

Didrik Braathen

# Overlevelse av *Salmonella* *Typhimurium* og *Salmonella* Agbeni på tørkede kokosprodukter

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft  
Veileder: Lisbeth Mehli og Kirill Mukhatov

Mai 2023



Didrik Braathen

# **Overlevelse av *Salmonella Typhimurium* og *Salmonella Agbeni* på tørkede kokosprodukter**

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft  
Veileder: Lisbeth Mehli og Kirill Mukhatov  
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Denne masteroppgaven, på 45 studiepoeng, er en individuell oppgave som avslutning på den 2-årige masterutdanningen Matvitenskap, teknologi og bærekraft, ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Arbeidet med denne oppgaven utgjorde halve 3. semester og hele 4. semester av utdanningen og arbeidet ble avsluttet i mai 2023.

Det har både vært spennende og slitsomt å arbeide med oppgaven med flere lange dager med labarbeid, men det har også vært veldig givende å se progresjon og resultater underveis i arbeidet som har holdt motivasjonen oppe.

Først vil jeg rekke en takk til min hovedveileder Lisbeth Mehli som har gitt veldig god veiledning med hennes kunnskaper gjennom hele prosessen av labarbeid, oppsett av oppgave og skriving. Jeg har lært utrolig mye og motivasjonen din har hjulpet meg gjennom hele arbeidsperioden.

Jeg vil også takke min andre veileder Kirill Mukhatov, som har hjulpet med å forme oppgave og forsøk, samt hjulpet veldig med sin kunnskap om statistiske analyser og prosessering.

Takk til produsent som har skaffet og gitt prøvemateriale til forsøk, samt gitt informasjon og svart raskt på mine eventuelle spørsmål.

Takk til veterinærinstituttet som har vært behjelpelige og gitt meg tilgang til bruk av serovaren brukt i forsøket.

Til slutt vil jeg takke min samboer som har vært både oppmuntrende og motiverende igjennom den slitsomme perioden det er å skrive masteroppgave.

## Sammendrag

Tørkede produkter med lav vannaktivitet blir generelt regnet som spiseklare produkter som er trygge for konsum. Derimot er det en mulighet for noen patogene bakterier å overleve i slike miljøer som kan forårsake sykdommer hos mennesker. En slik bakterie er *Salmonella* som medfølgende har forårsaket flere utbrudd knyttet til produkter med lav vannaktivitet. Denne masteroppgaven undersøker evnen *Salmonella* Typhimurium og *Salmonella* Agbeni har for å overleve på tørkede kokosterninger og kokosflak lagret ved temperatur på 4°C og 20°C, i tillegg til å undersøke egnetheten Real-time PCR har for å detektere *Salmonella* under en belastningsstudie.

*S. Typhimurium* og *S. Agbeni* ble inokulert på kokosterninger og kokosflak og lagret ved temperatur på 4°C og 20°C i en periode over fire måneder. Både *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* viste bedre overlevelsessevne lagret ved 4°C, sannsynligvis forårsaket av lavere celleaktivitet. Begge serovarene viste bedre overlevelsessevne lagret på kokosflak enn på kokosterninger som kan være forårsaket av det høye sukkernivået til kokosterningene som har en uttørkende effekt på bakteriene. *S. Agbeni* viste bedre overlevelsesegenskaper enn *S. Typhimurium*, sannsynligvis forårsaket i forskjell mellom serovarene.

Detektering av *Salmonella* på prøver av kokosterninger og kokosflak gjennom belastningsforsøket ble utført med Real-time PCR gjennom den fire måneder lange lagringsperioden. Alle inokulerte prøver undersøkt med Real-time PCR viste tilstedeværelse av *Salmonella* uansett om prøvene viste eller ikke viste vekst ved utplating på petriskål, siden Real-time PCR påviser DNA uansett om cellene er levende eller døde. Real-time PCR egner seg derfor ikke alene som påvisningsmetode av *Salmonella* i belastningsforsøk på grunn av den manglende evnen til å skille mellom levende og døde bakterier.

## Abstract

Dried products with low water activity are generally considered ready-to-eat products that are safe for consumption. However, there is a possibility for certain pathogenic bacteria to survive in such environments, which can cause illnesses in humans. One such bacterium is *Salmonella*, which has been associated with several outbreaks related to low water activity products. This master's thesis investigates the ability of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Agbeni to survive on dried coconut cubes and coconut flakes stored at temperatures of 4°C and 20°C. Additionally, it examines the suitability of Real-time PCR for detecting *Salmonella* during a challenge study.

*S. Typhimurium* and *S. Agbeni* were inoculated onto coconut cubes and coconut flakes and stored at temperatures of 4°C and 20°C for a period of over four months. Both *S. Typhimurium* and *S. Agbeni* showed better survival rates when stored at 4°C, likely due to lower cellular activity. Both serovars exhibited better survival rates on coconut flakes compared to coconut cubes, which could be attributed to the high sugar levels in the coconut cubes, which have a dehydrating effect on the bacteria. *S. Agbeni* demonstrated better survival properties than *S. Typhimurium*, possibly due to differences between the serovars.

Detection of *Salmonella* on samples of coconut cubes and coconut flakes during the challenge study was performed using Real-time PCR throughout the four-month storage period. All inoculated samples examined with Real-time PCR showed the presence of *Salmonella*, regardless of whether the samples exhibited visible growth on agar plates or not. This is because Real-time PCR detects DNA, regardless of whether the cells are alive or dead. Therefore, Real-time PCR alone is not suitable as a detection method for *Salmonella* in challenge studies due to its inability to differentiate between live and dead bacteria.

## Innholdsfortegnelse

1 Innledning .....	1
2 Introduksjon .....	2
2.1 Tørking av mat .....	2
2.2.1 Tørking av kokos .....	4
2.2 Mikrobiologisk fare i mat med lavt vanninnhold .....	4
2.3 <i>Salmonella</i> i mat med lavt vanninnhold .....	6
2.3.1 Utbrudd av <i>Salmonella</i> mat med lavt vanninnhold .....	6
2.3.2 Tilhørighet og taxonomi i slekten <i>Salmonella</i> .....	8
2.3.3 Overlevelse mekanismer for <i>Salmonella</i> i tørket produkt .....	11
2.3.4 Viable but non-culturable (VBNC) bakterier .....	13
2.4 Mål med oppgaven .....	14
3 Material og metoder .....	14
3.1 Valg av prøvemateriale .....	14
3.1.1 Flytskjema over produksjon av prøvemateriale .....	14
3.1.2 Måling av vanninnhold og vannaktivitet i kokosterner og kokosflak .....	16
3.2 Bakteriologisk test av kokosterner og kokosflak .....	16
3.2.1 Måling av aerobe bakterier og <i>Enterobacteriaceae</i> .....	17
3.2.2 NMKL metode Nr. 71 for deteksjon av salmonella i næringsmidler .....	18
3.3 Belastningsforsøk i to kokosprodukter inokulert med <i>Salmonella</i> .....	19
3.3.1 Tillaging og Kvantifisering av inokuleringsløsning .....	19
3.3.2 Oppsett av belastningsforsøk .....	20
3.3.3 Utførelse av belastningsforsøk .....	22
3.4 Real-time PCR for deteksjon av <i>Salmonella</i> .....	23
3.5 Statistiske analyser .....	25
4 Resultater .....	26
4.1 Vanninnhold og vannaktivitet i kokosterner og kokosflak .....	26
4.2 Mikrobiell status i kokosterner og kokosflak før oppstart av belastningsforsøket .....	26
4.2.1. Analyse av totalt kimtall og bakterier i familien <i>Enterobacteriaceae</i> på kokosterner og kokosflak .....	26
4.2.2 Deteksjon av <i>Salmonella</i> i kokosterner og kokosflak .....	27
4.3 Overlevelse av <i>Salmonella</i> i tørkede kokosprodukter .....	28
4.3.1 Kvantifisering av inokuleringsløsningene .....	28



4.3.2 Overlevelse av <i>Salmonella</i> inokulert i kokosterninger og kokosflak.....	28
4.3.3 Statistiske analyser av overlevelsesverdiene til <i>S. Typhimurium</i> og <i>S. Agbeni</i> .....	31
4.4 Real-time PCR av prøver fra kokosterninger og kokosflak.....	33
5 Diskusjon.....	35
5.1 Vanninnhold og vannaktivitet i kokosterninger og kokosflak.....	35
5.2 Mikrobiell status i kokosterninger og kokosflak .....	35
5.3 Overlevelse av <i>S. Typhimurium</i> og <i>S. Agbeni</i> tilsatt i kokosterninger og kokosflak .....	36
5.4 Real-time PCR av prøver fra kokosterninger og kokosflak.....	39
6 Konklusjon.....	40
7 Forslag til videre arbeid.....	41
8 Referanseliste.....	42

## 1 Innledning

Fokus på sunnhet og helse har de siste årene økt blant store befolkningsgrupper, noe som har ført til endrede spisevaner. Tørket frukt har flere helsefremmende egenskaper hvor det inneholder blant annet fiber, folat og magnesium, samt at det har en antioksidierende effekt grunnet høyt innhold av vitamin C. Konsum av tørket frukt er høyere enn noen gang hvor det den totale markedsverdien til tørket frukt i 2023 er 8,52 milliarder amerikanske dollar, og er estimert til i år 2028 å være på 11,24 milliarder amerikanske dollar. Denne økningen medfører derimot bekymringer og begrensninger angående mattrygghet (MarketDataForecast, 2023).

Flere nasjonale og internasjonale matbårne utbrudd har blitt koblet til konsum av tørket frukt hvor det i 2019 i Norge var et utbrudd av *Salmonella* Agbeni (Johansen et al., 2021; Warriner, u.å). Totalt ble det bekreftet 56 personer i Norge mellom 2-81 år som var smittet av bakterien. Utbruddsetterforskning sporet kilden for utbruddet til å være en fruktblending (eksotisk miks) som besto av ulike tørket frukt som var av kokos, rosiner, bananer, ananas og papaya (Johansen et al., 2021).

Tidligere masteroppgave av Jacobsen (2020) utførte et lagringsforsøk over 82 dager hvor *Salmonella* Agbeni og *Salmonella* Typhimurium ble tilsatt til tørket kokosterninger, tørket ananasterninger, rosiner og mandler. Det ble diskutert at et høyt fettinnhold i tørket kokosterninger og mandler kan være årsaken til økt evne for overlevelse av *S. Agbeni*, og anbefalte videre arbeid å inkludere flere produkter med høyt fettinnhold for å se hvordan *Salmonella* overlever i slike produkter over tid.

## 2 Introduksjon

Det er kjent at *Salmonella* kan overleve i mat og miljøer med lavt vanninnhold, noe som har medført flere utbrudd i verden (Beuchat & Mann, 2014). I Norge ble det i 2022 solgt 2088 tonn med tørket frukt, bær og blandinger med nøtter. Totalt ble tørket frukt til en verdi av 481 569 tusen norske kroner solgt i 2022, som er har økt fra 424 496 tusen norske kroner siden 2020 (OFG, 2022). Tørket frukt industrien er stor og det er derfor viktig at det som blir produsert og konsumert ikke medfører noen fare for forbruker (Bourdoux et al., 2016).

### 2.1 Tørking av mat

Tørking av mat er en gammel teknikk brukt for å preservere mat ved å fjerne fritt vann i produktet slik at veksten av forringelses- og patogene bakterier senkes, samt å redusere kjemiske reaksjoner innad i produktet som forårsaker forringelse. Det finnes mange forskjellige tørkemetoder hvor det først ble brukt solenergi, og der det nå brukes en rekke ulike metoder som: tunnel tørking, spray tørking, osmotisk tørking og trommel tørking (Vega-Mercado et al., 2001).

I et matprodukt finnes det vann som er fritt og vann som er bundet. Bundet vann er alt vannet som er bundet til produktet som en flytende løsning i det faste stoffet eller fanget i porestrukturen til produktet, og fritt vann vil være resten av det overflødig vannet i produktet (Lima et al., 2016b). Forskjellen mellom bundet og fritt vann er at bundet vann ikke kan fjernes fra produktet ved enten mekaniske arbeid eller varmebehandling, men som det kan gjøres med fritt vann. Når det snakkes om tørking er det derfor fjerning av fritt vann det omhandler (Lima et al., 2016b).

Tørkeprosessen går ut på å bruke varm luft som tar til seg fritt vann i produktet og fører dette frie vannet videre slik at den totale vannmengden i produktet synker. Denne prosessen kan forklares ved at når den varme luften kommer i kontakt med produktet vil det dannes et fordampningstrykk fra luften til produktet ( $P_{Luft}$ ) og motsatt ( $P_{Produkt}$ ). Om produktet har høyere vanndamptrykk enn luften rundt seg, altså ( $P_{Produkt} > P_{Luft}$ ), vil den gi fra seg vann til luften. Hvis produktet inneholder lite vann vil også vanndamptrykket være lavt, og hvis vanndamptrykket er lavere enn luften rundt ( $P_{Produkt} < P_{Luft}$ ) vil luften gi fra seg vann til produktet (Lima et al., 2016a).

Vannaktivitet ( $a_w$ ) er definert som forholdet mellom vandamptrykket i et produkt og det mettede vandamptrykket over rent vann ved den samme temperaturen (Slinde, 2022). Næringsmidler med lavt vanninnhold inneholder generelt ikke mer enn 25% vann av totalvekten og har en  $a_w$  mellom 0,00 og 0,60, som skal tilsvare nivåer hvor vekst av mikroorganismer er hemmet (Jay et al., 2008). Omtrentlig vannaktivitet til en rekke matprodukter vises i tabell 1, hvor produkter som fullstendig hemmer vekst av mikroorganismer er blant annet tørket frukt, kjeks, melkepulver og pulverkaffe (USDA, 1995).

**Tabell 1:** Den typiske vannaktiviteten til noen matprodukter (USDA, 1995).

Produkt	Vannaktivitet
Ferskt kjøtt og fisk	0,99
Brød	0,95
Lagret cheddar	0,85
Syltetøy og gele	0,8
Tørket frukt	0,6
kjeks	0,3
Melkepulver	0,2
Pulverkaffe	0,2

Reduksjon av vannaktivitet ved osmotisk tørking kan gjøres ved for eks. tilsetning av salt eller sukker. Årsaken til reduksjon i vannaktivitet er fordi salt og sukker er høyt løselig i vann, noe som fører til at det tilgjengelige vannet i produktet blir bundet til saltet eller sukkeret slik at mengde tilgjengelig vann senkes (Pittia & Antonello, 2016).

Patogene bakterier klarer som regel ikke å vokse på næringsmidler med lav vannaktivitet og å senke vanninnhold i næringsmidler er en av de vanligste måtene å preservere mat på, men det har blitt rapportert at noen av disse bakteriene kan overleve fra flere måneder til år i mat med lav  $a_w$  eller i miljøet hvor tørket mat ble prosessert. Selv om tørkede næringsmidler har store fordeler vedrørende mikrobiell trygghet, og stort sett blir regnet som trygt å innta, er det likevel noen store bekymringer som må tas tak i for å sikre trygge produkter (Beuchat et al., 2013).

### 2.2.1 Tørking av kokos

Tørket kokos består av fruktkjøttet til kokosnøtt hvor vanninnhold har blitt fjernet, og er et produkt som har de siste årene har økt i popularitet som et sunt snacks alternativ (da Silva et al., 2014). Produksjon av tørket kokos utføres hovedsakelig gjennom to forskjellige metoder som er osmotisk dehydrering og dehydrering ved bruk av varm luft. I tillegg er det mulig å kombinere de to metodene (da Silva et al., 2013). Tørking ved bruk av varm luft er en dyr og energikrevende prosess i motsetning til osmotisk dehydrering som vanligvis gjøres ved å dyppe kokosen i en sukkerlake. Selv om osmotisk dehydrering er billig og simpelt fører det ikke til tilstrekkelig reduksjon av vanninnhold, derfor brukes osmotisk dehydrering vanligvis som et fortrinn før tørking ved bruk av varm luft (da Silva et al., 2014).

Siden dehydrering av kokos ved bruk av varm luft er så energikrevende, er andre bærekraftige energieffektive metoder ønsket for å redusere kostnadene ved produksjon. Det har blant annet vært forsket på dehydrering ved bruk av trykk eller dehydrering ved bruk av virvelsjikt, men disse metodene er i oppstartsfasen og dermed ikke tatt i bruk av industrien enda. (Madhiyanon et al., 2009; Maneepan & Yuenyongputtakal, 2011).

## 2.2 Mikrobiologisk fare i mat med lavt vanninnhold

Ved å senke  $a_w$  vil vekst av mikroorganismer bli svekket og til slutt helt stoppe helt opp. Nivået av  $a_w$  nødvendig for å fullstendig stoppe vekst av ulike mikroorganismer vil variere mellom ulike arter av bakterier, mugg og gjær, men mugg og gjær har generelt en bedre evne til å vokse ved lav  $a_w$ . Figur 1 gir en oversikt over ulike typer mikroorganismer og minimum  $a_w$  som er nødvendig for vekst (Tapia et al., 2020).

Range of $a_w$	Microorganisms Inhibited by Lowest $a_w$ in this Range
1.00–0.95	<i>Pseudomonas</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. botulinum</i> E, G, some yeasts
0.95–0.91	<i>Salmonella</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> A, B, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i>
0.91–0.87	<i>Staphylococcus aureus</i> (aerobic), many yeasts ( <i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Hansenula</i> ), <i>Micrococcus</i> )
0.87–0.80	Most molds (mycotoxigenic penicillia), <i>Staphylococcus aureus</i> , most <i>Saccharomyces</i> ( <i>bailii</i> ) spp., <i>Debaryomyces</i>
0.80–0.75	Most halophilic bacteria, mycotoxigenic aspergilli
0.75–0.65	Xerophilic molds ( <i>Aspergillus chevalieri</i> , <i>A. candidus</i> , <i>Wallemia sebi</i> ), <i>Saccharomyces bisporus</i>
0.65–0.61	Osmophilic yeasts ( <i>Sacharomyces rouxii</i> ), a few molds ( <i>Aspergillus echinulatus</i> , <i>Monascus bisporus</i> )
< 0.61	No microbial proliferation

**Figur 1:** Minste  $a_w$  nødvendig for vekst av ulike mikroorganismer (Tapia et al., 2020).

Tørking av mat og reduksjon av  $a_w$  vil generelt forhindre mikrobiell vekst som vist over, men tørkeprosessen kan medføre utilstrekkelig mikrobiell inaktivering av enkelte bakteriearter som gjør det mulig for bakteriene å overleve i miljøer med lav  $a_w$  (Chiewchan et al., 2007). Noen typer bakterier kan være vanskelige å inaktivere i tørkede produkter forårsaket av forsvarsmekanismer som økt varmeresistans eller indusering av Viable but non-culturable (VBNC) stadie (Chiewchan et al., 2007; Kasler & Yousef, 2018). Metoder for å fjerne uønskede bakterier er også begrenset, og tørket frukt er like problematisk som andre typer produkter når det handler om å fjerne eventuelle patogene bakterier som har kontaminert produktet (Kasler & Yousef, 2018).

En rekke ulike patogene bakterier har vært koblet mot kontaminering av matprodukter med lav  $a_w$ , men som oftest ved tilstedeværelse av patogene bakterier er det ulike serovarer av *Salmonella* som har blitt identifisert. Sammenliknet med andre bakterier fra *Enterobacteriaceae* familien og andre ikke-sporedannende bakterier har forholdet av matbårne sykdommer tilknyttet utbrudd og tilbakekalling av mat med lav  $a_w$  vært forårsaket av *Salmonella*, noe som kan forklares ved *Salmonella* sin evne til å overleve tørre miljøer eller miljøer med lav  $a_w$  (Gurtler et al., 2014). For matprodusenter er derfor *Salmonella* en av de mest utfordrende bakteriene å forholde seg til (Majowicz et al., 2010).

Det er en stor utfordring å kontrollere patogene bakterier i matprodukter med lav  $a_w$ . Ofte blir råmaterialer prosessert og produsert under varierende forhold som fører til at det blir vanskelig å kontrollere og begrense kontaminering av patogene bakterier (Santillana Farakos & Frank, 2014). Patogene bakterier kan kontaminere produkter gjennom flere forskjellige steg av produksjonen: høsting, lagring, prosessering og pakking. Det er utrolig viktig å kontrollere og forhindre tilstedeværelse av skadedyr, støv og vann i produksjonslokaler siden de ofte kan medføre og fremme overlevelse og vekst av patogene bakterier (Santillana Farakos & Frank, 2014). Det finnes flere ulike veier for patogener å kontaminere næringsmidler med lav  $a_w$ , og det er derfor viktig å opprettholde gode hygienestandarder til produksjon av ulike produkter (Beuchat et al., 2013).

Et annet stort problem under produksjon av ulike næringsmidler er krysskontaminering. Krysskontaminering av næringsmidler kan bli forårsaket av ansatte i en bedrift, hvor dem kan være bærere av patogene bakterier. For eksempel kan bakteriene bli introdusert til produksjonslokale eller næringsmidler gjennom klær eller sko som de ansatte bruker (Podolak et al., 2010). Det er spesielt viktig å forsikre seg over at næringsmidler ikke blir kontaminert etter prosessering siden det ikke vil være flere produksjons steg som kan redusere eller ødelegge bakteriene som fører til en stor fare for konsumer ved inntak av næringsmiddelet (Beuchat et al., 2011).

Flere matprodukter med lav  $a_w$  er vanligvis beregnet til å være spiseklare («ready to eat» (RTE)) produkter, og det skal derfor ikke være nødvendig med forbehandling som steking eller koking før det blir spist. Slike produkter har også vanligvis veldig lang holdbarhetstid, noe som fører til at produksjon av denne typen produkter må følge strenge hygiene standarder (Santillana Farakos & Frank, 2014)

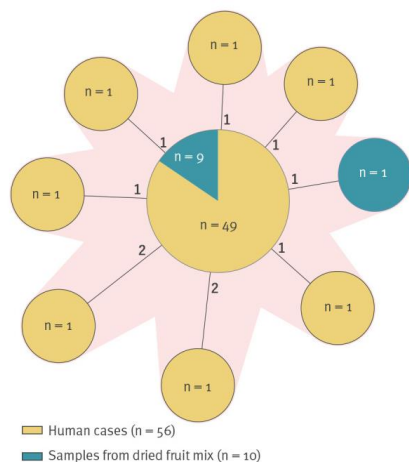
### 2.3 *Salmonella* i mat med lavt vanninnhold

#### 2.3.1 Utbrudd av *Salmonella* mat med lavt vanninnhold

Det er kjent at *Salmonella* kan overleve over lange perioder i tørket frukt (Beuchat & Mann, 2014), hvor flere *Salmonella* utbrudd har blitt knyttet til inntak av infisert tørket frukt som i 2018 hvor tørket kokos forårsaket et utbrudd av *Salmonella* Typhimurium i flere ulike stater i

USA (CDC, 2022) eller i 2019 i Norge hvor utbrudd av *Salmonella* Agbeni ble koblet til «eksotisk miks» som var en tørket fruktblending bestående av; kokos, rosiner, bananer, ananas og papaya (Johansen et al., 2021).

Etterforskningen fra utbruddet i Norge med helgenomsekvensering viste at utbruddsstammen var *S. Agbeni* (Figur 2), hvor alle bakterieprøvene tatt fra de 56 smittede menneskene og bakterieprøvene tatt fra «eksotisk miks», viste 2 eller mindre alleliske forskjeller mellom isolatene (Johansen et al., 2021). En allelisk forskjell mellom bakterier i samme stamme er forårsaket av en mutasjon av et gen som kan forårsake ulike fenotypiske egenskaper. Hos oss mennesker kan en slik allelisk forskjell være forskjell i blodtype (Voje, 2022). Denne alleliske forskjellen mellom bakteriene fra utbruddet visualiseres i Figur 2.



**Figur 2:** Viser spennetre for miljø (turkise)- og kliniske (gule) isolater fra utbrudd av *S. Agbeni* basert på core genome multilocus sequence typing analysis (cgMLST). Nummeret på grenene til spennetreet tilsier antallet av alleliske forskjeller mellom isolatene fra mennesker og «eksotisk miks» (Johansen et al., 2021).

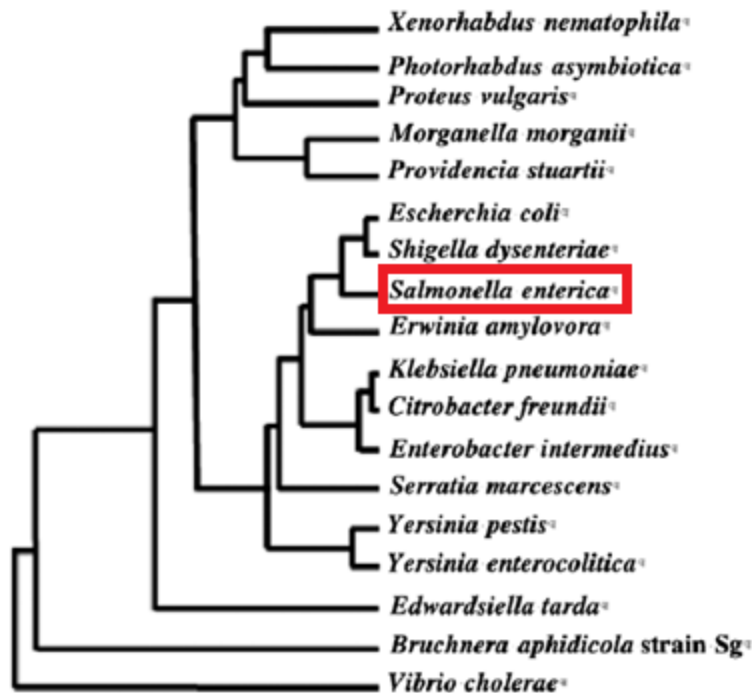
Historisk sett er ikke *Salmonella* i næringsmidler med lavt vanninnhold et nytt problem, hvor det ble oppdaget *Salmonella* i tørkede melkeprodukter på 1950-tallet. Problemet ligger i en stødig økning av utbrudd de siste 40 årene koblet til næringsmidler med lavt vanninnhold. I tillegg øker varmeresistansen til *Salmonella* i tørkede produkter slik at den overlever over en lengre tid, noe som spesielt vises ved lagring i kjøleskaptemperaturer (Podolak & Black, 2017).



På grunn av faren som medfører ved inntak av i næringsmidler med lavt vanninnhold er matprodusenter sterkt oppfordret til å utføre sikkerhetskontroller og tiltak for å ta for seg risikoen knyttet med *Salmonella* og andre patogener i næringsmidler med lavt vanninnhold (Podolak & Black, 2017).

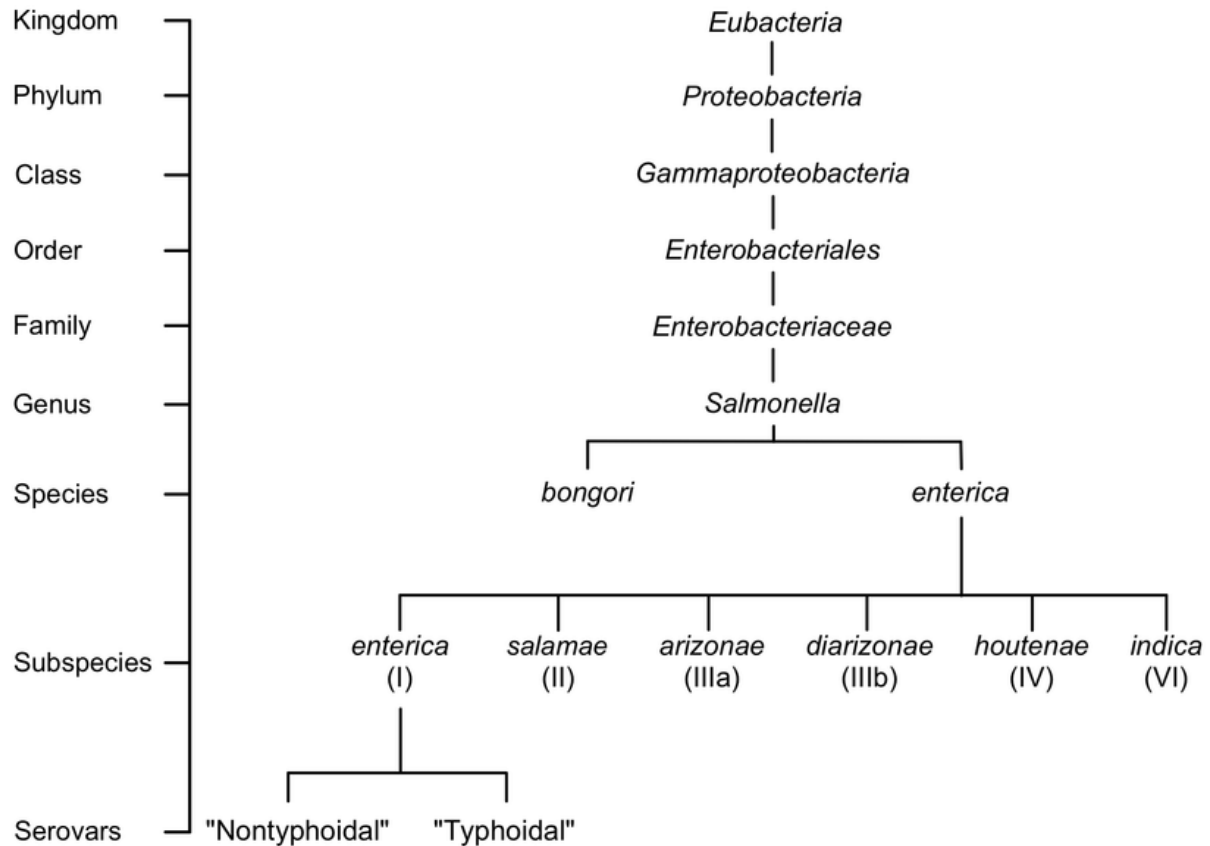
### 2.3.2 Tilhørighet og taxonomi i slekten *Salmonella*

*Salmonella* er en slekt av bakterier som er Gram-negative, ikke sporeformende og prokaryote staver. De er bevegelige ved bruk av flageller men kan også være ubevegelige i bakteriekulturer, og gjør opp en av hovedgruppene i Enterobacteriaceae familien (Mummy, 2014). Enterobacteriaceae familien består av tarmbakterier som kan ha både mennesker og dyr som vert. Eksempel på bakterier innenfor denne familien er *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Yersinia* og *Salmonella* (Bøvre, 2021), hvor Figur 3 viser det fylogenetiske treet til bakterier i Enterobacteriaceae familien. I matproduksjonsindustrien brukes Enterobacteriaceae som en hygiene indikator for å teste om produksjonsforholdene og personalhygiene er gode og rene nok, i tillegg til å detektere potensielle patogene bakterier i produktet deres (Cox et al., 1988; Lues & Van Tonder, 2007). Påvisning av Enterobacteriaceae er en metode som er brukt mye i mat- og vannproduksjons industrien og tilstedeværelse av disse bakteriene er ofte forårsaket av en fekal kontaminasjon (Mladenović et al., 2021). Viktige patogene bakterier fra Enterobacteriaceae familien er *Salmonella* spp. og *Shigella* spp., i tillegg til *E. coli* O157:H7 som er en av de viktigste patogene bakteriene i matsammenheng (Baylis et al., 2011).



**Figur 3:** *Fylogenetisk tre som viser slektskap mellom bakterieslekter og -arter i Enterobacteriaceae familien basert på 16S rDNA sekvenser. Salmonella enterica er markert med rød boks (Adams et al., 2006).*

I følge Su og Chiu (2007) finnes det to arter av *Salmonella* slekten: *Salmonella enterica* og *Salmonella bongori*. Antallet av *Salmonella* arter bør derimot ikke undervurderes, hvor *S. enterica* består av seks underarter (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diazarizonae*, *houtenae* og *indica*) med over 2500 forskjellige serovarer under *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, som vist er vist i Figur 4 (Popoff, 1997). Type serovar av *Salmonella enterica* bestemmes av biokjemiske og molekylærbiologiske metoder av blant annet hvilke antigener som er ligger i cellemembranen (Tønjum, 2023). Årsaken til denne inndeling av serovarer kommer av at nesten alle typer av *Salmonella enterica* forårsaker sykdom og epidemier, hvor man da har lyst til å vite akkurat hvilket serovar det omhandler, siden antigenet til serovaren vil reagere med spesifikke antistoffer hos verten (Tønjum, 2023). I følge Folkehelseinstituttet (2022) er de vanligste serovar variantene i Norge *Salmonella* Entititidis og *Salmonella* Typhimurium som står for totalt 70% av ikke-tyfoide isolater av *Salmonella*.



**Figur 4:** Generell klassifisering og taxonomi av *Salmonella* (MacKenzie et al., 2017).

Nesten alle stammene av *Salmonella* er patogene og har evnen til å forårsake sykdom, siden de har evnen til å invadere celler til verten, overleve og formere seg (Tønjum, 2023). *Salmonella* kan bli funnet overalt i naturen hvor infeksjon hos mennesker ofte er forårsaket på grunn av konsum av kontaminert mat eller vann. De vanligste matvarene som kontaminasjonskilde er kjøtt, rå melk, prosessert mat, frukt og egg (CDC, 2022; Mummy, 2014), hvor smittereservoaret innebærer de fleste varme og kaldblodige dyr (Folkehelseinstituttet, 2022). Salmonellose er en alvorlig sykdom forårsaket av *Salmonella* bakterien som kan føre til akutt gastroenteritt hvor symptomer kan være; diaré, magesmerter, hodepine, feber og kvalme hos et menneske (Mummy, 2014).

Hvert år er det antatt omkring 93,8 millioner tilfeller av salmonellose globalt, hvor 80,3 millioner av disse tilfellene er assosiert med inntak av kontaminerte matprodukter. I tillegg er

det estimert at *Salmonella* infeksjoner forårsaker 155 000 dødstilfeller hvert år (Majowicz et al., 2010).

Salmonellose fortsetter å være en stor bekymring for offentlig helse over hele verden (Mumy, 2014). Infeksjonsdosen nødvendig for å forårsake sykdom er relativt høy sammenlignet med andre medlemmer av Enterobacteriaceae, hvor den kan være fra 1000 til 100 000 bakterier. Infeksjonsdose som er nødvendig for å forårsake sykdom vil variere mellom ulike spesifikke serovar og deres fysiske tilstand (Mumy, 2014).

*Salmonella* inneholder en rekke ulike virulensfaktorer som hjelper bakterien til å overleve reisen gjennom magesekken, og for å komme seg inn i epitelcellene i tynntarmen. Epitelcellene blir invadert i tynntarmen ved å forårsake restrukturering av aktin som fører til at epitelcellen inntar bakterien (Mumy, 2014).

### 2.3.3 Overlevelse mekanismer for *Salmonella* i tørket produkt

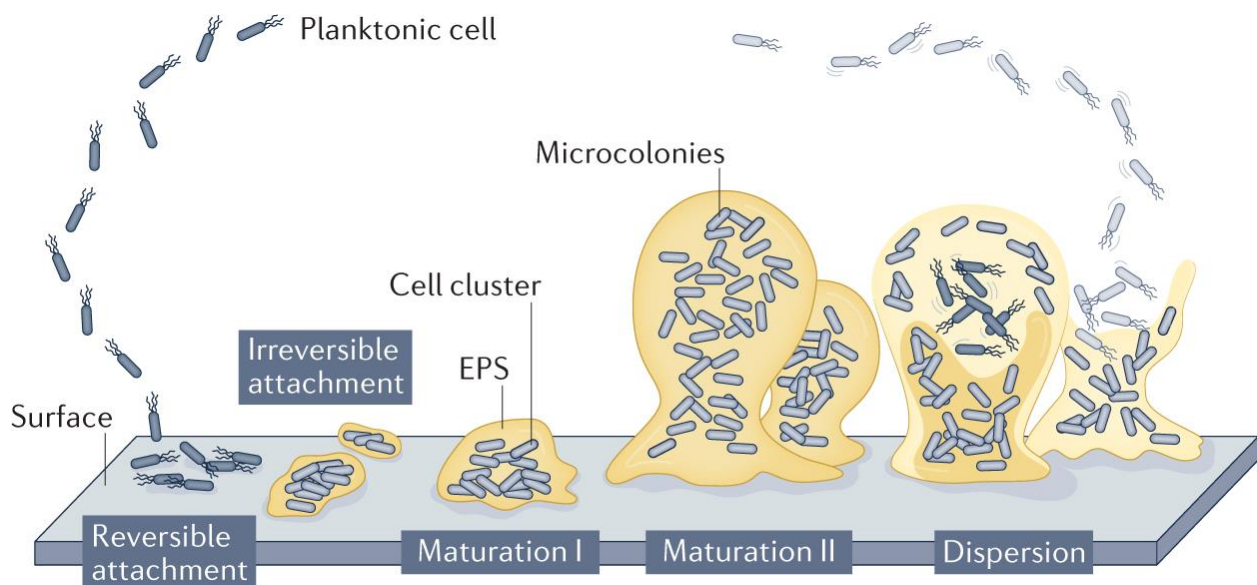
*Salmonella* bakterien har flere ulike mekanismer for overlevelse i miljøer med lav  $a_w$ , som innebærer blant annet opptak av molekyler som regulerer det osmotiske trykket, dannelse av biofilm og filamentering (Finn et al., 2013). I tillegg, som nevnt tidligere, kan *Salmonella* bli VBNC og gå inn i metabolsk sovende fase, om den blir utsatt for stress eller uønskede omgivelser (Oliver, 2010).

Den største utfordringen til bakterien ved tørking er å opprettholde vanninnholdet inne i cellen, samt å forhindre strukturelle ødeleggelse til nødvendige organeller i cellen, proteinstrukturer og DNA (Breeuwer, 2014). I mat med lavt vanninnhold vil bakterier prøve å holde på mest mulig vann som gjøres ved å opprettholde en osmotisk likevekt med omgivelsene. Dette gjøres ved å øke konsentrasjonen av løselige stoffer og molekyler i cellen, som  $K^+$  ioner, aminosyren prolin, glycine-betaine og ectoin (Csonka & Hanson, 1991) slik at det osmotiske trykket blir balansert mellom bakterien og omgivelsene og forhindrer bakteriene å tørke ut (Csonka, 1989). En annen forbindelse som *Salmonella* kan produsere for å balansere det osmotiske trykket, samt beskytte biologiske molekyler er disakkaridet trehalose (Furuki et al., 2009; Kempf & Bremer, 1998).

Biofilm er et komplekse mikrobiologiske samfunn hvor bakterier er festet til hverandre ved hjelp av ekstracellulære polymeriske stoffer, som for eks. polysakkarider. En biofilm kan bestå

av ulike bakterier som arbeider og kommuniserer sammen, noe som kan føre til økt metabolsk kapasitet og økt motstand mot endringer fra miljøet (Coenye, 2013).

Dannelse av biofilm vises i Figur 5 hvor bakterier først fester seg til en overflate ved bruk av flageller. Mengden flageller vil deretter reduseres og bakteriene vil begynne å produsere komponenter til biofilmmatrisen, som medfører irreversibel festing. Biofilmen vil deretter gjennomgå en modningsfase hvor bakteriene i biofilmen vokser og formerer seg helt til det dannes mikrokolonier innad i biofilmen. Det siste steget består av oppløsning av biofilmen slik at bakteriene blir spredd videre i miljøet (Sauer et al., 2022).



**Figur 5:** Prosessen for dannelse og utvikling av biofilm (Sauer et al., 2022).

Filamentering er forstørrelse av bakterieceller som medfører en større mengde biomasse. Denne prosessen forårsakes vanligvis av osmotisk stress som fører til en inhibering av celledelingsprosessen (Finn et al., 2013). En stor celledensitet hos bakterier kan være problematisk for matprodusenter siden det kan føre til en undervurdering av den potensielle bakteriemengden i produktet, hvor større bakterieceller ikke vil gi en høyere mengde CFU ved bruk av vanlige analysemetoder. Derimot vil mengde CFU øke betraktelig om bakteriene gjennomgår et berikningsledd, siden den økte celledensiteten gjør celledeling lettere ved gode vekstvilkår (Stackhouse et al., 2012).

#### 2.3.4 Viable but non-culturable (VBNC) bakterier

VBNC bakterier er bakterier som midlertidig har mistet sin evne til å vokse på ulike vekstmedia på grunn av stress eller uønskede omgivelser. Disse bakteriecellene er derimot ikke døde siden cellemembranen deres er hel og arvestoff ikke er ødelagt eller skadet (Cook & Bolster, 2007), i tillegg til at de utfører respirasjon og tar opp næringsstoffer som aminosyrer fra omgivelsene (Lleó et al., 1998). I følge Li et al. (2014) er det hittil bevist at 85 ulike bakteriearter som har mulighet til å utvikle VBNC hvor 67 av disse artene er patogene derav *Salmonella* er en av disse artene.

VBNC celler har flere likheter med vanlig levende celler, men det er en del forskjeller i form, cellevegg og cellemembran, metabolisme og virulens. VBNC er ofte mindre enn levende celler slik at størrelsen til overflate arealet øket i forhold til volum (Du et al., 2007). Metabolismen er i tillegg redusert og evnen til å tåle fysiske og kjemiske påkjennelser øker (Shleeva et al., 2004; Signoretto et al., 2000).

Bakterier som utvikler VBNC som følge av stress kan gjenoppta vekst igjen ved gode forhold, som betyr at VBNC er et stadie som er reversibelt (Baffone et al., 2006). Faktorer som stimulerer VBNC bakterieceller til å gjenoppta vekst kan variere veldig fra bakterie til bakterie (Chaveerach et al., 2003), hvor faktorer som stimulerer til gjenopptakelse kan være dyrking på næringsrikt medie, øking av veksttemperatur, tilstedeværelse av aminosyrer og tilstedeværelse av vertsceller (Li et al., 2014). I følge Gupte et al. (2003) kan VBNC *Salmonella* Typhimurium gjenopplives ved bruk det næringsrike mediet Tryptic Soy Agar i kombinasjon med en temperatur økning opp til 53°C. Kombinasjonen av ulike stress som *Salmonella* møter i tørket frukt kan indusere VBNC celler av *Salmonella* (Jayeola et al., 2022).

Evnen bakterier har til å bli VBNC er fordelaktig for bakterien selv siden det øker sjansen for overlevelse i uønskede omgivelser, men er problematisk og en fare for menneskelig helse siden mengden bakterier målt ved vanlige plateutspretningsmetoder vil gi et lavere antall enn det faktiske antallet i et matprodukt om VBNC bakterier er til stede. Dette kan være spesielt farlig om alle bakteriene i en prøve fra matindustrien er VBNC, hvor denne prøven kan bli bestemt for

å være bakteriefri selv om det er bakterier til stede. Om disse bakteriene i tillegg er patogene kan det føre til fare for liv og helse (Li et al., 2014).

## 2.4 Mål med oppgaven

Hovedmålet med denne oppgaven er å få mer kunnskap om overlevelse av *Salmonella* i kokosprodukter. En tidligere masteroppgave hadde vist at overlevelse av *Salmonella* i kokosprodukter var bedre enn i andre produkter av tørket frukt (Jacobsen, 2020). I denne oppgaven skal det undersøkes:

- (1) Hvordan *Salmonella* Typhimurium og *Salmonella* Agbeni overlever på kokosproduktene kokosterning og kokosflak på to ulike lagringstemperaturer 4°C og 20°C over en periode på fire måneder.
- (2) Om Real-time PCR egner seg for deteksjon av *Salmonella* i en belastningsstudie.

## 3 Material og metoder

### 3.1 Valg av prøvemateriale

Basert på tidligere resultater fra Jacobsen (2020) og i følge da Silva et al. (2022) som nevner at flere utbrudd av *Salmonella enterica* involverer tørket kokos, ble det valgt å bruke tørket kokos som prøvemateriale til prosjektet. Det ble bestemt å bruke to forskjellige kokosprodukter: kokosterninger som er kokosmasse bestående av 52% kokos og 48% sukker (Produsent, 2023) formet som terninger og kokosflak som er skivet og tørket kokos hvor en del av skallet er med. Dette gir mulighet for å se om form og areal til produktet kan ha en effekt på overlevelse av *Salmonella*.

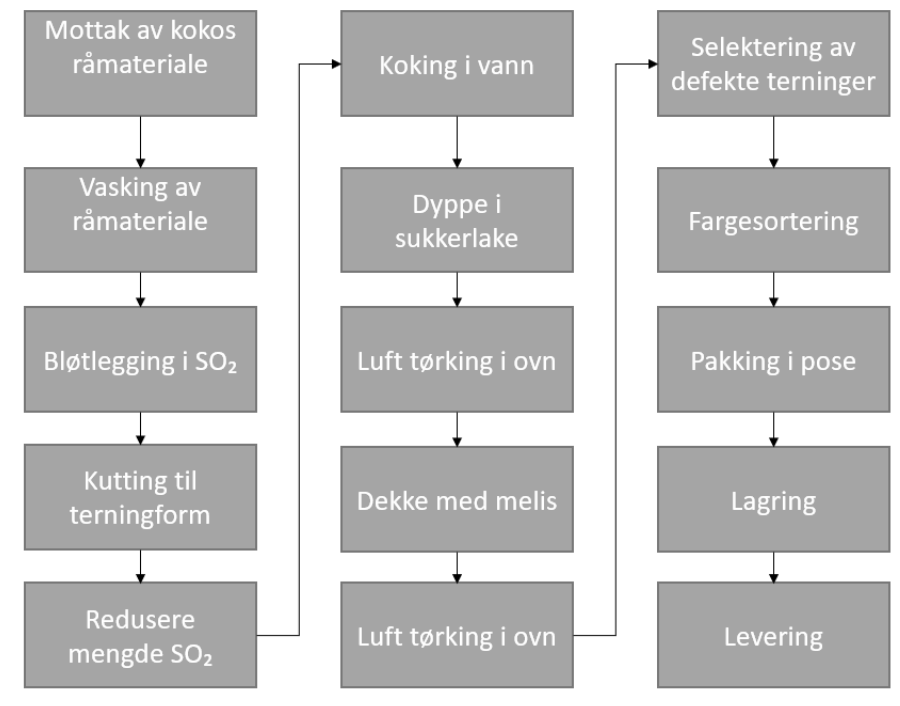
#### 3.1.1 Flytskjema over produksjon av prøvemateriale

Kokosterninger produsert i Ghana og kokosflak produsert i Thailand ble levert av produsent som i tillegg har gitt flytskjema over produksjon av kokosterninger. Produksjon av kokosterninger, vist i Figur 6, utføres ved å først bløtlegge kokosmateriale i SO<sub>2</sub> for å inhibere vekst av bakterier og deretter redusere mengden SO<sub>2</sub> slik at det er trygt for menneskelig konsum. Kokosen blir deretter kuttet til terninger og kokt i vann for å gjøre produktet mykere,

dypet i sukkerlake for smak og konservering og deretter tørket i ovn etterpå for å gjøre produktet tørt. Til slutt blir produktet dekket med melis og tørket i ovn som skaper et sukkerbelegg rundt produktet som både gir smak og hindrer uttørking.

Produksjon av kokosflak, vist i Figur 7, ble utført ved å dele kokosnøtter i to og varme dem i ovn for å tørke ut innmaten og gjøre det lettere å håndtere. Deretter blir det ytre kokosskallet fjernet og kokosinnmaten blir vasket og kuttet i skiver. Til slutt blir kokosinnmaten delt i skiver hvor en del av det indre skallet fortsatt er på, tørket i ovn og pakket i poser klar for levering.

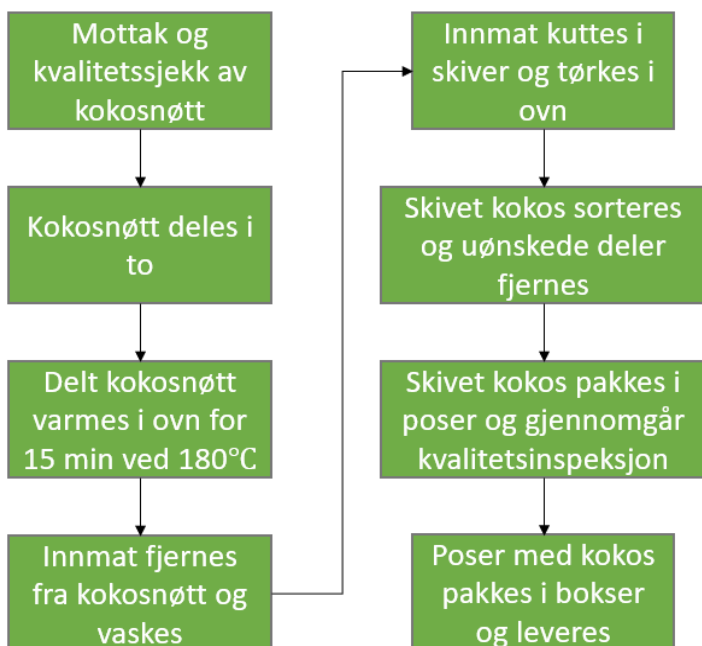
Flytskjema for produksjon av kokosterninger



**Figur 6:** Flytskjema over produksjon av tørket kokosterninger.



### Flytskjema for produksjon av kokosflak



**Figur 7:** Flytskjema over produksjon av kokosflak.

#### 3.1.2 Måling av vanninnhold og vannaktivitet i kokosterner og kokosflak

Siden vanninnhold og vannaktivitet er viktige parametere for vekst og overlevelse av bakterier i næringsmidler ble det bestemt å måle disse parameterene i kokosterner og kokosflak.

Vanninnhold ble målt ved å uttørke 3 paralleller hver av kokosterner og kokosflak i ovn over 24 timer. Vekt ble målt før og etter uttørking, hvor differansen i vekt etter tørking var vanninnholdet i produktet.

Vannaktivitet i kokosterner og kokosflak ble målt ved bruk av Novasina Labmaster-aw, hvor tre paralleller hver av kokosterner og kokosflak ble lagt i beger som ble satt inn i maskinen. Før måling av vannaktivitet ble kokosterner delt i fire for å redusere forholdet mellom volum og overflate, som gir et mer nøyaktig resultat.

#### 3.2 Bakteriologisk test av kokosterner og kokosflak

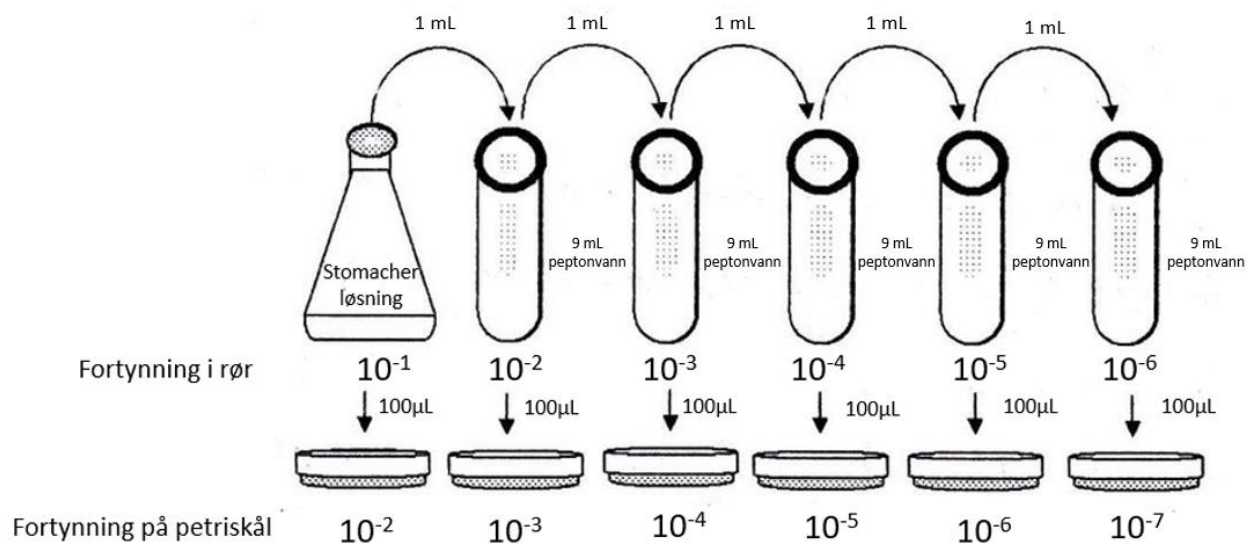
I forkant av det planlagte belastningsforsøket, var det nødvendig å utføre en bakteriologisk test av prøvemateriale for å kartlegge den nåværende mikrobiologiske kvaliteten og eventuelt

detektere antall av ulike typer bakterier. Kokosterninger og kokosflak ble analysert for: totalt aerobt kimtall ved bruk av Plate Count Agar (PCA), *Enterobacteriaceae* ved bruk av petrifilm og tilstedeværelse av *Salmonella* ved bruk av NMKL metode nr. 71.

NMKL metode nr 71. er en kvalitativ metode som betyr at det detekter om *Salmonella* er tilstede i næringsmiddelet eller ikke. Prinsippet går ut på å pre-anrike næringsmiddelet, homogenisere det ved bruk av en Stomacher og deretter plate ut på et selektivt medie og et annet passende medie.

### 3.2.1 Måling av aerobe bakterier og *Enterobacteriaceae*

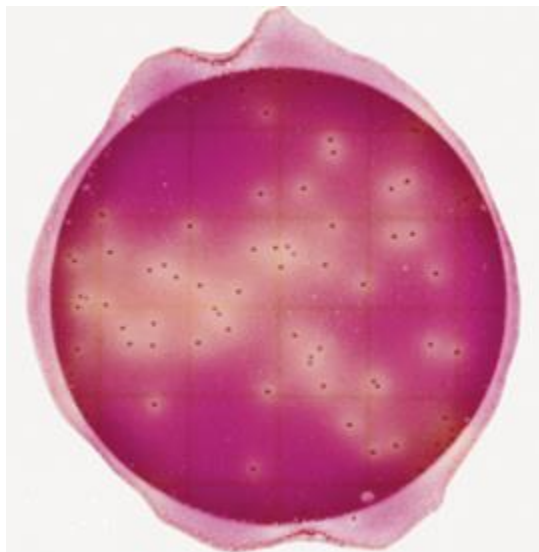
For måling av antall aerobe bakterier og *Enterobacteriaceae* test ble det brukt 3 paralleller hver av produktene, hvor 10 gram av prøvemateriale aseptisk ble veid opp og tilsatt peptonvann i forholdet 1:10. Peptonvann ble laget av 1g Bacteriological pepton (LP0034B, Oxoid) og 8,5 g NaCl (VWR) tilsatt 1 liter avionisert vann. Løsningen ble deretter homogenisert i en Stomacher (IUL Masticator) i 60 sekunder og en fortynningsrekke for hver parallell ble laget ned til  $10^{-3}$  fortynning ved å ta 1 mL fra stomacher-løsningen og blande ut med 9 mL peptonvann til ønsket fortynning er oppnådd. Figur 8 viser hvordan fortynningsrekke ble laget til og tilhørende fortynningsgrad for rør og petriskåler. Ved utplating på petriskål ble 100  $\mu$ L av ønsket fortynningsløsning pipettert på petriskål og deretter spredd jevnt på skålen ved å dra en steril L-formet stav opp og ned imens petriskålen ble rotert rundt.



**Figur 8:** Viser hvordan fortynningsrekke ble tillaget og grad av fortynning tilhørende hvert rør og hver petriskål. Modifisert fra (Thabit, 2014).

For måling av antall aerobe bakterier i produktene ble PCA (CM0325, Oxoid) brukt som medie, hvor det ble platet ut fortynning fra  $10^{-2}$  til  $10^{-4}$  ved å overføre 100µL løsning fra fortynningsrekken til PCA platene, og PCA platene ble deretter inkubert i varmeskap i 72 timer ved 37°C. Etter 72 timer ble kolonier telt og totalt kimtall regnet ut.

For måling av antall *Enterobacteriaceae* bakterier ble 3M™ Petrifilm™ Enterobacteriaceae brukt hvor det ble platet ut fortynninger fra  $10^{-1}$  til  $10^{-3}$  ved å overføre 1 mL løsning fra fortynningsrekken til petrifilmen ved å løfte det øverste laget, tilsette løsningen og forsiktig lukke laget slik at det ikke dannes luftbobler. Deretter ble petrifilmene inkubert i varmeskap i 24 timer ved 37°C. Etter 24 timer kunne kolonier telles som svarte prikker med et gult område rundt seg (3M, 2017), vist i Figur 9.



**Figur 9:** Positive kolonier av bakteriearter i Enterobacteriaceae familien på petrifilm med svart prikk og gult område rundt (3M, 2017).

### 3.2.2 NMKL metode Nr. 71 for deteksjon av salmonella i næringsmidler

Tre paralleller av kokosterninger og kokosflak ble laget hvor prøvematerialet først måtte pre-anrikes. Dette ble gjort ved å ta 25 gram prøvemateriale og tilsette til 225 mL bufret pepton

vann (CM1049, Oxoid). Prøvematerialet ble deretter inkubert ved 37°C i 18 timer i et varmeskap.

Etter inkubering ble 100µL av det pre-anrikede peptonvannet overført til 10mL Rappaport-Vassiliadis soya (RVS) buljong (CM0866, Oxoid) som var forvarmet til inkuberingstemperatur 42°C. Løsningen ble deretter inkubert i varmeskap ved 42°C i 24 timer.

En steril loop ble deretter brukt til å overføre RVS løsningen på xylose lysine desoxycholat (XLD) agar (CM0469, Oxoid) og på mannitol lysine crystal violet brilliant green (MLCB) agar (CM0783, Oxoid). Platene ble deretter inkubert opp-ned ved 37°C i et varmeskap i 24 timer. Ved vekst av *Salmonella* dannes det svarte kolonier på XLD agar (Microbiologie-Clinique, u.å-b) vist i Figur 10 og lilla-svarte kolonier på MLCB (Oxoid, u.å), og det kan konkluderes at *Salmonella* er detektert i 25 gram av prøvematerialet. Om det ikke er vekst av *Salmonella* kan det konkluderes at *Salmonella* ikke er detektert i 25 gram av prøvematerialet.



**Figur 10:** Utseende til *Salmonella* kolonier på XLD agar. (Foto: D. Braathen)

### 3.3 Belastningsforsøk i to kokosprodukter inokulert med *Salmonella*

#### 3.3.1 Tillaging og Kvantifisering av inokuleringsløsning

Før utførelse av et belastningsforsøk var det nødvendig å lage en inokuleringsløsning av *Salmonella* som tilsettes til prøvematerialet, siden prøvematerialet ikke inneholdt *Salmonella* bakterier fra før av. Basert på tidligere studier utført av Jacobsen (2020) ble det valgt å bruke en høy inokuleringsdose  $10^6$  *Salmonella*-bakterier siden antallet av bakterier er vist å synke over

tid. Stammene brukt til inokuleringsløsningen er *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (CCUG 11732T) og *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agbeni (VI 61548). Den ble velvillig gitt oss fra Veterinærinstituttet av Gro S. Johannessen for bruk i denne masteroppgaven. Det ble laget en inokuleringsløsning av hver *Salmonella* stamme ved å først dyrke opp renkulturer av stammene over natt på XLD agar og deretter overføre og blande ut de svarte koloniene til 1 mL peptonvann ved bruk av en steril loop. Løsningen ble deretter fortynnet til 50 mL med peptonvann.

Absorbans i løsningene ble målt med spektrofotometer (PharmaSpec UV-1700) ved OD<sub>600</sub>. I følge Jacobsen (2020) vil en absorbans over 0,600 ved OD<sub>600</sub> for *Salmonella* tilsvare en mengde med over 10<sup>6</sup> bakterier per mL. For å få en høy nok inokuleringsdose var det derfor viktig å oppnå en absorbans over 0,600 ved OD<sub>600</sub>. Absorbansen for inokuleringsløsningen til S. Agbeni ble målt til 0,689 og absorbansen til S. Typhimurium ble målt til 0,662.

For å kvantifisere inokuleringsløsningene ble det laget en fortynningsrekke fra 10<sup>-1</sup> til 10<sup>-7</sup> hvor 1 mL løsning ble tilsatt 9 mL peptonvann. Fortynningene ble deretter platet ut på XLD agar fra 10<sup>-2</sup> til 10<sup>-6</sup> og inkubert opp-ned i et varmeskap ved 37°C i 24 timer. Antall koloniformene enheter ble deretter telt og mengden *Salmonella* i inokuleringsløsningen ble beregnet.

I etterkant av inokuleringen av kokosproduktene ble en ny inokuleringsløsning av S. Agbeni og S. Typhimurium laget for å kvantifisere løsningene fra 10<sup>-3</sup> til 10<sup>-8</sup> fortynning ved å plate ut på XLD agar. Absorbansen for inokuleringsløsningen til S. Agbeni ble målt til 0,675 og absorbansen til S. Typhimurium ble målt til 0,626 ved OD<sub>600</sub>. Disse inokuleringsløsningene ble ikke tilsatt til kokos, men bare brukt for kvantifisering.

### 3.3.2 Oppsett av belastningsforsøk

Belastningsforsøket ble satt opp til å vare en periode over 4 måneder. Til belastningsforsøket ble det brukt sterile 100mL begre hvor halvparten av begrene ble aseptisk fylt med kokosterner og den andre halvparten ble aseptisk fylt med kokosflak. I hvert beger ble det veid opp 35 gram av et kokosprodukt slik at det ble nok materiale for tre paralleller per uttak hvor en parallell trenger 10 gram prøvemateriale. Disse begrene ble forseglett tett med lokk slik

at omgivelsene utenfor begeret har noen effekt på produktet, og ble oppbevart mørkt i romtemperatur til inokuleringsløsning ble tilsatt.

Halvparten av begrene med kokosflak ble tilsatt *S. Typhimurium* og den andre halvparten ble tilsatt *S. Agbeni*, med henholdsvis 0,662 og 0,689 i målt absorbans ved OD<sub>600</sub>. Tilsvarende ble gjort med kokosterninger. Dette ble gjort ved å overføre 1 mL inokuleringsløsning til hvert beger, sette på lokket og riste til løsningen var jevnt fordelt, for deretter å lufttørke hvert beger i 24 timer på en sterilbenk. Luft tørking av inokulerte kokosprodukter på steril benk vises i Figur 11.



**Figur 11:** Luft tørking av kokosterninger og kokosflak inokulert med *S. Typhimurium* og *S. Agbeni*.

Til slutt ble halvparten av kokosproduktene inokulert med *S. Typhimurium* lagret mørkt i skap ved romtemperatur og den andre halvparten lagret mørkt i kjøleskap. Tilsvarende ble gjort med

kokosproduktene tilsatt S. Agbeni. Boksene var helt lufttette slik at omgivelser i rom og kjøleskap ikke ville ha noen påvirkning på produktene.

De forskjellige parameterne under lagring var to forskjellige *Salmonella* stammer: S. Typhimurium og S. Agbeni, lagring ved romtemperatur (20°C) og kjøleskaptemperatur (4°C), og bruk av to ulike kokosprodukter: kokosterner og kokosflak. Antall ulike kombinasjoner av parametere er totalt 8, som betyr at det måtte gjøres klart totalt 88 beger for prøvematerialet for å kunne utføre 11 uttak i en periode over 4 måneder. Tabell 2 viser oppsett av kombinasjoner og antall prøver tilhørende til belastningsforsøket.

**Tabell 2:** Viser mengde beger av hver ulike kombinasjon, og totalt antall beger og paralleller.

Parametere	Antall beger	
	S. Typhimurium	S. Agbeni
Kokosterning + Lagring ved romtemperatur (20°C)	11	11
Kokosflak + Lagring ved romtemperatur (20°C)	11	11
Kokosterning + Lagring ved kjøleskaptemperatur (4°C)	11	11
Kokosflak + Lagring ved kjøleskaptemperatur (4°C)	11	11
<b>Totalt</b>	88 beger (tilsvarer 264 paralleller)	

### 3.3.3 Utførelse av belastningsforsøk

Det ble utført uttak etter: 1, 8, 16, 30, 43, 50, 64, 78, 92, 106 og 120 dager etter start av belastningsforsøk hvor tilstedeværelse av Salmonella ble analysert og kvantifisert, samt at en løsning av hver parallell fra hvert beger ble lagret for Real-time PCR.

Dette ble gjort ved å først måle opp 10 gram kokos fra hvert beger 3 ganger, og tilsette peptonvann i forholdet 1:10. Løsningene ble deretter blandet i stomacher i 60 sekunder og fortynnet i en fortynningsrekke ved å tilsette 1mL løsning til 9 mL peptonvann. Deretter ble

fortynningene platet ut på XLD agar ved å overføre 100µL løsning til skålen. Graden av fortynninger som ble platet ut for hver kombinasjon av parametere ble justert for hvert uttak slik at det ble platet ut for den fortynningsgraden hvor det vokste tellbare enkeltkolonier. XLD platene ble deretter inkubert opp ned ved 37°C i 24 timer før kolonier ble telt og kvantifisert.

På det siste uttaket ble det også fortynninger platet ut på Tryptic Soy Agar (TSA) (CM0131, Oxoid) for å undersøke tilstedeværelsen til levende bakterier. Platene ble inkubert opp ned ved 37°C i 24 timer før kolonier ble telt og kvantifisert.

### 3.4 Real-time PCR for deteksjon av *Salmonella*

For preparering til Real-time PCR ble 50mL av hver stomacherløsning fra hvert uttak fylt i en 50mL steril rør. Denne løsningen ble sentrifugert (Heraus Megafuge 8R Centrifuge) i 10 min ved 9500 rpm. Supernatanten ble deretter forsiktig fjernet slik at det var ca. 1 mL løsning igjen i tillegg til pelleten. Pelleten ble så løst i resten av løsningen og 1mL av denne løsningen ble overført på mikrotuber som igjen ble sentrifugert (Heraus Fresco 21 Centrifuge) ved 14800 rpm i 5 minutter. Supernatant ble deretter forsiktig fjernet og den resterende pelleten i microtuben ble fryst ned ved -20°C til senere analyse

Real-time PCR ble utført ved bruk av SureTect™ *Salmonella species* PCR Assay kit (ThermoFisher, PT0100A), hvor innholdet er vist i tabell 3.

**Tabell 3:** *Innhold i SureTect™ Salmonella species PCR Assay kit. Denne analysen inneholder både reagenser til DNA isolering og til PCR analyse.*

Innhold	Mengde
Lysis Reagens brønner	12 remser med 8 brønner hver
Lysis Brønn lokk	12 remser med 8 lokk hver
Proteinase K	1 tube (1,2 mL)
Salmonella PCR brønner	12 remser med 8 brønner hver, 1 pellet i hver brønn
Optiske PCR lokk	12 remser med 8 lokk hver



Til utførelsen av Real-time PCR ble først de nedfrosne mikrorørene tilsatt 1mL sterilt peptonvann og pelleten ble løst i dette vannet for å gjenopprette lik konsentrasjon som før frysing. Deretter ble manualen til produsenten fulgt ved DNA isoleringen og PCR analysen. Det startet med en remse med Lysis Reagens brønner som ble satt i romtemperatur i 5 minutter før den ble sentrifugert og åpnet. Hver brønn ble det 10µL Proteinase K. Deretter ble 10µL løsning fra et mikrorør med prøve tilsatt i en brønn og 10µL løsning fra en annen prøve ble tilsatt i en annen brønn helt til alle 8 brønnene var fylt. Remsen med Lysis Reagens brønner ble så forseglet med lokk. Dette ble gjentatt til ønsket mengde remser hadde blitt gjort klart. For hver analyse ble en brønn tilsatt 10µL sterilt peptonvann i stedet for prøveløsning for å være en non-template control (NTC), altså en negativ kontroll.

Alle Lysis Reagens remsene ble deretter inkubert i et PCR instrument hvor program for temperatur og tid er vist i tabell 4.

**Tabell 4:** Program brukt til inkubering av Lysis Reagens remser

Steg	Temperatur	Tid
Varm opp lokk	105°C	For hele programmet
1	37°C	10 minutter
2	95°C	5 minutter
3	10°C	2 minutter
4	4°C	Hold til bruk

Under inkubering av Lysis Reagens remser ble Salmonella PCR remser gjort klart ved å la dem stå i romtemperatur i 5 minutter for å bli tempererte. Etter endt inkubering ble 20µL fra hver Lysis Reagens brønn tilsatt sin respektive brønn i Salmonella PCR remsen og PCR remsene ble deretter forseglet med optiske PCR lokk. Hver brønn i hver PCR remse ble deretter ristet forsiktig og så spunnet i 10 sekunder for å fjerne bobler og for å samle væske i bunn.

For Real-time PCR analyse ble det brukt QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (A28133) og programvaren RapidFinder™ Analysis Software v1.2 ble lastet ned på forhånd

Ferdigpreparerte PCR remser ble satt på riktig posisjon i brett som var bestemt på forhånd i Rapidfinder™ og satt i PCR instrumentet for så å bli analysert.

Alle prøvene fra parallell 2 av uttakene ble brukt til real-time PCR analyse, samt prøver fra uttak 4 til uttak 11 fra parallell 1, 1 positiv kontroll av hver *Salmonella* stamme og null prøvene av kokosterner og kokosflak fra uttakene.

### 3.5 Statistiske analyser

Statistisk analyse ble utført ved bruk av IBM SPSS Statistics, versjon 27. T-test og 2-veis ANOVA ble utført for å undersøke statistisk signifikante forskjeller ( $p < 0.05$ ) av *Salmonella* stammer, type kokosprodukt og oppbevaringstemperatur over tid.

## 4 Resultater

### 4.1 Vanninnhold og vannaktivitet i kokosterninger og kokosflak

Gjennomsnittlig vanninnhold for kokosterninger (målt i % av totalvekt) var  $9,75 \pm 0,65$ , og for kokosflak var  $2,23 \pm 0,09$  (Tabell 5). Gjennomsnittlig vannaktivitet for kokosterninger ble analysert til  $0,55 \pm 0,00$ , og for kokosflak ble analysert til  $0,33 \pm 0,00$ .

**Tabell 5:** Gjennomsnittlig vanninnhold (gitt i % av totalvekt) og vannaktivitet i prøver av kokosterninger og kokosflak.

Prøve	Gjennomsnittlig vanninnhold (%)	Gjennomsnittlig vannaktivitet
Kokosterning	$9,75 \pm 0,65$	$0,55 \pm 0,00$
Kokosflak	$2,23 \pm 0,09$	$0,33 \pm 0,00$

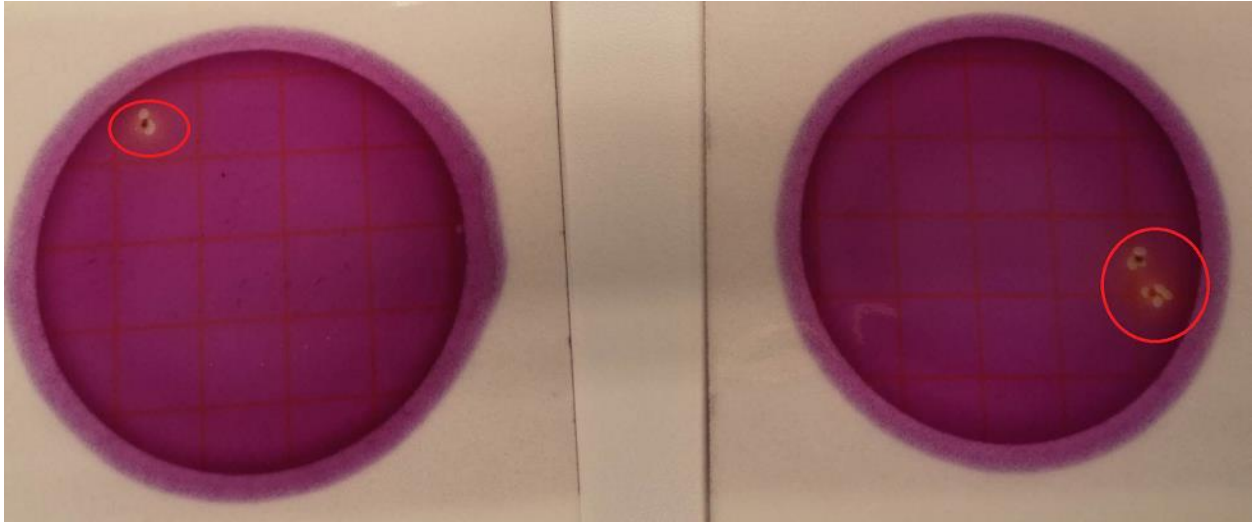
### 4.2 Mikrobiell status i kokosterninger og kokosflak før oppstart av belastningsforsøket

#### 4.2.1. Analyse av totalt kimtall og bakterier i familien *Enterobacteriaceae* på kokosterninger og kokosflak

Den mikrobielle kvaliteten på de tørkede produktene som skulle benyttes i eksperimentet ble analysert med parameterene Totalt kimtall på PCA, og *Enterobacteriaceae* på forhånd. Det ble funnet hverken aerobe bakterier eller bakterier i familien *Enterobacteriaceae* på kokosterninger vist i tabell 6. På kokosflak ble det funnet  $3,69 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$  av aerobe bakterier og noen få kolonier av *Enterobacteriaceae*. Koloniene av *Enterobacteriaceae* vises med rød ring i Figur 12, hvor mengde kolonier var under deteksjonsgrensen og derfor ikke kunne få en  $\text{Log}_{10} \text{ CFU}$  verdi. Antall *Enterobacteriaceae* i tabell 6 er derfor null, selv om det kan være kolonier med bakterier i familien *Enterobacteriaceae* til stede på kokosflakene.

**Tabell 6:** Totalt kimtall og *Enterobacteriaceae* i kokosterninger og kokosflak gitt i  $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ .

Analyse	Produkt	
	Kokosterning	Kokosflak
Aerobe bakterier ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )	1	3,69
<i>Enterobacteriaceae</i> ( $\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$ )	1	1



**Figur 12:** Sorte kolonier av bakterier i familien Enterobacteriaceae med gul gassdannelse rundt seg på petrifilm, fra prøver av kokosflak. (Foto: D. Braathen)

#### 4.2.2 Deteksjon av *Salmonella* i kokosterninger og kokosflak

Det var ingen vekst av *Salmonella* hverken i kokosterninger eller kokosflak på XLD og MLCB agar. Derimot som vist i Figur 13 var det utypisk vekst på både XLD og MLCB agar for prøvene av kokosflak. Typiske kolonier av *Salmonella*, beskrevet i kapittel 3.2.2, på XLD agar er svarte kolonier og på MLCB agar er svart-lilla kolonier, hvor veksten på MLCB agar var hvit-lilla og veksten på XLD agar var gul, samt at agaren ble farget gul.



**Figur 13:** Viser utypisk vekst fra prøver av kokosflak på MLCB agar (til venstre) og XLD agar (til høyre).  
(Foto: D. Braathen)

Gjennom belastningsforsøket ble den samme utypiske veksten observert på XLD agar for prøver av kokosflak som førte til gult medium i petriskålen.

### 4.3 Overlevelse av *Salmonella* i tørkede kokosprodukter

#### 4.3.1 Kvantifisering av inokuleringsløsningene

Inokuleringsløsningene brukt til belastningsforsøket besto av serovarene *S. Typhimurium* og *S. Agbeni*, hvor absorbansen til løsningen av *S. Typhimurium* ble målt til 0,662 ved OD<sub>600</sub> og løsningen av *S. Agbeni* ble målt til 0,689 ved OD<sub>600</sub>. Disse inokuleringsløsningene ble fortynnet ned til 10<sup>-6</sup> og platet ut på XLD agarplater, hvor fortynning for 10<sup>-6</sup> var overgrodd. Dette betyr at inokuleringsløsningene begge hadde mer enn 10<sup>6</sup> bakterier per mL med inokuleringsløsning som var det som var ønsket til belastningsforsøket.

Det var ønsket å få et eksakt antall CFU/mL på inokuleringsløsningene, og det ble derfor laget til nye inokuleringsløsninger av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* med samme absorbans som ble ytterligere fortynnet ned til 10<sup>-8</sup> og platet ut. Absorbansen til denne løsningen av *S. Typhimurium* ble målt til 0,626 ved OD<sub>600</sub> og løsningen av *S. Agbeni* ble målt til 0,675 ved OD<sub>600</sub>. Resultater gitt i Log<sub>10</sub> CFU/mL for totalt antall bakterier av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* vises i tabell 7.

**Tabell 7:** Totalt antall av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* i ny inokuleringsløsning gitt i Log<sub>10</sub> CFU/mL.

Stamme	Absorbans ved OD <sub>600</sub>	Antall bakterier (Log <sub>10</sub> CFU/mL)
<i>S. Typhimurium</i>	0,626	7,96
<i>S. Agbeni</i>	0,675	8,38

#### 4.3.2 Overlevelse av *Salmonella* inokulert i kokosterninger og kokosflak

Gjennom uttakene ble *Salmonella* kvantifisert for de ulike parameterene (serovar, temperatur, produkt) ved bruk av plateutspredning på XLD agar. Overlevelseskurvene etter inokulering gitt i Log<sub>10</sub> CFU/g-verdier for *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* i kokosterninger og kokosflak er vist i Figur 14.



**Figur 14:** Overlevelseskurver for *S. Typhimurium* (øverst) og *S. Agbeni* (nederst) inokulert i kokosterner og kokosflak og lagret i romtemperatur og kjøleskapstemperatur. «Typ» er *S. Typhimurium*, «Agb» er *S. Agbeni*, «Rom» er lagring ved romtemperatur (20°C), «Ks» er lagring ved kjøleskapstemperatur (4°C), «KT» er kokosterning og «KF» er kokosflak.

*S. Typhimurium* viser bedre overlevelsessevne på kokosflak enn kokosterning, hvor *S. Typhimurium* lagret ved romtemperatur på kokosterning ikke lenger var kvantifiserbar etter 17 dager, og *S. Typhimurium* inokulert på kokosterning og lagret ved kjøleskaptemperatur ikke var lenger kvantifiserbar etter 78 dager. I motsetning var både *S. Typhimurium* inokulert på kokosflak ved romtemperatur og kjøleskaptemperatur kvantifiserbar etter 120 dager. Økt overlevelsessevne vises også ved lagring i kjøleskaptemperatur, hvor *S. Typhimurium* på kokosterninger og kokosflak overlevde lenger og hadde et høyere antall CFU/g i kjøleskaptemperatur enn romtemperatur.

*S. Agbeni* inokulert i kokosterninger og kokosflak viser veldig lik overlevelsessevne lagret ved kjøleskaptemperatur. *S. Agbeni* tilsatt kokosflak og lagret i romtemperatur har en litt lavere overlevelsessevne enn *S. Agbeni* lagret ved kjøleskaptemperatur, men den største forskjellen er hos *S. Agbeni* tilsatt kokosterninger lagret i romtemperatur som ikke lenger var mulig å kvantifisere etter 64 dager.

På det siste uttaket til belastningsforsøket ble prøvene i tillegg til å bli platet ut på XLD agar, også platet ut på TSA. Log<sub>10</sub> CFU/g verdiene fra det siste uttaket viser at prøvene platet ut på TSA har generelt høyere verdi enn XLD utenom prøver av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* lagret på kokosterninger i romtemperatur (20°C) hvor det ikke var vekst på både TSA og XLD, og prøve av *S. Typhimurium* lagret på kokosflak i romtemperatur (20°C) hvor det ikke var vekst på TSA, men vekst på XLD (Tabell 8).

**Tabell 8:** Log<sub>10</sub> CFU/g verdi for de ulike kombinasjonene av lagringsparameterene ved det siste uttaket platet ut på XLD agar og TSA. «Typ» er *S. Typhimurium*, «Agb» er *S. Agbeni*, «Rom» er lagring ved romtemperatur (20°C), «Ks» er lagring ved kjøleskapstemperatur (4°C), «KT» er kokosterning og «KF» er kokosflak. Verdier i Log<sub>10</sub> CFU/g gitt som 0 (ingen vekst), ble gitt antall 1 i CFU/g.

Kombinasjon av lagringsparametere	XLD (Log <sub>10</sub> CFU/g)	TSA (Log <sub>10</sub> CFU/g)
Typ Rom KT	0	0
Typ Rom KF	2	0
Typ Ks KT	0	3,52

<i>Typ Ks KF</i>	3,84	4,56
<i>Agb Rom KT</i>	0	0
<i>Agb Rom KF</i>	4,10	5,84
<i>Agb Ks KT</i>	4,92	6,08
<i>Agb Ks KF</i>	5,55	6,73

#### 4.3.3 Statistiske analyser av overlevelsesverdiene til *S. Typhimurium* og *S. Agbeni*

Det ble utført en t-test for å sammenlikne mengde bakterier gjennom hele belastningsforsøket av stammene *S. Typhimurium* og *S. Agbeni*. Det var statistisk signifikant forskjell mellom de to serovarene for alle uttakene. Det ble derfor valgt å utføre 2-veis Anova for hver enkelt stamme for å se hvilken effekt lagringsbetingelser og produkt har på hver stamme.

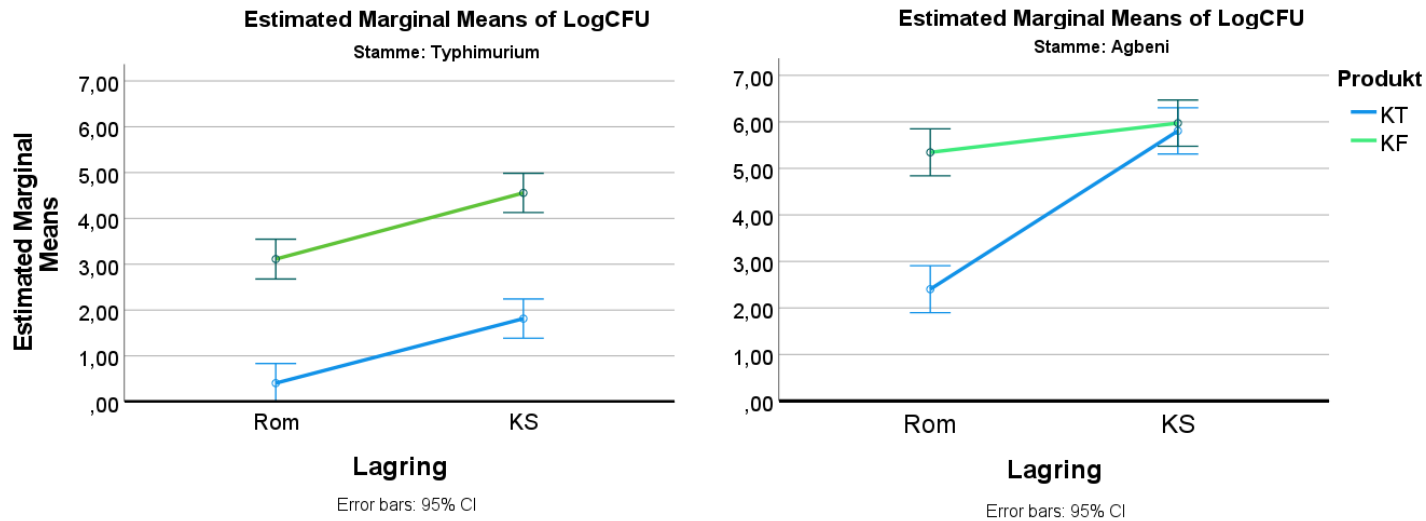
**Tabell 9:** Viser P-verdi til Lagringstemperatur, Produkt og interaksjon mellom Lagringstemperatur og Produkt for *S. Typhimurium* og *S. Agbeni*.

Stamme	Variabel	P-verdi
<i>S. Typhimurium</i>	Lagringstemperatur	0,000
	Produkt	0,000
	Lagringstemperatur*Produkt	0,934
<i>S. Agbeni</i>	Lagringstemperatur	0,000
	Produkt	0,000
	Lagringstemperatur*Produkt	0,000

For både *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* ga ulik lagringstemperatur og lagring av de to ulike produktene en statistisk signifikant forskjell hvor p-verdien for variablene er 0,000 (Tabell 9). Dette tilsier at overlevelsesevnen til *Salmonella* er ulik ved de ulike lagringsbetingelsene. Dette vises i Figur 15 for *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* hvor det gjennomsnittlige antallet av *Salmonella* på kokosflak er høyere enn kokosterning og det gjennomsnittlige antallet av *Salmonella* er høyere for lagring ved kjøleskapstemperatur enn ved romtemperatur.



For *S. Typhimurium* var det ikke signifikant interaksjon mellom lagringstemperatur og produkt (p-verdien var 0,934), men for *S. Agbeni* var det en signifikant interaksjon (mengde bakterier er avhengig av kombinasjonen til parameterene) mellom lagringstemperatur og produkt hvor p-verdien var 0,000. Forskjellen kan sees i Figur 15 for *S. Agbeni*, hvor det ikke er en statistisk signifikant forskjell mellom antall *Salmonella* bakterier for kokosflak og kokosterninger lagret ved kjøleskapstemperatur, men en statistisk signifikant forskjell ved romtemperatur.



**Figur 15:** Gjennomsnittlig mengde av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* gjennom belastningsforsøket lagret ved romtemperatur (Rom) og kjøleskaptemperatur (KS), og lagret på kokosterninger (KT) og kokosflak (KF).

Det ble utført statistisk analyse på lagringsparameterene Temperatur og Produkt for *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* for hvert enkelt uttak. Resultatene i Tabell 10 viser for *S. Typhimurium* at det var signifikant forskjell mellom lagringstemperaturene fra og med uttak 2 og at det var signifikant forskjell mellom produktene fra og med uttak 1. For *S. Agbeni* var det signifikant forskjell mellom lagringstemperaturene på uttak 1 og, fra uttak 4 til uttak 11. Det var signifikant forskjell mellom produktene på uttak 3 og fra uttak 5 til uttak 11.

**Tabell 10:** P-verdier for *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* ved lagringsparameterene temperatur (romtemperatur og kjøleskaptemperatur) og produkt (kokosterninger og kokosflak) for hvert uttak

Dag (uttak)	Lagringsparameter	P-verdi ( <i>S. Typhimurium</i> )	P-verdi ( <i>S. Agbeni</i> )
1 (1)	Temperatur	0,992	0,032
	Produkt	0,012	0,055
8 (2)	Temperatur	0,002	0,167
	Produkt	0,000	0,293
16 (3)	Temperatur	0,000	0,327
	Produkt	0,000	0,020
30 (4)	Temperatur	0,000	0,027
	Produkt	0,000	0,236
43 (5)	Temperatur	0,000	0,001
	Produkt	0,000	0,014
50 (6)	Temperatur	0,017	0,000
	Produkt	0,001	0,000
64 (7)	Temperatur	0,021	0,000
	Produkt	0,000	0,000
78 (8)	Temperatur	0,014	0,000
	Produkt	0,001	0,000
92 (9)	Temperatur	0,000	0,000
	Produkt	0,000	0,000
106 (10)	Temperatur	0,010	0,000
	Produkt	0,000	0,000
120 (11)	Temperatur	0,012	0,000
	Produkt	0,000	0,000

#### 4.4 Real-time PCR av prøver fra kokosterninger og kokosflak

Deteksjon av *Salmonella* ved bruk av Real-time PCR ble utført på renkulturer av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* samt på de samme stomacherløsningene av inokulerte kokosterninger og kokosflak som ble brukt til utplating på XLD. I tillegg ble nullprøver av kokosterninger og kokosflak fra belastningsforsøket analysert.

Av inokulerte kokosterninger og kokosflak ble 173 prøver testet hvor alle prøvene var positive (Tabell 11). Renkulturprøven av *S. Typhimurium* og renkulturprøven *S. Agbeni* var også positive, og resultater fra kontrollprøvene (Nullprøver og NTC) var negative for *Salmonella* (Tabell 11).

**Tabell 11:** Viser antall prøver til Real-time PCR og hvor mange av prøvene som er positive (tilstedeværelse av *Salmonella*) og negative (fravær av *Salmonella*).

Prøve	Antall	Positive	Negative
Renkultur av <i>S. Typhimurium</i>	1	1	0
Renkultur av <i>S. Agbeni</i>	1	1	0
Inokulerte kokosterninger og kokosflak	173	173	0
Nullprøve kokosterning	9	0	9
Nullprøve kokosflak	5	0	5
NTC (Non Template Control)	6	0	6

## 5 Diskusjon

### 5.1 Vanninnhold og vannaktivitet i kokosterninger og kokosflak

Vanninnhold og vannaktivitet er viktige parametere som kan si noe om det er mulig for mikroorganismer å vokse i et næringsmiddel, hvor vannaktivitet under 0,60 er tilstrekkelig for å hindre all vekst av mikroorganismer (Jay et al., 2008). Måling av vanninnhold og vannaktivitet ble derfor utført i dette prosjektet for å undersøke hvordan overlevelsesholdene til mikroorganismer på kokosflak og kokosterninger var.

Vannaktiviteten til både kokosterninger og kokosflak var under 0,60. Begge produktene er derfor tilstrekkelig lagringsstabile slik at det vil være utfordrende for eventuelle bakterier i produktene å overleve.

### 5.2 Mikrobiell status i kokosterninger og kokosflak

Før utført belastningsforsøk ble den mikrobielle statusen til kokosterninger og kokosflak undersøkt for å undersøke eventuelle bakterier som allerede er tilstede i produktene. Det ble ikke funnet aerobe bakterier eller *Enterobacteriaceae* på kokosterninger og det ble funnet 3,69 Log<sub>10</sub> CFU/g aerobe bakterier på kokosflak i tillegg til at *Enterobacteriaceae* var til stede på kokosflak, men som ikke kunne kvantifiseres grunnet for lavt antall kolonier på petrifilm.

Den mikrobiologiske forskjellen mellom kokosterninger og kokosflak kan forklares i forskjellen produksjonslokale, hvor det kan være en forskjell i miljøet og produksjonshygiene som de ulike produktene er produsert i. I følge de Silva et al. (2017) som utførte mikrobiologiske prøver av produksjonslokalene til tørket kokosnøtt i Sri Lanka, medførte de tørre sonene av produksjonslokalet liten mulighet for kontaminasjon og de våte sonene, der vann ble brukt, større risiko for kontaminasjon av produktet hvor antall bakterier i våt sone var betraktelig høyere. For å senke muligheten for kontaminasjon ble det derfor foreslått oftere utbytting av vann brukt i produksjon. Dette stemmer overens med Beuchat et al. (2013) som sier at kontroll på vann og fuktighet under produksjon av tørket frukt er viktig for å kontrollere mikrobiell vekst. Utilstrekkelig kunnskap eller muligheter for å gjøre endring i produksjonslokale kan derfor være en årsak til den mikrobielle forskjellen mellom kokosterninger og kokosflak (Beuchat et al., 2013).

Det var detektert null vekst av *Salmonella* på kokosterninger og kokosflak ved spredning på XLD og MLCB agar. Derimot var det utypisk vekst på prøver av kokosflak som førte til at XLD agar ble farget gul med gule kolonier og MLCB agar ble lysere i fargen med lyse og hvite kolonier vist i Figur 13.

I følge Microbiologie-Clinique (u.å-b) kan bakterier som har mulighet til å fermentere laktose eller sukrose danne gule kolonier på XLD agar, hvor eksempler på slike bakterier er *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter koseri* og *Yersinia enterocolitica*. Det er da en mulighet at det kan være tilstedeværelse av en eller flere av disse bakteriene på kokosflak, spesielt siden det ble målt tilstedeværelse av *Enterobacteriaceae* på kokosflak og alle dem nevnte bakteriene var en del av *Enterobacteriaceae* familien (Adams et al., 2006).

For MLCB agar nevner Oxoid (u.å) at de fleste bakteriene som har evnen til å vokse på mediet utvikler seg som fargeløse kolonier. I Figur 13 vises det at bakteriekoloniene som har vokst på MLCB agaren ikke har noen farge utenom et lilla skjær som kommer fra selve agaren. Likt som med XLD agar tyder dette på at det er andre bakterier enn *Salmonella* til stede på kokosflak.

Siden det ikke ble detektert tilstedeværelse av *Salmonella* i kokosterninger eller kokosflak på hverken XLD eller MLCB agar betyr det at mengde *Salmonella* bakterier målt under belastningsforsøket er representativ for mengde *Salmonella* bakterier tilsatt i kokosproduktene. Det vil dermed ikke være *Salmonella* bakterier der fra før av som kan forårsake en høyere målt bakteriemengde enn den mengden som ble inokulert ved forsøket.

### 5.3 Overlevelse av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* tilsatt i kokosterninger og kokosflak

Inokuleringsnivået i dette prosjektet var høyere enn det som vanligvis observeres i tørkede produkter, men for å kunne evaluere overlevelse i løpet av en lang lagringsperiode er det høye nivået nødvendig (Flock et al., 2022; Jayeola et al., 2022). Det ble brukt inokuleringsdose ( $10^6$  eller høyere med *Salmonella* bakterier) for å undersøke hvordan en mengde bakterier som kan forårsake sykdom hos et menneske overlever over tid (Mummy, 2014). I følge Jacobsen (2020) sine resultater tilsvarer en absorbans over 0,600 ved  $OD_{600}$  for inokuleringsløsningen en bakteriemengde på  $10^6$  bakterier.

Absorbans målt til inokuleringsløsningene brukt til belastningsforsøket for *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* var henholdsvis 0,662 og 0,689. I tillegg ble inokuleringsløsningene platet ut på XLD agar som var overgrodd ved  $10^{-6}$  fortynning. Kokosterninger og kokosflak ble derfor inokulert med mer enn  $10^6$  per mL av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* som var den ønskelige mengden.

Selv om inokuleringsløsningene ble målt til relativ lik absorbans gjenspeiles ikke dette mengde bakterier i prøver av kokosterning og kokosflak hvor det var en signifikant forskjell i mengde av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* fra første uttak, der mengde *S. Agbeni* lå mellom 6-7 Log<sub>10</sub> CFU/g og mengde *S. Typhimurium* lå mellom 4-5 Log<sub>10</sub> CFU/g. Ved gjenoppliving av fryste bakteriekulturer av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* som ble brukt til belastningsforsøket dannet *S. Typhimurium* færre kolonier på XLD agar enn *S. Agbeni*. Dette kunne også observeres ved ompoding av levende bakterier på ny XLD agar skål, som kan bety at *S. Typhimurium* stammen som er brukt til belastningsforsøket ikke vokser like lett på XLD agar som det *S. Agbeni* gjør.

Overlevelseskurven av *S. Typhimurium* og *S. Agbeni* i Figur 14 viser signifikant bedre overlevelse av *Salmonella* på kokosflak enn kokosterning og signifikant bedre overlevelse lagret ved kjøleskaptemperatur enn lagring ved romtemperatur.

Forskjellen i overlevelse av *Salmonella* serovarene på kokosterninger og kokosflak kan forklares ved forskjell i innhold av sukker, inokuleringsprosess, samt hvordan kokosterningene blir produsert. På grunn av produksjonsprosessen til kokosterninger hvor de blir dekket med melis før tørking dannes det en barriere av sukker rundt produktet. I følge Beuchat et al. (2017) vil bakterieceller i en våt inokuleringsløsning, som var det som ble brukt til belastningsforsøket, bli uttørket og dø når de kommer i kontakt med sukkerkrystaller. Barrieren av sukker rundt kokosterningene har bidratt til dårligere overlevelse av de inokulerte *Salmonella* bakteriene og kan være årsaken til forskjellig grad av overlevelse mellom kokosproduktene.

Økt overlevelsessevne for *Salmonella* bakterier ved lav lagringstemperatur (rundt 4°C) på næringsmidler med lav vannaktivitet stemmer overens med studier utført av Hokunan et al. (2016) og Kimber et al. (2012) hvor begge inokulerte *Salmonella* i pistasj og mandler, og av Beuchat og Mann (2014) på inokulerte *Salmonella* bakterier i tørket tranebær og frysetørket jordbær. En hypotese for årsaken til økt overlevelsessevne ved lav lagringstemperatur har blitt

foreslått av Koseki et al. (2015) som tror at den reduserte celleaktiviteten ved lav temperatur er egnet for overlevelse i tørre miljø. En annen hypotese foreslått av Hokunan et al. (2016) innebærer at økt overlevelse ved lav vannaktivitet og lav temperatur (5°C) er forårsaket av en cellulær endring fra et gummiaktig stadie til et glassaktig stadie, som forårsaker at cellestrukturen til bakteriene blir stabilisert og dermed gjør dem mer robuste mot miljø med lav vannaktivitet (Hokunan et al., 2016). Denne hypotesen må derimot undersøkes grundigere før det kan bli sagt med sikkerhet. Den mest sannsynlige årsaken til høyere overlevelsessevne for *Salmonella* ved lav temperatur i miljø med lav vannaktivitet er derfor reduksjonen i metabolisme og celleaktivitet.

For *S. Agbeni* var det signifikant interaksjon mellom lagringstemperatur og kokosprodukt, som kan sees i Figur 15 hvor det ikke var en forskjell i mengde mellom *S. Agbeni* på kokosflak og kokosterning lagret ved kjøleskaptemperatur. Gjennomgående under belastningsforsøket har kokosterning hatt en lavere Log<sub>10</sub> CFU/g verdi for de fleste ulike lagringsparameterene enn kokosflak. I følge Jørgensen et al. (2000) kan ulike serovarer av *Salmonella enterica* overleve ulike stress situasjoner veldig forskjellig. En forklaring til at det ikke er forskjell mellom mengde *S. Agbeni* på kokosterninger og kokosflak ved kjøleskaptemperatur (4°C) etter 4 måneder med lagring kan være at overlevelsesegenskapene til *S. Agbeni* er spesielt gode ved lave temperaturer og at produkt derfor vil ha en lav innvirkning på overlevelse. Det kan også være mulig at det høye mengden av *S. Agbeni* i starten er årsaken, hvor de ikke har blitt lagret i lang nok tid slik at en forskjell kan vise seg. Det er derfor mulig at en lavere inokuleringskonsentrasjon ville gitt klarere forskjeller for *S. Agbeni* ved kjøleskaptemperatur. Den sterkere overlevelsesevnen til *S. Agbeni* kan også forklares ved at den brukte lenger tid enn *S. Typhimurium* før det var en signifikant forskjell mellom vist i tabell 10.

På det siste uttaket ble det utført utplating av prøver fra kokosterninger og kokosflak både på TSA og XLD agar for å undersøke mengde levende celler i prøvene ved slutt, hvor det generelt var mer bakterier som vokste på TSA enn på XLD agar. Årsaken til denne forskjellen kan forklares ved forskjellen i medie brukt, der TSA er et generelt medie for vekst av bakterier hvor de fleste gramnegative og grampositive bakterier kan vokse (Microbiologie-Clinique, u.å-a). I motsetning er XLD agar en selektiv agar for differensiering av enteriske gramnegative

patogener som *Salmonella* (*Microbiologie-Clinique, u.å-b*). Dette tyder derfor på at det i slutten av belastningsforsøket var andre bakterier enn *Salmonella* tilstede på kokosterninger og kokosflak.

#### 5.4 Real-time PCR av prøver fra kokosterninger og kokosflak

Real-time PCR ble utført på prøver av inokulert kokosterninger og kokosflak gjennom belastningsforsøket for å teste tilstedeværelse av *Salmonella* i prøvene. Alle kokosprøver inokulert med *Salmonella* ble testet positive og alle nullprøver ble testet negative, som vist i tabell 11. Siden alle nullprøver testet negativ viser det at det ikke har vært noen kontaminasjon av prøver under uttakene i tillegg til at det ikke har vært noen kontaminasjon under utførelse av Real-time PCR.

Real-time PCR detekterer bare DNA-et til *Salmonella* i prøvene og ikke om det er levende, skadet eller dødt. Flere av prøvene hvor *Salmonella* ikke ble detektert på XLD agar var positive på Real-time PCR. I disse prøvene er det derfor en stor sannsynlighet for at bakteriene var skadet, i et VBNC stadiet eller døde. Real time PCR må derfor kompletteres med analyser som viser om cellene er levende eller døde, eksempelvis med konfokalmikroskopi (Flock et al., 2022). Usikkerheten blant resultatene til Real-time PCR gjør denne metoden for deteksjon av *Salmonella* uegnet for dette forsøket.

På grunn av usikkerheten bak brukt metode for å detektere VBNC *Salmonella* bakterier ville det vært hensiktsmessig å utforske andre mulige metoder.

En mulig metode beskrevet av Shokrzade og Kordi (2017) for å teste cellelevedyktigheten innebærer fluoriserende mikroskopi, hvor et fluoriserende stoff blir tilsatt både levende og døde celler, hvor cellene blir fotografert der levende celler gir fra seg et annet lys en døde celler. Deretter vil det være mulig å kalkulere hvor stor andel av bakteriene i en prøve som er VBNC eller døde (Jayeola et al., 2022).



## 6 Konklusjon

Denne oppgaven gikk ut på å undersøke parameterene serovar (stamme), temperatur og produkt ved å utføre en belastningsstudie der *Salmonella* Typhimurium og *Salmonella* Agbeni overlever på kokosterninger og kokosflak ved lagringstemperaturene 4°C og 20°C i en periode over fire måneder. I tillegg skulle Real-time PCR brukes for å undersøke om metoden egner seg for deteksjon av *Salmonella* i lagringsperioden.

Begge *Salmonella* serovarene overlever bedre på kokosflak enn på kokosterninger noe som kan ha sammenheng med sukker behandling av kokosterningene under produksjon. Resultatene viser også at både *Salmonella* Typhimurium og *Salmonella* Agbeni overlever bedre i disse produktene lagret ved 4°C enn ved 20°C forårsaket av den reduserte celleaktiviteten. *S. Agbeni*, som var serovaren påvist i *Salmonella* utbruddet i Norge i 2019, viste bedre overlevelsesegenskaper enn *S. Thyphimurium* forårsaket i forskjell mellom serovarene.

Real-time PCR egner seg ikke alene til bruk for deteksjon av *Salmonella* i dette belastningsforsøket siden metoden detekter DNA i prøven og ikke om bakteriene er levende skadet eller dødt. Til en belastningsstudie bør derfor Real-time PCR komplimenteres med en metode som tester cellelevedyktigheten for å undersøke om cellene er levende eller døde.

## 7 Forslag til videre arbeid

Til videre arbeid hadde det vært interessant å gjenta belastningsforsøket med andre serovarer av *Salmonella* hvor prøver oftere ble utplattet på TSA for å sammenlikne vekst mellom TSA og XLD agar. I tillegg burde Real-time PCR komplimenteres med en metode som tester for cellelevedyktigheten for å undersøke hvor stor andel av bakteriene som er levende og døde.

Det hadde også vært interessant å utføre andre mikrobielle analyser som samfunnsanalyse, for å utforske hvilke slekter, familier og arter som er tilstede i kokosprodukter eller tørket frukt.

## 8 Referanseliste

- 3M. (2017). *Interpretation Guide*. Hentet 25/4-2023 fra <https://multimedia.3m.com/mws/media/2362480/petrifilm-enterobacteriaceae-interpretation-guide.pdf>
- Adams, B., Fodor, A., Koppenhöfer, H., Stackebrandt, E., Stock, S. P. & Klein, M. (2006). Reprint of "Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens" [Biol. Control 37 (2006) 32–49]. *Biological Control*, 38, 4–21. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(06\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(06)00126-5)
- Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., Guaglianone, E. & Donelli, G. (2006). *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.015>
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H. & Davies, A. (2011). The enterobacteriaceae and their significance to the food industry. *ILSI Europe Report Series*, 17-28.
- Beuchat, L., Komitopoulou, E., Betts, R., Beckers, H., Bourdichon, F., Joosten, H., Fanning, S. & Ter Kuile, B. (2011). Persistence and survival of pathogens in dry foods and dry food processing environments. *International Life Sciences Institute Europe Report Series*, 2011, 1-48.
- Beuchat, L. R., Komitopoulou, E., Beckers, H., Betts, R. P., Bourdichon, F., Fanning, S., Joosten, H. M. & Ter Kuile, B. H. (2013). Low--Water Activity Foods: Increased Concern as Vehicles of Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, 76(1), 150-172. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>
- Beuchat, L. R. & Mann, D. A. (2014). Survival of Salmonella on Dried Fruits and in Aqueous Dried Fruit Homogenates as Affected by Temperature. *Journal of Food Protection*, 77(7), 1102-1109. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-549>
- Beuchat, L. R., Mann, D. A., Kelly, C. A. & Ortega, Y. R. (2017). Retention of Viability of Salmonella in Sucrose as Affected by Type of Inoculum, Water Activity, and Storage Temperature. *J Food Prot*, 80(9), 1408-1414. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-16-537>
- Bourdoux, S., Li, D., Rajkovic, A., Devlieghere, F. & Uyttendaele, M. (2016). Performance of Drying Technologies to Ensure Microbial Safety of Dried Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1056-1066. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12224>
- Bøvre, K. (2021). *Enterobacteriaceae*. Hentet 21/04-2023 fra <https://sml.snl.no/Enterobacteriaceae>
- Breeuwer, P. (2014). Adaptation of Pathogenic Microorganisms to Dry Conditions. I J. B. Gurtler, M. P. Doyle & J. L. Kornacki (Red.), *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices* (s. 37-48). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4_3)
- CDC. (2022). *Salmonella and Food*. Hentet 2/2-2023 fra <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/salmonella-food.html>
- Chaveerach, P., ter Huurne, A. A., Lipman, L. J. & van Knapen, F. (2003). Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl Environ Microbiol*, 69(1), 711-714. <https://doi.org/10.1128/aem.69.1.711-714.2003>
- Chiewchan, N., Pakdee, W. & Devahastin, S. (2007). Effect of water activity on thermal resistance of *Salmonella krefeld* in liquid medium and on rawhide surface. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.037>
- Coenye, T. (2013). Biofilms. I S. Maloy & K. Hughes (Red.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (s. 335-337). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00154-6>
- Cook, K. L. & Bolster, C. H. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 103(3), 573-583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03285.x>

- Cox, L. J., Keller, N. & Van Schothorst, M. (1988). The use and misuse of quantitative determinations of Enterobacteriaceae in food microbiology. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 17, 237s-249s.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev*, 53(1), 121-147. <https://doi.org/10.1128/mr.53.1.121-147.1989>
- Csonka, L. N. & Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol*, 45, 569-606. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.45.100191.003033>
- da Silva, R. T., Schaffner, D. W., de Souza Pedrosa, G. T., de Albuquerque, T. M. R., Maciel, J. F., de Souza, E. L., Alvarenga, V. O. & Magnani, M. (2022). Survival kinetics, membrane integrity and metabolic activity of *Salmonella enterica* in conventionally and osmotically dehydrated coconut flakes. *International Journal of Food Microbiology*, 370, 109669. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109669>
- da Silva, W. P., da Silva e Silva, C. M. D. P., de Farias Aires, J. E. & da Silva Junior, A. F. (2014). Osmotic dehydration and convective drying of coconut slices: Experimental determination and description using one-dimensional diffusion model. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13(2), 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.05.002>
- da Silva, W. P., do Amaral, D. S., Duarte, M. E. M., Mata, M. E. R. M. C., e Silva, C. M. D. P. S., Pinheiro, R. M. M. & Pessoa, T. (2013). Description of the osmotic dehydration and convective drying of coconut (*Cocos nucifera* L.) pieces: A three-dimensional approach. *Journal of Food Engineering*, 115(1), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.007>
- de Silva, J., Priyadarshana, L. & Gajanayake, B. (2017). An investigation of microbiological contaminations during manufacturing process of desiccated coconut: a case study at St. Josep DC Mills, Katana. "Greener agriculture and environment through convergence of technologies", Proceedings of the International Symposium on Agriculture and Environment-ISAEE 2017, 19th January 2017, University of Ruhuna, Sri Lanka,
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y. & Wang, Y. (2007). Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 73(4), 1349-1354. <https://doi.org/10.1128/aem.02243-06>
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita, A. & Fanning, S. (2013). Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Front Microbiol*, 4, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331>
- Flock, G., Richardson, M., Pacitto-Reilly, D., Anderson, N., Chen, F., Ahnrud, G., Mendoza, A. & Senecal, A. (2022). Survival of *Salmonella enterica* in Military Low-Moisture Food Products during Long-Term Storage at 4, 25, and 40°C. *Journal of Food Protection*, 85(4), 544-552. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-321>
- Folkhelseinstituttet. (2022). *Salmonellose - veileder for helsepersonell*. Hentet 25/1-2023 fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/salmonellose---veileder-for-helsepe/>
- Furuki, T., Oku, K. & Sakurai, M. (2009). Thermodynamic, hydration and structural characteristics of alpha,alpha-trehalose. *FBL*, 14(9), 3523-3535. <https://doi.org/10.2741/3468>
- Gupte, A. R., De Rezende, C. L. & Joseph, S. W. (2003). Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol*, 69(11), 6669-6675. <https://doi.org/10.1128/aem.69.11.6669-6675.2003>
- Gurtler, J., Doyle, M. & Kornacki, J. (2014). The Microbiological Safety of Spices and Low-Water Activity Foods: Correcting Historic Misassumptions. I (s. 3-13). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4_1)
- Hokunan, H., Koyama, K., Hasegawa, M., Kawamura, S. & Koseki, S. (2016). Survival Kinetics of *Salmonella enterica* and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* on a Plastic Surface at Low Relative

- Humidity and on Low–Water Activity Foods. *Journal of Food Protection*, 79(10), 1680-1692. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-081>
- Jacobsen, M. S. (2020). Overlevelse av Salmonella enterica serovar Agbeni og Salmonella enterica serovar Typhimurium på tørket frukt og nøtter. I. NTNU.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Jayeola, V., Farber, J. M. & Kathariou, S. (2022). Induction of the Viable-but-Nonculturable State in Salmonella Contaminating Dried Fruit. *Appl Environ Microbiol*, 88(2), e0173321. <https://doi.org/10.1128/aem.01733-21>
- Johansen, T. B., Brandal, L. T., MacDonald, E., Naseer, U., Stefanoff, P., Røed, M. H., Berglund, T. M., Johannessen, G. S., Bergsjø, B., Vold, L. & Lange, H. (2021). Exotic dried fruits caused Salmonella Agbeni outbreak with severe clinical presentation, Norway, December 2018 to March 2019. *Euro Surveill*, 26(14). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.Es.2021.26.14.2000221>
- Jørgensen, F., Leach, S., Wilde, S. J., Davies, A., Stewart, G. S. A. B. & Humphrey, T. (2000). Invasiveness in chickens, stress resistance and RpoS status of wild-type Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium definitive type 104 and serovar Enteritidis phage type 4 strains. *Microbiology*, 146(12), 3227-3235. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-12-3227>
- Kasler, D. R. & Yousef, A. E. (2018). Ozone Antimicrobial Effects on Fruits and Fruit Juices. I A. Rosenthal, R. Deliza, J. Welti-Chanes & G. V. Barbosa-Cánovas (Red.), *Fruit Preservation: Novel and Conventional Technologies* (s. 505-522). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3311-2\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3311-2_18)
- Kempf, B. & Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5), 319-330. <https://doi.org/10.1007/s002030050649>
- Kimber, M. A., Kaur, H., Wang, L., Danyluk, M. D. & 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. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-023>
- Koseki, S., Nakamura, N. & Shiina, T. (2015). Comparison of Desiccation Tolerance among Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica, and Cronobacter sakazakii in Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 78(1), 104-110. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-249>
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D. & Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol*, 5, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Lima, A. G., Delgado, J., Farias Neto, S. & Franco, C. M. R. (2016a). Intermittent Drying: Fundamentals, Modeling and Applications. *Advanced Structured Materials*, 63, 19-41. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19767-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19767-8_2)
- Lima, A. G., Silva, J. V., Pereira, E. M. A., Santos, I. B. & Lima, W. M. P. B. (2016b). Drying of Bioproducts: Quality and Energy Aspects. *Advanced Structured Materials*, 63, 1-18. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19767-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19767-8_1)
- Lleó, M. M., Tafi, M. C. & Canepari, P. (1998). Nonculturable Enterococcus faecalis cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Syst Appl Microbiol*, 21(3), 333-339. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(98\)80041-6](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(98)80041-6)
- Lues, J. F. R. & Van Tonder, I. (2007). The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*, 18(4), 326-332. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.010>

- MacKenzie, K., Palmer, M., Köster, W. & White, A. (2017). Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic Salmonella Strains to Colonize Multiple Host Species. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00138>
- Madhiyanon, T., Phila, A. & Soponronnarit, S. (2009). Models of fluidized bed drying for thin-layer chopped coconut. *Applied Thermal Engineering*, 29(14), 2849-2854. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2009.02.003>
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A. & Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal Salmonella gastroenteritis. *Clin Infect Dis*, 50(6), 882-889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Maneepan, P. & Yuenyongputtakal, W. (2011). Osmotic Dehydration of Coconut Pieces: Influence of Vacuum Pressure Pretreatment on Mass Transfer and Physical Characteristics. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 45.
- MarketDataForecast. (2023). *Dried Fruits Market Analysis by Type (Apricots, Dates, Figs, Peaches, Pears, Prunes, Raisins, Berries, and Others), Application (Confectioneries, Dairy Products, Bakery Products, Snacks & Bars, Desserts, Cereals, and Others) and Region (North America, Europe, Asia-Pacific, Middle East and Africa, Latin America) – Global Industry Analysis, Size, Growth, Investment and Forecasts 2023 to 2028*. Hentet 29/4-2023 fra <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/dried-fruits-market>
- Microbiologie-Clinique. (u.å-a). *Tryptic Soy Agar (TSA) | Principle | Preparation | Interpretation*. Hentet 12/5-2023 fra <https://microbiologie-clinique.com/trypticase-soy-agar-principle-interpretation.html>
- Microbiologie-Clinique. (u.å-b). *XLD Agar | Principle | Preparation | Interpretation*. Hentet 4/5-2023 fra <https://microbiologie-clinique.com/xld-agar-xylose-lysine-desoxycholate.html#Principe>
- Mladenović, K. G., Grujović, M. Ž., Kiš, M., Furmeg, S., Tkalec, V. J., Stefanović, O. D. & Kocić-Tanackov, S. D. (2021). Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23), 8615-8627. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11655-7>
- Mumy, K. L. (2014). Salmonella. I P. Wexler (Red.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (s. 211-212). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00537-6>
- OFG. (2022). *FRUKT- OG GRØNTSTATISTIKK 2022*. <https://frukt.no/globalassets/materiell/frukt--og-grontstatistikken/frukt--og-grontstatistikk-2022-3.pdf>
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 34(4), 415-425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
- Oxoid. (u.å). *MLCB AGAR*. Hentet 4/5-2023 fra [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0783&org=124&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0783&org=124&c=UK&lang=EN)
- Pittia, P. & Antonello, P. (2016). Chapter 2 - Safety by Control of Water Activity: Drying, Smoking, and Salt or Sugar Addition. I V. Prakash, O. Martín-Belloso, L. Keener, S. Astley, S. Braun, H. McMahon & H. Lelieveld (Red.), *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods* (s. 7-28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800605-4.00002-5>
- Podolak, R. & Black, D. G. (2017). Introduction and Overview. I *Control of salmonella and other bacterial pathogens in low moisture foods* (s. 1-27). <https://doi.org/10.1002/9781119071051.ch1>
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G. & Elliott, P. H. (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of Salmonella in low-moisture foods. *J Food Prot*, 73(10), 1919-1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.10.1919>
- Popoff, M. Y. (1997). Antigenic formulas of the Salmonella serovars. *WHO collaborating Center for Reference and Research on salmonella*.

- Santillana Farakos, S. M. & Frank, J. F. (2014). Challenges in the Control of Foodborne Pathogens in Low-Water Activity Foods and Spices. I J. B. Gurtler, M. P. Doyle & J. L. Kornacki (Red.), *The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices* (s. 15-34). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4_2)
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S. & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Shleeva, M., Mukamolova, G. V., Young, M., Williams, H. D. & Kaprelyants, A. S. (2004). Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology (Reading)*, 150(Pt 6), 1687-1697. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26893-0>
- Shokrzade, M. & Kordi, M. (2017). An overview of the most common methods for assessing cell viability. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 5, 33. <https://doi.org/10.5455/jrmds.2017526>
- Signoretto, C., Lleò, M. M., Tafi, M. C. & Canepari, P. (2000). Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*, 66(5), 1953-1959. <https://doi.org/10.1128/aem.66.5.1953-1959.2000>
- Slinde, E. (2022). vannaktivitet. Hentet 11/5-2023 fra <https://snl.no/vannaktivitet>
- Stackhouse, R. R., Faith, N. G., Kaspar, C. W., Czuprynski, C. J. & Wong, A. C. (2012). Survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar enteritidis filaments induced by reduced water activity. *Appl Environ Microbiol*, 78(7), 2213-2220. <https://doi.org/10.1128/aem.06774-11>
- Su, L.-H. & Chiu, C.-H. (2007). *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, 30, 210-219.
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M. & Chirife, J. (2020). Effects of Water Activity (a<sub>w</sub>) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation. I *Water Activity in Foods* (s. 323-355). <https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch14>
- Thabit, R. (2014). Novel Formulation, Preparation and Quality Evaluation of Sweet Gourd ketchup. *IJCBS RESEARCH*, 1, 12.
- Tønjum, T. (2023). *Salmonella*. Hentet 21/04-2023 fra <https://sml.snl.no/Salmonella>
- USDA. (1995). *WATER ACTIVITY IN FOOD*. Hentet 11/5-2023 fra <https://pmp.errc.ars.usda.gov/WaterActivity.aspx>
- Vega-Mercado, H., Marcela Góngora-Nieto, M. & Barbosa-Cánovas, G. V. (2001). Advances in dehydration of foods. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 271-289. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00224-7)
- Voje, K. L. (2022). alleler. Hentet 10/5-2023 fra <https://snl.no/alleler>
- Warriner, K. (u.å). *Low Moisture Foods Cause of Numerous Outbreaks*. Hentet 29/4-2023 fra <https://globalfoodsafetyresource.com/low-moisture-foods-implicated-numerous-outbreaks-part-1/>

