of *Salmonella* using outbreak data', *International Journal of Food Microbiology* **144**(2), 243–249.
- Uesugi, A. R., Danyluk, M. D. og Harris, L. J. (2006), 'Survival of salmonella enteritidis phage type 30 on inoculated almonds stored at -20, 4, 23, and 35 °C', *Journal of food protection* **69**(8), 1851–1857.
- Werber, D., Dreesman, J., Feil, F., van Treeck, U., Fell, G., Ethelberg, S., Hauri, A. M., Roggentin, P., Prager, R., Fisher, I. S. T., Behnke1, S. C., Bartelt, E., Weise, E., Ellis, A., Siitonen, A., Andersson, Y., Tschäpe, H., Kramer1, M. H. og Ammon, A. (2005), 'International outbreak of salmonella oranienburg due to german chocolate', *BMC Infectious Diseases* **5**(7).
- Whitaker, J. R. og Lee, C. Y. (1995), *Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning*, 1. edn, American Chemical Society.
- Wong, H. C. og Wang, P. (2004), 'Induction of viable but nonculturable state in vibrio parahaemolyticus and its susceptibility to environmental stresses', *Veterinary Research* **96**(2), 359–366.
- Xu, H.-S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J. og Colwell, R. R. (1982), 'Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment', *Microbial Ecology* **8**(1), 313–323.
- Zourob, M., Elwary, S. og Turner, A. (2008), *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, 1. edn, Springer New York, NY.

