

Mastergradsoppg. 2010

Effekt av melkesyrebakteriers metabolisme på utviklingen av *Escherichia coli* O157:H7 i melk.

Effect of lactic acid bacteria's metabolism on the development of *Escherichia coli* O157:H7 in milk.



ANNE MARGRETHE WESTBLAD

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP
INSTITUTT FOR KJEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2010



FORORD

Idémyldring og planlegging av oppgaven foregikk i høstsemesteret 2009 og januar 2010. Arbeidet med masteroppgaven ble utført i vårsemesteret 2010 ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap på Universitetet for miljø- og biovitenskap, Ås.

Jeg vil takke TINE for økonomisk støtte i form av 10 000 kroner til denne oppgaven. Takk til Hans Blom ved Nofima Mat, Ås, for *Escherichia coli* O157:H7-kulturen.

Professor Roger K. Abrahamsen og professor Judith A. Narvhus var veiledere. Tusen takk for god veiledning, støtte, engasjement og inspirasjon!

Tusen takk til laboratoriepersonalet for all hjelpen jeg fikk. Ekstra stor takk til ingeniør May Helene Aalberg, avdelingsingeniør Tone Stokke Molland og ingeniør May-Brit Abrahamsen for bistand med utstyr og moralsk støtte. Dere er enestående!

Korrekturleser var Inger Westblad. Tusen takk, mamma!

Ås – UMB, mai 2010

Anne Margrethe Westblad

SAMMENDRAG

Dagens regelverk sier at all melk som omsettes skal være varmebehandlet, men åpner samtidig for salg av melkeprodukter basert på upasteurisert melk, forutsatt overholdelse av visse krav. Dermed kan småskalavirksomheter framstille melkeprodukter av upasteurisert melk hvis de skulle ønske det. Et slikt ønske er ofte begrunnet i tradisjoner og praktiske forhold. I tillegg er det flere som påstår at råmelk er sunnere enn pasteurisert melk og at råmelkas mikroflora hemmer vekst av uønskede bakterier, blant annet ved å senke råmelkas pH.

I denne oppgaven ble det undersøkt om melkesyrebakteriers metabolisme har effekt på utviklingen av en ikke-toksindannende stamme *Escherichia (E.) coli* O157:H7 i upasteurisert og pasteurisert melk. Melkesyrebakteriene som ble benyttet var DL-kultur og yoghurtkultur. Ved forsøk med DL-kultur foregikk fermenteringen ved 22 °C i 24 timer, med uttak etter 0, 6, 12 og 24 timer. Da yoghurtkultur ble benyttet, ble fermenteringen utført ved 42 °C i 6 timer med uttak etter 0, 2, 4 og 6 timer. Etter fermentering ble prøvene kjølelagret ved 4 °C, og uttakene foregikk etter 10, 20 og 30 døgn.

En forsøksrunde bestod av sju prøvekombinasjoner: Råmelk og pasteurisert melk tilsatt *E. coli* O157:H7 og syrekultur hver for seg og sammen, samt en kontroll med råmelk uten tilsetning. Kontrollprøven ble analysert for antall koliforme bakterier, mesofile aerobe bakterier og bakterier som kan vokse på Sorbitol MacConkey agar (SMAC) og på M17-agar. De inokulerte prøvene ble analysert for antall *E. coli* O157:H7 og melkesyrebakterier, avhengig av hva som hadde blitt tilsatt. Det ble også foretatt pH-målinger av alle prøvene.

Råmelkas mikroflora varierte i de forskjellige forsøksrundene. Ved fermentering av råmelka forble pH uendret, noe som tyder på lavt antall naturlig tilstedeværende melkesyrebakterier. Generelt ble det observert vekst av *E. coli* O157:H7 i løpet av fermenteringen og reduksjon i antallet under kjølelagringen. I de inokulerte melkeprøvene ble det funnet at podemengde, syrekultur, temperatur, syrningsrate og pH-verdi hadde effekt på utviklingen av *E. coli* O157:H7. Effekten var sannsynligvis sammensatt. *E. coli* O157:H7 vokste i større grad i pasteurisert melk enn i råmelk. Under fermenteringen ble det observert vekst og overlevelse av *E. coli* O157:H7 sammen med henholdsvis DL-kultur og yoghurtkultur. Etter 10 døgn ved kjølelagring kunne ikke *E. coli* O157:H7 detekteres fra syrnet melk eller yoghurt.

ABSTRACT

According to current regulations, all milk meant for sale must be pasteurized. At the same time, the regulations allow sale of milk products based on unpasteurized milk, as long as certain rules are followed. Consequently, if they want to, small scale production units can manufacture milk products from unpasteurized milk. Preference for such production is often based on traditions or practical circumstances. More over, several raw milk advocates claim that raw milk is more healthy than pasteurized milk, and that the microflora in raw milk inhibits growth of unwanted bacteria, e.g. by lowering the milk's pH.

The effect of lactic acid bacteria's (LAB) metabolism on the development of a non-toxin producing strain *Escherichia (E.) coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk was examined. The LAB used was a DL starter and a yoghurt starter. In the experiment with DL starter, the fermentation was carried out at 22 °C for 24 hours, with sampling at 0, 6, 12, and 24 hours. With yoghurt starter, 42 °C for 6 hours was used for fermentation, and samples were taken at 0, 2, 4, and 6 hours. After the fermentation period, the samples were stored at 4 °C, and samples were taken after 10, 20, and 30 days.

One experiment sequence contained seven sample combinations; raw milk and pasteurised milk inoculated with *E. coli* O157:H7 and a starter, separately and combined; and finally, a control sample with non-inoculated raw milk. The control sample was analyzed for the quantity of coliform bacteria, mesophile aerobe bacteria, and bacteria able to grow on Sorbitol MacConkey agar and M17 agar. For the inoculated samples, *E. coli* O157:H7 and LAB were quantified, depending on which bacteria had been added. In addition, the pH was measured in each sample.

The microflora of the raw milk varied in the different experiment sequences. During fermentation of raw milk, the pH remained stable, which indicates a low amount of non-starter LAB. In general, growth of *E. coli* O157:H7 was observed during fermentation, while the amount was reduced during cold storage. Inoculate amount, type of starter, temperature, pH value, and the rate of pH reduction were found to have effect on the development of *E. coli* O157:H7. The effect was probably compound. *E. coli* O157:H7 grew to a larger extent in pasteurized milk than in raw milk. During fermentation, growth and survival of *E. coli* O157:H7 in combination with, respectively, DL starter and yoghurt starter was observed.

After 10 days at 4 °C, *E. coli* O157:H7 could not be detected from fermented milk or yoghurt samples.

INNHALDSFORTEGNELSE

1. INNLEDNING	1
2. LITTERATUROVERSIKT	2
2.1. RÅMELK	2
2.1.1. Melk som vekstmedium	2
2.1.2. Melkas mikrobiologi	5
2.2. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	9
2.2.1. Bakteriearten <i>E. coli</i>	9
2.2.2. Ulike <i>E. coli</i> -stammer	11
2.2.3. <i>E. coli</i> O157	13
2.3. BARRIERETEKNOLOGI	18
2.3.1. Barrierer	19
2.4. FERMENTERT MELK	24
2.4.1. Kulturmelk	24
2.4.2. Yoghurt	25
2.5. BRUK AV UPASTEURISERT MELK	25
2.6. GJELDENDE NORSK LOVGIVNING VED FOREDLING AV MELKEBASERTE PRODUKTER	27
3. MATERIALER OG METODER	29
3.1. BRUK AV AGAR	30
3.2. FORFORSØK	30
3.2.1. Bakterienes vekst på SMAC og M17	30
3.2.2. Vekst av <i>E. coli</i> O157:H7 ved pH 7 til 3 og i melk ved 22 °C og 42 °C	31
3.2.3. Podemengde ved fermenteringsstart	32
3.3. HOVEDFORSØKET	33
3.3.1. Forsøksdesignet	33
3.3.2. Mikrobiologisk analyse	37
3.3.3. pH-måling	37
3.4. DATABEHANDLING	37
4. RESULTATER	38
4.1. ORGANISERINGEN AV PRESENTASJONEN AV RESULTATENE	38
4.2. FORFORSØK	39
4.2.1. Bakterienes vekst på SMAC-agar og M17-agar	39
4.2.2. Vekst av <i>E. coli</i> O157:H7 ved pH 7 til 3 og i melk ved 22 °C og 42 °C	39
4.2.3. Podemengde ved fermenteringsstart	40
4.3. HOVEDFORSØK MED DL-KULTUR	41

4.3.1. Mikrobiologisk analyse.....	41
4.3.2. pH-måling	51
4.4. HOVEDFORSØK MED YOGHURTKULTUR	53
4.4.1. Mikrobiologisk analyse.....	53
4.4.2. pH-måling	61
4.5. SAMMENLIKNING AV UTVIKLING AV PH OG ANTALL <i>E. COLI</i> O157:H7.....	62
5. DISKUSJON	65
5.1. FORFORSØK	65
5.2. HOVEDFORSØKET	66
5.2.1. Platetelling	66
5.2.2. Sorbitol MacConkey agar	67
5.2.3. Råmelkas mikroflora.....	68
5.2.4. Bakterienes utvikling	70
5.3. PRAKTISK ANVENDELSE AV FORSØKSRESULTATENE	73
5.4. FRAMTIDSASPEKTER.....	74
6. KONKLUSJON	76
7. REFERANSER.....	77

VEDLEGG (1)

1. INNLEDNING

I Norge øker antallet småskalavirksomheter som driver produksjon av melkeprodukter. Mange av disse virksomhetene benytter upasteurisert melk i sine produkter. Tilhengere av bruk av upasteurisert melk hevder blant annet at syring, melkas naturlige inhibitorer og mikroflora er tilstrekkelig for å hindre vekst og overlevelse av eventuelle patogene mikroorganismer.

Mangfold i meieriprodukter og bevaring av tradisjoner er ønskelig, men samtidig må folkehelsen bli ivaretatt. Mattilsynet er ved sine godkjenninger og tilsyn med småskalavirksomheter opptatt av helsemessig trygg foredling av melk, særlig upasteurisert. Regelverket åpner for salg av produkter basert på upasteurisert melk, også for tilfeldig omsetning av rå melk til konsum dersom det skjer fra gård eller seter direkte til forbruker, uten preg av butikksalg. Enterohemorragisk *Escherichia (E.) coli* O157 har foreløpig ikke blitt påvist i norsk kumelk, men siden *E. coli* O157 har blitt funnet i avføring fra norsk storfe, er det antakelig bare et spørsmål om tid før bakterien er å finne i melk. Dette bør småskalavirksomhetene som foredler upasteurisert melk forberede seg på.

Formålet med denne oppgaven var å undersøke om melkesyrebakteriers metabolisme påvirker utviklingen av *E. coli* O157:H7 tilsatt i melk.

Analysene som ble utført under laboratoriearbeidet bestod av kvantitative mikrobiologiske analyser av råmelk, *E. coli* O157:H7 og syrekulturene DL-kultur og yoghurtkultur, samt pH-målinger i løpet av inkubering og kjølelagring.

2. LITTERATUROVERSIKT

2.1. RÅMELK

Melkeforskriften (1995) § 2 nr. 1 definerer rå melk slik: ”(...) melk produsert ved sekresjon fra melkekjertler fra en eller flere kuer, sauer, geiter eller bøfler, og som ikke er oppvarmet til over 40°C eller behandlet på tilsvarende vis.”. I denne oppgaven omtales ubehandlet kumelk som råmelk.

Kriterier satt av TINE (2007) for høykvalitetsmelk er fravær av patogene mikroorganismer og et lavt innhold av mikroorganismer som kan forringe kvaliteten. Elitemelk har et totaltall under 20 000 kde/ml, og melk i 1. klasse har 21-30 000 kde/ml. Lukta skal være normal, og medisinrester skal ikke forekomme.

2.1.1. Melk som vekstmedium

Råmelk kan inneholde ufarlige, kvalitetsødeleggende og/eller sykdomsframkallende bakterier og andre mikroorganismer. Hvilke bakterier som vokser fram reguleres i stor grad av hvilke vekstkrav de ulike bakteriene har, for eksempel i forhold til temperatur, konkurrerende mikroflora, næring og atmosfære. Bakteriemengde spiller også en rolle. Hvilke mikroorganismer som kan finnes i melk og hvor disse kommer fra omtales i avsnitt 2.1.2.

2.1.1.1. Næringsinnhold

Høy vannaktivitet, nær nøytral pH og mange næringsstoffer gir gunstige vekstvilkår for mikrober i råmelk (Adams & Moss 2008; Walstra et al. 2006). Melkas sammensetning varierer etter kurase, geografi, fôring og laktasjonssyklus, men gjennomsnittlig næringsinnhold er 87,5 % vann, 3,9 % fett, 3,4 % protein, 4,8 % laktose og 0,8 % mineraler (Bylund 2003). Næringskravene varierer blant bakteriene, men generelt er ulike vitaminer og ikke-protein-nitrogen viktig for vekst av melkesyrebakterier og andre bakterier. Noen bakterier bruker andre karbohydratkilder enn laktose, mens andre trenger frie aminosyrer, som fersk melk inneholder lite av. Bakteriene som trenger frie aminosyrer kan vokse etter at proteiner har blitt hydrolysert enten av melkas naturlige proteolytiske enzymer eller av andre mikroorganismer. Redokspotensialet og oksygeninnholdet i melka hindrer vekst av anaerobe bakterier som for eksempel *Clostridium (Cl.) botulinum* (Walstra et al. 2006).

2.1.1.2. Naturlige inhibitorer i melk

Råmelk inneholder naturlige inhibitorer for bakterievekst, deriblant lysosym, laktoferrin, immunoglobulin og laktoperoksidasesystemet. Mengden kan variere etter blant annet rase, diett og laktasjonsperiode (Korhonen 2001; Walstra et al. 2006). I tillegg kan råmelk inneholde melkesyrebakterier. Noen av disse bakteriene kan produsere bakteriosiner, for eksempel produksjon av nisin fra *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* (Walstra et al. 2006).

Lysosym: Enzymet lysosym hydrolyserer glykosidbindingene i bakteriecelleveggen peptidoglykan. Siden peptidoglykan stabiliserer celleveggen, vil hydrolysen gjøre bakterien utsatt for lysering (Pakkanen & Aalto 1997; Reiter 1978). Gram-positive bakterier er mer mottakelige for lysosym enn hva Gram-negative bakterier er, grunnet mindre peptidoglykan i Gram-negative bakteriers cellevegg, og at deres ytre cellemembran virker beskyttende (Adams & Moss 2008; Tortora et al. 2007).

I råmelk finnes enzymet i for liten konsentrasjon til å ha tilfredsstillende drapeseffekt på mikroorganismer (Walstra et al. 2006). Ifølge Tortora et al. (2007) kan en ved å tilsette EDTA svekke den ytre cellemembranen og dermed gi lysosym bedre tilgang til peptidoglykanlaget. Men det vil være uaktuelt å benytte EDTA i produksjon av melkeprodukter, ettersom slik tilsetning ikke er tillatt. Enteropatogene *E. coli* er blant de Gram-negative bakteriene som er sensitive for lysosym (Abrahamsen et al. 2003). Yamauchi et al. (1993) fant at tilstedeværelse av enten laktoferrin eller laktoferrisin kunne styrke drapeseffekten av lysosym mot *E. coli*.

Laktoferrin: Laktoferrin er et glykoprotein som blant annet finnes i råmelk. Det påvirkes ikke av pasteurisering. Jern (Fe^{2+}) er nødvendig for blant annet *E. coli* og andre koliforme bakteriers vekst. Laktoferrin har vist seg å ha bakteriostatisk effekt mot *E. coli* (Korhonen 2001; Rainard 1986). Proteinet binder seg til jern, som derved gjøres utilgjengelig for mikroorganismene. Dessuten binder laktoferrin seg til cellemembranen og hindrer dens funksjon. Det binder seg til lipid A i lipopolysakkaridlaget (LPS) hos Gram-negative bakterier og frigjør LPS fra celleveggen (Appelmeik et al. 1994; Yamauchi et al. 1993). Videre binder laktoferrin porinmolekyler i ytre cellemembran hos *E. coli*, noe som gjør membranen mer gjennomtrengelig (Erdei et al. 1994). Ifølge Walstra et al. (2006) er konsentrasjonen av laktoferrin i råmelk for lav til å ha tilstrekkelig drapeseffekt.

Immunoglobuliner: Immunoglobuliner, særlig IgM, fører til agglutinerings av bakteriene: på grunn av Brownske bevegelser møtes bakteriene, og IgM fester dem sammen. Etter hvert blir det en mangel på næringsstoffer, inhiberende metabolitter akkumuleres og dermed hemmes veksten (Walstra et al. 2006). Immunoglobuliner er relativt varmestabile, og mesteparten forblir aktive etter pasteurisering (Korhonen 2001).

Laktoperoksidasesystemet: Laktoperoksidasesystemet inaktiverer enzymer som er livsnødvendige for bakteriers metabolisme. Laktoperoksidase katalyserer oksidering av thiocyanat i nærvær av hydrogenperoksid. Mellommetabolitter som hypothiocyanitt dreper bakterier ved å oksidere komponenter som binder viktige SH-grupper i proteiner eller skader den cytoplasmiske membranen (Adams & Moss 2008; Pakkanen & Aalto 1997; Seifu et al. 2005).

Hydrogenperoksid og thiocyanat er vanligvis ikke til stede i tilstrekkelige mengder i melk, men innholdet av laktoperoksidase er ofte høyt nok til å aktivere thiocyanat (Korhonen 2001; Walstra et al. 2006). Ifølge Adams & Moss (2008) kan thiocyanatinnholdet økes ved å føre kyrne med kål, og hydrogenperoksid kan økes av aktiviteten hos endogene enzymer eller melkesyrebakteriers aerobe metabolisme.

Dersom melka inneholder minst 0,25 mM thiocyanat, vil laktoperoksidasesystemet være inhiberende mot flere av bakteriene som er katalase-negative, for eksempel laktobasiller, laktokokker og streptokokker. Skulle i tillegg innholdet av hydrogenperoksid også være minst 0,25 mM, vil også katalase-positive bakterier, som *E. coli*, inhiberes og muligens drepes (Korhonen 2001; Seifu et al. 2005; Walstra et al. 2006). Det ser ut til at Gram-negative bakteriers indre cellevegg blir mer skadet av systemet enn hva veggen i Gram-positive celler blir. I sin oversiktsartikkel rapporterer Seifu et al. (2005) at enteropatogene og enterotoksiske *E. coli* og verotoksinproduserende *E. coli* O157:H7 har blitt drept av laktoperoksidasesystemet som følge av respirasjonsvikt.

Det har vist seg at et aktivert system kan være effektivt for en viss preserving av melk ved begrenset tilgang på kjøling (Haddadin et al. 1996; Korhonen 2001). Pasteurisert melk med et aktivert laktoperoksidasesystem vil være holdbar lengre sammenliknet med ubehandlet melk (Seifu et al. 2005). Pasteurisering vil bare delvis inaktivere systemet, da laktoperoksidase er et relativt termostabilt enzym (Abrahamsen et al. 2003; Trujillo et al. 2007).

2.1.2. Melkas mikrobiologi

Melk kan fungere som smittekilde for patogene mikroorganismer, og patogene bakterier har ved flere anledninger blitt detektert i melk (Abbar & Kaddar 1991; Backmann & Sphar 1995; Baylis 2009; Ellis et al. 2007; Reed & Grivetti 2000; Rysanek et al. 2009). Bakteriene som gir brusellose, skarlagensfeber og tuberkulose er vanlige i råmelk, og pasteurisering har vært et viktig virkemiddel for å redusere forekomsten av blant annet disse sykdommene (Vitenskapskomiteen for mattrygghet 2006). I sin undersøkelse av tankmelk hos melkeprodusenter fant Jayarao & Henning (2001) at 26,7 % av gårdene hadde en eller flere patogene bakterier i råmelka, deriblant *E. coli*. Også Gran et al. (2003) fant patogene bakterier, blant annet *E. coli*, ved undersøkelse av råmelk, syrnet pasteurisert melk og naturlig syrnet råmelk fra tre små meierier i Zimbabwe.

Ifølge Walstra et al. (2006) vokser patogene bakterier som *E. coli*, *Bacillus (B.) cereus*, *Staphylococcus (Staph.) aureus* og *Streptococcus (St.) agalactiae* godt i melk. Det finnes psykrotrofe stammer av *Yersinia (Y.) enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *B. cereus* og *Listeria (Li.) monocytogenes* som kan vokse i kjølelagret melk. Andre bakterier som kan detekteres, men ikke nødvendigvis vokse, i melk er blant annet *Salmonella* spp., *Brucella abortus*, *Campylobacter jejuni*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, *Mycobacterium (M.) tuberculosis* og *Corynebacterium* spp.

Melkas kvalitet kan svekkes ved at bakterier produserer enzymer som hydrolyserer næringsstoffer. Denne hydrolyseringen gjør næringen mer tilgjengelig for bakteriene, samtidig som melka utvikler dårlig smak og blant annet nedsatt varmestabilitet (Walstra et al. 2006). Foringelse av melk og melkeprodukter kan skyldes Gram-negative stavbakterier som *Pseudomonas* spp. og koliforme bakterier, mugg og gjær, *Bacillus* spp., coryneforme bakterier og melkesyrebakterier (Frank & Hassan 2002).

Coryneforme bakterier er ikke-sporedannende, Gram-positive stavbakterier, for eksempel *Brevibacterium* spp., *Microbacterium* spp. og *Corynebacterium* spp. Produksjon av proteolytiske enzymer og toleranse for høy saltkonsentrasjon er også egenskaper hos bakterier i denne gruppen (Frank & Hassan 2002).

2.1.2.1. Psykrotrofe bakterier

Psykrotrofe bakterier er bakterier som kan vokse ved 0 °C, har optimumstemperatur for vekst ved 20-30 °C og kan ikke vokse ved over 40 °C (Tortora et al. 2007). Psykrotrofe bakterier i råmelk er ofte representert av bakterier i familien Pseudomonadaceae. Dette er Gram-negative aerobe staver som ikke danner sporer, for eksempel *Pseudomonas (P.) fluorescens*.

Psykrotrofe slekter fra andre familier er blant annet *Flavobacterium* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Alcaligenes* spp., samt kokkebasillene *Acinetobacter* spp. og *Psychrobacter* spp. Bakteriene finnes i jord, planter, vann og dyr. Psykrotrofe bakteriers ødeleggende effekt på melk er knyttet til deres evne til å danne varmestabile ekstracellulære enzymer som bryter ned protein og lipid. Enzymenes aktivitet resulterer i negativ smak som bitterhet og fruktighet (Frank & Hassan 2002). Termolabile psykrotrofe bakterier, som *Pseudomonas* spp, overlever ikke pasteurisering. Derimot kan corynebakterier, mikrokokker, streptokokker og *Arthrobacter* spp. være både psykrotrofe og termoutholdende (termodure), noe som fører til at de vil overleve pasteurisering sammen med sporedannerne *Bacillus* spp. og *Clostridium* spp. (Stepaniak 2002).

Enkelte patogene bakterier kan også vokse ved eller under 8 °C, deriblant *Li. monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus* og muligens enterohemorragisk *E. coli*. *B. cereus* oppdages ofte i råmelk og har størst betydning for pasteurisert melks holdbarhet, gjerne på grunn av artens proteinaser som søtkoagulerer melka.

2.1.2.2. Koliforme bakterier

Ifølge Tortora et al. (2007) og Frank & Hassan (2002) defineres koliforme bakterier som aerobe eller fakultativt anaerobe, Gram-negative, oksidase-negative, ikke-sporedannende stavbakterier som fermenterer laktose og produserer gass og syre. De overlever ikke pasteurisering. Bakterier som omfattes av denne betegnelsen er av familien Enterobacteriaceae, som *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp. og *Citrobacter* spp. (Frank & Hassan 2002). Disse bakteriene vokser svært godt i melk. Kvalitetsforringelse av melk grunnet vekst av koliforme bakterier innebærer syreproduksjon, slimproduksjon i Cottage cheese, bitter smak, lukt av gress, avføring, medisin eller urenheter, og oppblåsing av ost som følge av produksjon av karbondioksid (CO₂) og hydrogen (H₂) (Frank & Hassan 2002; Walstra et al. 2006).

2.1.2.3. Kontaminantenes vei til råmelka

Melk fra syke kyr skal ikke benyttes til næringsmiddelproduksjon, grunnet tilstedeværelse av patogene mikroorganismer. Ved jurbetennelsen mastitt er juret infisert med patogene bakterier som lett kan overføres til melka, deriblant *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Li. monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *P. aeruginosa*, *Corynebacterium (C.) pyogenes* og *E. coli* (Adams & Moss 2008; Asperger & Zangerl 2002; Frank & Hassan 2002). Mastitt behandles gjerne med antibiotika, og det er da viktig at melk fra slike kyr ikke blandes med ”ren” melk. Mennesker bør ikke eksponeres for antibiotika unødig, og enkelte er allergiske mot antibiotika. Tilstedeværelse av antibiotika kan også ødelegge melkebaserte produkter hvor syrekulturer benyttes, da antibiotika kan hemme vekst av disse ønskede bakteriene og dermed føre til store økonomiske tap for produsenten (Adams & Moss 2008).

Råmelk fra ei frisk ku er i utgangspunktet praktisk talt steril før den forlater juret. Ikke-varmeresistente mikrokokker og stafylokokker, streptokokker og *C. bovis* er som regel til stede i små mengder i juret og spenekanalene og vil overføres til melka ved melking. Melkesyrebakterier kan også komme opp i spenene. Melka kontamineres svært raskt etter å ha forlatt juret (Adams & Moss 2008; Frank & Hassan 2002; Walstra et al. 2006).

Ved melking kan melka kontamineres av mikroorganismer fra spenenes ytterside, kuas føtter og flanke som kan ha jord, avføring, støv, hud- og hårlak på seg. Aktuelle mikroorganismer her er fekale streptokokker, *E. coli* og andre tarmbakterier, *Li. monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *Staph. aureus*, bakteriesporer, mugg og gjær, og koliforme bakterier. Fjøslufta inneholder ofte *B. subtilis* fra høystøv, streptokokker, mikrokokker, coryneforme bakterier, mugg og gjær (Adams & Moss 2008; Asperger & Zangerl 2002; Frank & Hassan 2002; Walstra et al. 2006).

Melkingsutstyr med sprekker i gummiener eller med såkalte blindveier/stusser må unngås. Utstyr som spenekopper, rør og tanker må rengjøres regelmessig og tilfredsstillende. Dårlig rengjort melkingsutstyr kan være kilde for store mengder mikroorganismer, som opprinnelig stammer fra melk, og fører da til kontaktsmitte ved melking og lagring av melka. Aktuelle bakterier her er mikrokokker, streptokokker, sporedannere, laktokokker, *Pseudomonas* spp. og koliforme bakterier (Frank & Hassan 2002; McPhee & Griffiths 2002; Walstra et al. 2006).

Vannet som benyttes ved vasking må være av god kvalitet. Ved bruk av urent vann er det risiko for kontaminering av bakterier som *Pseudomonas* spp., koliforme, coryneforme eller *Alcaligenes* spp. (Frank & Hassan 2002; Walstra et al. 2006). Overflatevann skal ikke benyttes, da mange Gram-negative stavbakterier kan være til stede (Walstra et al. 2006).

Fôret inneholder ofte mikroorganismer, da særlig sporedannere som *Bacillus* spp. og *Clostridium* spp., eller melkesyrebakterier og *Li. monocytogenes*. Fôret kan falle direkte i melka, eller mikroorganismene kan overleve i fordøyelsessystemet og forurense via avføringen (Frank & Hassan 2002; Walstra et al. 2006).

Melka kan forurennes direkte av de personene som steller dyrene og utfører melking, og disse personene kan i tillegg være syke (Asperger & Zangerl 2002; Walstra et al. 2006). Aktuelle bakterier her er koliforme bakterier, enterokokker, stafylokokker og *Salmonella* spp. (Frank & Hassan 2002).

2.1.2.4. Forebyggende arbeid

For å forhindre kontaminering av råmelka er det viktig å stille dyrene for å holde dem både friske og rene, vaske jurene før melking, rengjøre og vedlikeholde utstyr, rydde og rengjøre i fjøset, samt ha gode rutiner med personlig hygiene (Adams & Moss 2008; Walstra et al. 2006). Ellis et al. (2007) viste at bedre rengjorte kyr ga bedre melkekvalitet, inkludert lavere bakterieinnhold og færre tilfeller av mastitt sammenliknet med mindre rene kyr. Rolige dyr ved melking vil hindre unødig oppvirvling av høy og støv på gulvet. Hygienisk design på utstyr og bruk av rent vann er viktige faktorer for å sikre tilfredsstillende rengjøring (Desmarchelier & Fegan 2002; Walstra et al. 2006).

Kjøling av melk vil generelt hemme bakterievekst (Walstra et al. 2006). Dette er særlig viktig for å unngå toksindannelse hos *Staph. aureus* dersom bakterien er til stede i melka. Ved temperaturer under 7 °C vil ikke toksiner dannes. Denne bakterien dør ved pasteurisering, men toksinet er svært varmeresistent og vil forbli aktivt (Asperger & Zangerl 2002; Rørvik & Granum 2007). Termisering er en mild varmebehandling som ofte utføres på meieriet når melka ankommer. Melkeforskriften (1995) §2 nr. 5 definerer termisering som ”oppvarming av rå melk i minst 15 sekunder ved en temperatur på mellom 57 og 68°C, slik at melka etter denne behandlingen fortsatt gir positiv fosfataseprøve.”. Nærmest alle psykrotrofe bakterier

dør, i tillegg til enkelte andre bakterier, noe som begrenser vekst og dannelse av varmeresistente enzymer (Walstra et al. 2006). Å kjøle melka til 4 °C innen 2 timer etter melking er viktig for å hindre vekst av *E. coli* (Desmarchelier & Fegan 2002).

Å gjennomføre risikoanalyse for kritiske kontrollpunkt (HACCP), ha kontroll på persontrafikk og gi opplæring til personell om mikrobielle smitteveier og så videre kan bidra til å unngå forurensing av og smitte via råmelk (Reed & Grivetti 2000).

2.2. *ESCHERICHIA COLI*

2.2.1. Bakteriearten *E. coli*

Bakteriearten *E. coli* tilhører slekten *Escherichia* i familien Enterobacteriaceae. Bakterien er en ikke-sporedannende, fakultativ anaerob (kan vokse med og uten O₂), mesofil, Gram-negativ stavbakterie som ofte er bevegelig ved hjelp av flageller rundt hele cellen. Noen stammer har også fimbria eller pili: hårlignende proteinstrukturer som er assosiert med bakterienes evne til henholdsvis å feste seg til overflater eller å binde bakterieceller for overføring av DNA (Desmarchelier & Fegan 2002; Tortora et al. 2007; Wasteson 2007). *Escherichia* ble isolert fra avføring for første gang i 1885 (Desmarchelier & Fegan 2002). Stammer kan differensieres ved å oppgi bakteriens O- og H-antigen, hvor O-antigen angir bakteriens overflateantigen, også kalt lipopolysakkaridantigen, og H-antigen angir bakteriens flagellantigen. Serogrupper deles med bakgrunn i O-antigen og deles videre i serotyper med bakgrunn i H-antigen (Kaper et al. 2004).

2.2.1.1. Vekst og toleranse

Vekstkravene varierer blant de ulike *E. coli*-stammene og er i tillegg avhengige av de ulike vekstfaktorenes verdier. Siden bakterien er mesofil, kan vekst foregå ved ca. 7-48 °C. Optimumstemperatur for vekst er ofte 37 °C, men kan være mellom 35 og 40 °C (Desmarchelier & Fegan 2002; Wasteson 2007). Generasjonstiden for *E. coli* ved 37 °C er ca. 20 minutter (Walstra et al. 2006), mens den ved 15 °C vil være ca. 2 timer og 10 timer ved 8 °C (Vitenskapskomiteen for mattrygghet 2006). *E. coli* er mer sensitiv overfor varme enn blant annet *Salmonella* spp. Bakterien overlever ikke pasteurisering. En oppholdstid på 0,78 minutter ved 58 °C fører til reduksjon med 1 log-enhet i *E. coli* i kumelk. Varmesensitiviteten avhenger av vekstmediets pH, sammensetning og vannaktivitet (a_w), hvor for eksempel en nedgang i vannaktivitet kan gi økt varmeresistens. Optimal vannaktivitet er 0,995, mens 0,95

ofte er den laveste a_w -verdien for vekst av *E. coli*. Denne minimumsverdien tilsvarer ca. 8 % NaCl (Desmarchelier & Fegan 2002).

Mange patogene bakterier har utviklet evne til å overleve syre i næringsmidler, i magesekken og delvis i tarmen, noe som er nødvendig for at disse bakteriene skal gi sykdom. I tarmen er fermenteringsprodukter som svake syrer et hinder for mikrobiell overlevelse som patogene bakterier må overvinne, deriblant *E. coli*. Jo mindre syretolerant en bakterie er, jo høyere infeksjonsdose kreves for å gi sykdom. Ved bruk av syrenøytraliserende legemidler kan infeksjonsdosen av syresensitive bakterier halveres (Lin et al. 1996). Gorden & Small (1993) fant at åtte av ti testede *E. coli* fra menneskers normalflora var syreressistente.

Ifølge Desmarchelier & Fegan (2002) kan *E. coli* vokse ved pH 4,4-10, med optimum ved pH 6-7. Minimumsverdien for vekst avhenger av type syre, inhibitorer, temperatur og vannaktivitet. For eksempel kan *E. coli* O157 vokse ved pH 4,5 ved 37 °C dersom den lave pH skyldes saltsyre, men ikke om den skyldes melkesyre. Det finnes både syreressistente og syresensitive stammer såvel blant de ikke-patogene *E. coli* som de patogene enterohemorragisk *E. coli* (EHEC), enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), enterotoksisk *E. coli* (ETEC) og enteropatogen *E. coli* (EPEC).

2.2.1.2. Forekomst i næringsmidler

Hovedreservoaret for *E. coli* er menneskers og varmblodige dyrs tarmsystem, hvor den bidrar med vitaminer og nedbrytning av mat som ellers er vanskelig å fordøye (Tortora et al. 2007). På grunn av dette reservoaret brukes deteksjon av *E. coli* som en indikasjon på fekal forurensning, altså som en indikatororganisme (Adams & Moss 2008). *E. coli* har blitt funnet i grønnsaker, frukt, kjøtt og kjøttprodukter, råmelk og meieriprodukter, vann og avføring. Mastitt eller fekal forurensning i forbindelse med melking kan føre til kontaminering av *E. coli* i melk (Rysanek et al. 2009). Bakterien kan være et problem i meierier på grunn av rekontaminering ved hygieniske avvik hos personalet eller ved utilstrekkelig vask. Med unntak av EIEC (Wasteson 2007), kan *E. coli* fermentere laktose (Walstra et al. 2006; Wasteson 2007) og ødelegge melkeprodukter, blant annet ved tråddannelse i melk og saltlake eller ved oppblåsing av ost som følge av gassdannelse (Desmarchelier & Fegan 2002). Ifølge Wasteson (2007) vil melkesyrebakterier delvis hemme bakteriens vekst. *E. coli* greier seg bedre enn *Salmonella* spp. i konkurranse mot andre mikroorganismer, men utkonkurreres lett av psykrotrofe bakterier som *Pseudomonas* spp. ved sin nedre vekstgrensetemperatur.

2.2.2. Ulike *E. coli*-stammer

De fleste av *E. coli*-stammene i fordøyelsessystemet er ikke patogene, men noen av de apatogene kan føre til sykdom hos mennesker med nedsatt immunforsvar, eller dersom fordøyelsessystemets barrierer blir brutt (Kaper et al. 2004). Blant de patogene stammene har EIEC, ETEC og EPEC reservoar i menneskers tarmsystem (Kaper et al. 2004; Wasteson 2007). Det som skiller de patogene bakteriene fra de ikke-patogene er de patogenes besittelse av mekanismer som gjør dem i stand til å feste seg andre steder enn hvor de vanligvis befinner seg, slik som urinrør og tynntarm (Kaper et al. 2004; Wasteson 2007).

2.2.2.1. Enterotoksisk *E. coli*

Infeksjon av enterotoksisk *E. coli* er en vanlig årsak til diaré blant barn i utviklingsland og blant turister (Desmarchelier & Fegan 2002; Kaper et al. 2004; Wasteson 2007). Bakteriene spres med avføring fra syke, ofte via drikkevann. Det kreves en høy infektiv dose for å utvikle sykdom, ca. 10^6 - 10^8 bakterier. Inkubasjonstiden er 1-7 døgn (Wasteson 2007). I løpet av denne tiden koloniserer bakteriene på slimhinnen i tynntarmen ved hjelp av fimbrier og danner toksiner. Både varmelabile enterotoksiner og varmestabile enterotoksiner kan produseres av ETEC (Desmarchelier & Fegan 2002; Kaper et al. 2004; Wasteson 2007). Enterotoksisk *E. coli* gir akutt vandig diaré, som kan være mild og vare i kort tid. Sykdommen kan ved mer alvorlige tilfeller likne kolera (Desmarchelier & Fegan 2002; Wasteson 2007). Dyr kan også bli syke av disse bakteriene, men stammene er vertsspesifikke og ETEC regnes ikke som en zoonose (Kaper et al. 2004; Wasteson 2007). Dårlig håndtering ved transport og distribusjon av fransk Brie og Camembert har vært årsak til ETEC-utbrudd (Desmarchelier & Fegan 2002).

2.2.2.2. Enteropatogen *E. coli*

Enteropatogen *E. coli* var den første patogene *E. coli* som ble beskrevet, og var en kilde til diaré blant barn i industriland på grunn av dårlig hygiene. Nå er bakterien uvanlig i I-land, men i U-land er den en vanlig årsak til barnedødelighet (Kaper et al. 2004; Wasteson 2007). Dyrearter kan være smittebærere, mens menneskers tarmsystem er hovedreservoaret. Dårlig hygiene og fekal forurenset drikkevann er de vanligste smitteårsakene. Enteropatogen *E. coli* har blitt isolert fra råmelk og melkeprodukter som bløtost og (re-)infisert pasteurisert melk (Food Standards Australia New Zealand 2009). I likhet med ETEC kreves det en høy infektiv dose for å utvikle sykdom. Sykdommen arter seg som vandig diaré, noen ganger slimete, og med oppkast og feber noe senere i sykdomsbildet. Varigheten kan være fra 12 til

72 timer eller lengre (Wasteson 2007). Tarmskade og vanntap kan gi senkomplikasjoner (Desmarchelier & Fegan 2002; Wasteson 2007). Bakteriens virulensfaktor likner mye på den hos shigatoksinproduserende *E. coli* (STEC), med ”attaching and effacing adhesion lesion” (AE-lesjon) og type 3 sekresjonssystem (T3SS) (Desmarchelier & Fegan 2002; Wasteson 2007). Disse faktorene omtales i avsnitt 2.2.2. Ved EPEC-infeksjon skyldes ikke diareen toksiner, men skade på tarmepitelet og forstyrret elektrolyttbalanse (Wasteson 2007).

2.2.2.3. *Shigatoksinproduserende/Enterohemorragisk E. coli*

Shigatoksinproduserende *E. coli* og enterohemorragisk *E. coli* har hovedreservoar i drøvtyggers tarmsystem. Kjøttdeig og råmelk er vanlige smittekilder. Infektiv dose er lav, gjerne under 100 celler (Kaper et al. 2004; Warnecke & Gill 2005), med inkubasjonstid på 1-14 døgn, hvor 3-4 døgn regnes som normalt (Mead & Griffin 1998; Warnecke & Gill 2005). Bakteriene fester seg til epitelcellene i tykktarmen ved bruk av AE-lesjon og produserer cytotoksinet shigatoksin, som transporteres via blodet til nyrene. Her oppstår det gjerne betennelse, som kan videreutvikles til hemolytisk uremisk syndrom (HUS). Vanlige symptomer på STEC/EHEC-infeksjon er magesmerter og diaré med eller uten blod, hvor EHEC gir blødning etter et par dagers varighet. Enkelte kan få oppkast og svak feber. Infeksjon av EHEC kan også være symptomfri, altså ha friske smittebærere. Det finnes mange ulike STEC serogrupper, hvor blant annet serogruppene O157, O26 og O111 kan gi HUS (Desmarchelier & Fegan 2002). Serogruppen O157 omtales nærmere i avsnitt 2.2.2.

2.2.2.4. *Enteroinvasiv E. coli*

Enteroinvasiv *E. coli* er ikke vanlig i I-land (Desmarchelier & Fegan 2002; Wasteson 2007). Bakteriene har evnen til å invadere tarmepitelceller, hvorfra de kan bevege seg videre i epitelcellelaget. Dette gir blødninger og lokal vevsdød i epitelcellelaget som følge av betennelsesreaksjoner (Wasteson 2007). Type 3 sekresjonssystem er involvert i bakteriens invaderende egenskap (Kaper et al. 2004). Symptomer vil være blodig diaré som også kan være vandig (Desmarchelier & Fegan 2002; Kaper et al. 2004), feber og kraftige magesmerter. Infeksjonsdose kan være ca. 10^6 - 10^8 bakterier (Desmarchelier & Fegan 2002; Wasteson 2007), mens det ifølge FDA (2003) er tilstrekkelig med 10 celler for å gi sykdom. Menneskers tarmsystem er reservoar. Smittekilder har vært personsmitte og avføringskontaminert mat og vann. Enteroinvasiv *E. coli* har blant annet gitt sykdomsutbrudd via Camembert kontaminert av dårlig filtrert vaskevann fra en elv (Desmarchelier & Fegan

2002) og via upasteurisert melk (U.S. Food and Drug Administration 2003). Gorden & Small (1993) isolerte ni EIEC-stammer fra menneskelig normalflora, hvorav seks var syrer resistente.

2.2.2.5. *Enteroggregativ E. coli*

Forekomsten av infeksjon med enteroggregativ *E. coli* (EAEC) øker (Kaper et al. 2004). Disse bakteriene kan danne blant annet ulike cytotoksiner og enterotoksinene EAST1 og ShET1 (Kaper et al. 2004; Warnecke & Gill 2005), som henholdsvis gir vandig diaré og sekretorisk diaré (Kaper et al. 2004). Diaré grunnet EAEC er ofte vedvarende og er et problem både i U-land og I-land (Wasteson 2007). Enteroggregativ *E. coli* kjennetegnes av gensamlingen AggR og ved at bakteriene ved hjelp av fimbrier festes på tykktarmens HEp-2-celler i et murliknende mønster – autoaggregativt adhesjonsmønster – og gir en mild mucosaødeleggelse (Desmarchelier & Fegan 2002; Kaper et al. 2004). Kontaminert upasteurisert ost har vært involvert i EAEC-utbrudd i Italia (Kaur et al. 2010).

2.2.2.6. *Diffus adherent E. coli*

Diffus adherent *E. coli* (DAEC) har en mer diffus festing til HEp-2-cellene enn hva EAEC har. Bakteriene er en vanlig årsak til diaré blant eldre barn i U-land (Desmarchelier & Fegan 2002; Wasteson 2007), men også til urinveisinfeksjoner (Wasteson 2007).

2.2.3. *E. coli* O157

I 1982 ble *E. coli* O157:H7 anerkjent som en patogen bakterie etter to utbrudd med hemorragisk kolitt. Hemorragisk kolitt er blødning på tykktarmveggen, hvor vandig diaré etterfølges av blodig diaré og magesmerter. Shigatoksinproduserende *E. coli*, inkludert O157:H7, ble i 1983 koblet til HUS. Det er fortsatt usikkert hvor lenge *E. coli* O157 har vært sykdomsårsak blant mennesker. På bakgrunn av tilgjengelig informasjon mener Mead & Griffin (1998) at bakterien kan ha framtrådt som patogen en gang i løpet av det forrige århundre og har gått fra å være nærmest ubetydelig til å skape en global helsebekymring av stort omfang. I 1999 var det estimerte antallet for *E. coli* O157-sykdomstilfeller i USA 73 480 stykker årlig, hvor ca. 85 % av tilfellene stammet fra matinfeksjon (Mead et al. 1999).

2.2.3.1. Forekomst av *E. coli* O157 i næringsmidler

Hovedreservoaret for *E. coli* O157 er, som tidligere nevnt, tarmsystemet hos drøvtyggere som storfe og sau. Overføring av smitte til mennesker kan skje via mat, vann, direkte kontakt med smittede dyr eller personer. Juice, grønnsaker som reddik og salat, frukt og spekepølse har

vært involvert i sykdomsutbrudd. Bakterien blir ofte funnet i råmelk og kvernet kjøtt, råvarer som har vært kilde til en mengde utbrudd over hele verden (Desmarchelier & Fegan 2002; Mead & Griffin 1998; Wasteson 2007). Pasteurisert melk har blant annet blitt kontaminert i dårlig vaskede rør og gummideler på maskiner, og både konsummelk og yoghurt av kontaminert pasteurisert melk har ført til EHEC-utbrudd. Konsum av råmelk og av gårdsost, fersk ost og halvfast ost av upasteurisert melk har gitt sykdom grunnet tilstedeværelse av *E. coli* O157 (Desmarchelier & Fegan 2002).

2.2.3.2. Sykdom

E. coli O157 fester seg til mikrovilli på tarmepitelcellene ved bruk av AE-lesjoner. Type 3 sekresjonssystemet er et nålliknende system som brukes til å overføre spesifikke reseptorer, kalt "translocate intimin receptor" (Tir), inn i mikrovillis overflate. Dette er reseptorer for intimin, som bakterien uttrykker på sin overflate. Dermed kan bakterien feste seg til mikrovilli. Reseptoren er også samlingspunkt for aktinkjeder på innsiden av mikrovilli. Aktinkjedene er med på å endre cytoskjelettet og heve mikrovilli, som etter hvert danner en pidestall og omslutter bakterien. Intimin er også med på å stimulere immunrespons og svulming. Disse endringene hindrer epitelcellen i å fungere som normalt og resulterer i diaré. Shigatoksin dannes av *E. coli* O157 i tykktarmen og kan vandre via blodet til nyrene, hvor nyrebetennelse kan oppstå. I tillegg kan toksinet gi skader på tarmen og blodig diaré ved å inhibere proteinsyntesen hos vertscellen, noe som resulterer i celledød (Kaper et al. 2004; Wasteson 2007).

Mennesker som har blitt smittet med *E. coli* O157 kan være symptomfrie og samtidig spre smitten – såkalte friske smittebærere. Enkelte kan få mild diaré, mens andre får kraftig diaré. Vanlig sykdomsforløp starter med vandig diaré som etter et par dager går over til å være kraftig og blodig med magekramper. Blodmengde og utvikling av feber og oppkast varierer (Mead & Griffin 1998; Scheiring et al. 2008; Wasteson 2007).

Som nevnt kan shigatoksin gi nyrebetennelse (Kaper et al. 2004). Ved sykdom blant barn og eldre utvikler ca. 10 % av dem hemolytisk uremisk syndrom 5-13 dager etter diaréstart. Hemolytisk uremisk syndrom er en svært alvorlig tilstand som omfatter akutt nyresvikt, nedgang i antall blodplater og ødeleggelse av røde blodceller. Videre kan sykdommen påvirke hjertet, sentralnervesystemet, respirasjonen og flere indre organer. For ca. 3-5 % er utfallet fatalt. Størsteparten av pasientene overlever altså, men en rekke senkomplikasjoner kan oppstå. Dette kan være nyreskade, gallestein, smalere tykktarm, betennelse på

bukspyttkjertelen, diabetes, glukoseintoleranse og svekket kognitivitet (Mead & Griffin 1998; Scheiring et al. 2008; Wasteson 2007).

Pasienter med *E. coli* O157-infeksjon bør hospitaliseres for oppfølging og intravenøs væske- og næringsforsyning. Forstoppelsesmidler må ikke benyttes, da dette er forbundet med større risiko for utvikling av HUS ved at toksinene forblir i tarmen. Antibiotikabehandling er omdiskutert. Noen studier tyder på at antibiotika vil føre til lysering av bakteriecellene, frigjøring av shigatoksin og økt fare for HUS, mens andre studier indikerer at behandlingen er beskyttende eller at den ikke påvirker faren for HUS. I tillegg kan det virke som at tidspunkt for antibiotikabehandling spiller en stor rolle, hvor behandling innen tre døgn kan redusere faren for HUS. Ved HUS må væske- og elektrolyttbalansen kontrolleres, og omtrent halvparten av pasientene har behov for dialyse (Mead & Griffin 1998; Scheiring et al. 2008).

2.2.3.3. Deteksjon av *E. coli* O157 ved dyrking på agar

E. coli kan nedbryte laktose til glukose og galaktose, glukose til pyrodruesyre, pyrodruesyre til melkesyre, etanol, ravsyre, eddiksyre, CO₂ og H₂ (Tortora et al. 2007). I motsetning til de fleste andre *E. coli*, kan ikke *E. coli* O157 forgjære sorbitol (March & Ratnam 1986; Noveir & Halkman 2000). Ved identifisering av bakterien er det derfor vanlig å benytte vekstmediet Sorbitol MacConkey agar (SMAC), hvor vekst av *E. coli* O157 gir fargeløse kolonier, i motsetning til lillafargede kolonier fra sorbitolfermenterende bakteriestammer (Borczyk et al. 1987; Fujisawa et al. 2000). Ifølge Mead & Griffin (1998) regnes SMAC for å gi et generelt pålitelig resultat.

March & Ratnam (1986) fant at *E. coli* O157 ble gjenkjent i 90 % av testprøvene på SMAC, mens kun 50 % ble gjenkjent på MacConkey agar (MAC). I motsetning til test av avføring på MAC hvor alle kolonier var fargede, viste SMAC både lilla og fargeløse kolonier, med svært mange fargeløse kolonier fra prøver med blodig diaré. Det ble funnet at ca. 15 % av de fargeløse koloniene på SMAC ikke stammet fra *E. coli* O157, men fra andre *E. coli*, *Proteus* spp., andre koliforme bakterier og *Pseudomonas* spp., og *Morganella* spp.

Noveir & Halkman (2000) henviser til et kapittel i U.S. Food and Drug Administration sin "Bacteriological Analytical Manual" fra 1998, hvor det rapporteres om vanskeligheter i observering av *E. coli* O157 på SMAC ved tilfeller med høy kontaminasjon av koliforme bakterier, som maskerer tilstedeværelsen av *E. coli* O157.

Dersom det oppstår usikkerhet rundt kolonier på SMAC, kan antiserumkit eller lateksagglutineringskit brukes for å detektere O157 antigen (Mead & Griffin 1998). For et mer spesifikt vekstmedium kan cefixime og tellurite tilsettes (Fujisawa et al. 2000; Mead & Griffin 1998; Zadik et al. 1993). I sin studie viste Zadik et al. (1993) at SMAC tilsatt cefixime og tellurite fremmet vekst av *E. coli* O157 og *Shigella (Sh.) sonnei*, riktignok med redusert kolonistørrelse hos *Sh. sonnei*, mens 67 % av andre *E. coli*, 95 % av *Aeromonas* spp, og 100 % av *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp. og *Plesiomonas* spp. ble inhibert.

2.2.3.4. Vekst og toleranse hos *E. coli* O157

Bakteriens nedre temperaturgrense for vekst er 8 °C og øvre grense er 44-45,5 °C ifølge Desmarchelier & Fegan (2002). Ifølge Wasteson (2007) vokser *E. coli* O157 dårlig ved 44 °C. *E. coli* O157 kan overleve ved lave temperaturer, som ved 4 °C i opp til 8 uker i kjøttdeig (Cheng & Kaspar 1998). Flere studier har vist at bakterien også kan overleve ved lave temperaturer når den lever i et surt miljø, riktignok med synkende antall overlevende bakterier i løpet av lagringen. Slike observasjoner har blant annet blitt gjort ved 4 °C i 13 døgn i yoghurt med pH 4,11-3,94 (Bachrouri et al. 2002), ved 4 °C i 12 døgn i yoghurt med pH 4,0 og i 35 døgn i kulturmilk med pH 4,1 (Dineen et al. 1998), ved 4 °C i over 4 uker i tryptikase soyabuljong surgjort med melkesyre til pH 5,5 (Elhanafi et al. 2004), ved 7 °C i 6 døgn i fruktjuice med pH 3,2 og 3,6, yoghurt med lavt fettinnhold med pH 3,9 og en japansk fermentert melk kalt 'Yakult' med pH 3,6 (Hsin-Yi & Chou 2001), ved 4 °C i 6 døgn i afrikansk yoghurt med pH 4,2 (Ogwaro et al. 2002) og ved 4 °C i 3 døgn i kulturmilk fra Zimbabwe kalt 'Ergo' med pH 4,3 (Tsegaye & Ashenafi 2005).

Bachrouri et al. (2002), Hsin-Yi & Chou (2001), Ogwaro et al. (2002) og Tsegaye & Ashenafi (2005) påpeker at bakterien klarte seg bedre i surt miljø ved kjølelagring enn ved romtemperatur, hvor bakteriereduksjonen gikk hurtigere. I Dlamini & Buys (2009) sin studie ble også kjølelagring nevnt som en beskyttende faktor. Elhanafi et al. (2004) framla imidlertid hypoteser om at bakteriens syreressistensmekanismer fungerer dårligere ved kjølelagring eller at de hydrofile cytoplasmaproteinene som produseres av *E. coli* ved kuldesjokk ned til 10 °C (Goldstein et al. 1990) har en inhiberende effekt på syreressistensmekanismene.

E. coli O157:H7 er mer syretolerant enn andre *E. coli* (Bachrouri et al. 2002; Lin et al. 1995; Wasteson 2007). Lin et al. (1995) fant at *E. coli* O157:H7 kan vokse ved pH 4,4, og bakterien

har ved flere studier overlevd ved pH 2,5 (Benjamin & Datta 1995; Lin et al. 1995) og ved pH 3,0 (Benjamin & Datta 1995; Cheng et al. 2003; Goodson & Rowbury 1989; Lin et al. 1995). Det er vist at syretoleransen hos *E. coli* O157:H7 varierer mellom stammene (Benjamin & Datta 1995; Cheng et al. 2003; Dlamini & Buys 2009).

Noen av *E. coli* O157:H7 sine syreressistensmekanismer er et oksidativt system som krever sigmafaktoren RpoS, et arginin-avhengig system som blant annet krever genet *adi*, og et glutamat-avhengig system som blant annet krever *gadA* eller *gadB*, samt flere genetiske faktorer. RpoS er et syresjokk-gen, *adi* er et gen som koder for arginin dekarboksylase, og *gadA* og *gadB* er glutamat dekarboksylase-kodende gener (Castanie-Cornet et al. 1999; Lin et al. 1995). RpoS har vist seg å være viktig for overlevelse i anaerobt miljø (Small et al. 1994).

Ogwaro et al. (2002) observerte i sin studie at fermenteringstemperatur påvirket vekst av *E. coli* O157:H7. Bakterien vokste i løpet av fermentering ved yoghurtproduksjon med fermenteringstemperaturene 25, 30 og 37 °C i 24 timer. Da fermenteringstemperaturen var 43 °C, sank imidlertid bakterieinnholdet fra og med fermenteringens start.

I yoghurtprøvene som hadde blitt fermentert ved 25 og 30 °C var slutt-pH henholdsvis 5,0 og 4,4, og etter fermentering ved 37 °C var pH 4,0. I disse tre prøvene ble antall *E. coli* O157:H7 redusert med 2 log-enheter etter 5 døgn ved 4 °C. Prøven fra 37 °C hadde imidlertid ikke like høyt antall *E. coli* O157:H7 før kjølelagringens start og reduksjonen startet tidligere sammenliknet med de to andre nevnte prøvene. I prøven fra fermentering ved 43 °C var også slutt-pH 4,0, men her hadde alle *E. coli*-bakteriene dødd etter lagring i 4 døgn ved 4 °C.

Påvirkningen av fermenteringstemperatur på utviklingen av *E. coli* O157:H7 var imidlertid trolig indirekte, i den forstand at den termofile yoghurtkulturen vil vokse saktere ved de laveste temperaturene benyttet i denne studien. Dermed vil syrekulturens vekst, ikke fermenteringstemperaturen, være den inhiberende faktoren.

Denne studien viste i tillegg at slutt-pH har betydning for bakteriens overlevelse.

Dlamini & Buys (2009) studerte to kulturmelksprøver tilsatt *E. coli* O157:H7, som var en sørafrikansk kulturmelk kalt 'Amasi'. Her ble også betydningen av slutt-pH vist. Råmelk ble fermentert ved 30 °C i 3 døgn og pasteurisert melk tilsatt syrekultur ble fermentert ved 30 °C i 1 døgn og kjølelagret i 2 døgn. De fant at selvsyrnet råmelk med slutt-pH 4,0 hadde større hemmingseffekt mot *E. coli* O157:H7 sammenliknet med effekten av kommersielt fermentert pasteurisert melk med slutt-pH 4,4. Det kan imidlertid settes spørsmålstegn ved dette

forsøksdesignet. Den sistnevnte slutt-pH kunne muligens vært lavere dersom denne prøven også hadde blitt lagret ved 30 °C i 3 døgn slik som råmelksprøven. Ulik lagring vil gjøre prøvene mindre egnet for sammenlikning mot hverandre.

Mufandaedza et al. (2006) inokulerte *E. coli* O157:H7 sammen med blant annet DL-kultur og en renkultur av *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* hver for seg i UHT-melk, samt *E. coli* O157:H7 alene i råmelk uten tilsatt syrekultur. I likhet med prøven ved 25 °C i studien hos Ogwaro et al. (2002), økte antall *E. coli* O157:H7 i alle prøvene fram til uttaket ved den 18. time under fermentering ved 25 °C, hvor råmelk hadde pH 6,7 og UHT-melk med syrekulturer hadde pH 4,5. Etter 24 timer hadde UHT-melk med DL-kultur nådd pH 4,4 og antall *E. coli* gikk noe ned, mens mengden gikk ned ca. 3 log-enheter i UHT-melk med *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, hvor slutt-pH var 4,3. I prøver laget av råmelk var pH 5,2 etter 24 timer og innholdet av *E. coli* O157:H7 var stabilt.

Antall melkesyrebakterier var ca. 1 log-enhet lavere i råmelk enn i UHT-melk tilsatt syrekultur etter 48 timer.

Også syrningshastighet har vist seg å ha betydning for overlevelse av *E. coli* O157:H7 i syrnede produkter. Sammenliknet med prøvene fermentert ved 25 og 30 °C, gikk syrningen hurtigere ved 37 og 43 °C, samt i noe større grad ved 43 enn ved 37 °C i Ogwaro et al. (2002) sin studie av syrning av yoghurt. Reduksjon av *E. coli* O157:H7 var størst i prøven syrnet ved 43 °C. Syrningsraten hadde også vært noe raskere i UHT-melk med *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, hvor reduksjonen av antall *E. coli* O157:H7 var størst, enn i prøvene av UHT-melk tilsatt DL-kultur og råmelk uten tilsatt syrekultur i forsøket utført av Mufandaedza et al. (2006).

2.3. BARRIERETEKNOLOGI

Barrierteologi handler om å utnytte såkalte barrierer for å kontrollere vekst av eventuelle uønskede mikroorganismer i det aktuelle næringsmidlet (Fellows 2000).

Konserveringsmidler, høy eller lav temperatur, pH, konkurrerende mikroflora, bakteriosiner, modifisert atmosfære, salt og CO₂ er eksempler på barrierer; de hemmer mikrobiell vekst. Da effektiviteten og virkningsmekanismen varierer blant barrierene, kan det være ønskelig å kombinere to eller flere for å kunne gi en samlet sterkere barriereeffekt. Kombinering kan også senke effekten. Ved valg av barrierer må det tas hensyn til mengde og type

mikroorganismer som kan kontaminere næringsmidlet, samt barrierenes effekt på produktets kvalitetsegenskaper (Fellows 2000; Leistner & Gorris 1995). Homeostase er et sentralt begrep i barriereteknologien. Dette omfatter mikroorganismers mekanismer for å opprettholde indre stabilitet og balanse, noe som er nødvendig for vekst. Å kombinere barrierer som angriper flere av bakterienes balansmekanismer, som evnen til å justere cellens pH og saltinnhold, kan gjøre organismene mer svekket enn ved ett angrep på ett punkt, og dermed gi god hemmingseffekt (Leistner & Gorris 1995). Ikke alle celler i en populasjon får samme skadegrad, og ulikt stress gir ulike typer og mengder skader på forskjellige steder som resulterer i ulike reparasjonsmekanismer (Wu 2008).

2.3.1. Barrierer

2.3.1.1. Kjølelagring

Melk og de fleste melkeprodukter kjølelagres ved $<4^{\circ}\text{C}$ for å øke holdbarheten. Kjøling senker hastigheten på kjemiske og enzymatiske reaksjoner, og endringer i proteinstrukturer kan forekomme (Tortora et al. 2007; Walstra et al. 2006). Mesofile bakterier, slik som *E. coli*, kan utsettes for kuldesjokk. Det kan da oppstå skade på cellemembraner, hvorfra lekkasje av cytoplasmisk innhold kan observeres. Dette vil påvirke næringsopptak og stabilitet hos DNA og proteiner (Adams & Moss 2008; Polissi et al. 2003). En økning i enkelttrådkutt i DNA og syntese av spesifikke beskyttende proteiner har blitt observert som en følge av kjøling. Gram-negative bakterier i eksponentiell fase har membraner som er mer mottakelige for kuldesjokk enn Gram-positive bakteriers membraner (Adams & Moss 2008).

2.3.1.2. Pasteurisering

Melkeforskriften (1995) § 47 omtaler framstilling av pasteurisert melk slik:

”Pasteurisert melk skal fremstilles ved at melk oppvarmes til minst $71,7^{\circ}\text{C}$ i minst 15 sekunder eller ved en pasteuriseringsprosess med tid/temperatur-kombinasjoner som gir samme hygieniserende effekt. Pasteurisert melk skal gi negativ fosfataseprøve og positiv peroksydaseprøve.(...)”

Animaliehygieneforskriften (2008) avsnitt IX, kapittel II, del II nummer 1a inneholder de samme kravene.

Hvilke eventuelle endringer som skjer i melka ved varmebehandling avhenger i høy grad av hvilken kombinasjon av temperatur og tid som blir benyttet. En av hovedendringene ved pasteurisering er inaktivering av enzymet alkalisk fosfatase, som er til stede i råmelk (Walstra et al. 2006). Dette enzymet inaktiveres ved en noe høyere tid/temperatur-kombinasjon enn *M. tuberculosis*, som er den mest varmeresistente ikke-sporulerende patogene bakterien. Derfor er negativ fosfatasetest en god indikator på tilfredsstillende varmebehandling (Bylund 2003; Walstra et al. 2006). En kombinasjon av tid og temperatur, som av praktiske årsaker er vanlig å bruke ved småskalaproduksjon, er 63 °C i 30 minutter, som også gir negativ fosfatasetest (Vitenskapskomiteen for mattrygghet 2006).

Utenom inaktivering av enkelte enzymer og dreping av de aller fleste bakteriene i råmelka, har pasteurisering liten effekt på melka. Bakteriostatiske egenskaper, smak og proteiner forblir praktisk talt uendret (Walstra et al. 2006).

Varmebehandlingens virkningsmekanisme mot bakterier innebærer denaturering av diverse proteiner og senking av enzymatiske reaksjoner (Adams & Moss 2008; Tortora et al. 2007). Veksten reduseres kraftig når temperaturen overstiger bakteriens optimumstemperatur for vekst, da plasmamembranen nedbrytes og proteiner denatureres. Disse endringene blir store nok til å drepe bakterien dersom temperaturen kommer over maksimumstemperaturen for bakterien (Adams & Moss 2008). Høy temperatur skader celleveggen og fører til tap av ioner, aminosyrer, peptider og nukleinsyrer (Wu 2008).

2.3.1.3. Konkurrerende mikroflora

Dynamikken i bakteriell vekst ved et miljø er et resultat av bakterietypenes respons på stressfaktorer som kan oppstå (Giraffa 2004). Stressfaktorer kan være endring i temperatur, pH, næringsinnhold og vannaktivitet.

Lagringstemperaturen for melka påvirker i stor grad hvilke bakterier som dominerer. Gram-positive bakterier, som melkesyrebakterier, vokser etter melking og ellers når melka er over 20 °C. Når melka blir nedkjølt, vokser fortrinnsvis psykrotrofe bakterier (Lafarge et al. 2004; Rasolofó et al. 2010). Vekst av melkesyrebakterier vil gi lavere pH, som utkonkurrerer sporedannere, koliforme bakterier og *Pseudomonas* spp. Noen danner bakteriosiner som hemmer andre melkesyrebakterier, *E. coli* og *Li. monocytogenes*. Sporedannere, mikrokokker

og laktobasiller overlever pasteurisering. Uten rekontaminering og med god kjølelagring vil melka holde seg godt i ca. 3 uker etter pasteurisering (Frank & Hassan 2002).

Utkonkurrering av bakterietyper i den totale mikroflora skyldes ofte at næringsstoffer forbrukes av konkurrerende bakterier, eller produksjon av hemmende metabolitter. Eksempelvis forbruker melkesyrebakterier næringsstoffer og senker pH. Dannelsen av metabolitter som hydrogenperoksid, hypothiocyanat, etanol, karbondioksid, bakteriosiner og diacetyl varierer blant stammene (Hsin-Yi & Chou 2001; Piard & Desmazeaud 1991; Piard & Desmazeaud 1992). Dineen et al. (1998) fant at vekst av *E. coli* O157:H7 ble hemmet i større grad av den termofile *Lactobacillus (Lb.) delbrueckii* subsp. *bulgaricus* enn av den mesofile *Lc. lactis* subsp. *lactis* eller *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. De ulike fermenteringstemperaturene kunne også ha påvirket inhiberingen.

Ved litteratursøk til denne oppgaven viste det seg å være vanskelig å finne relevant litteratur angående konkurrerende mikroflora.

2.3.1.4. Senking av pH

Senking av pH i bakteriers vekstmedium påvirker makromolekylers aktivitet og stabilitet. Eksempelvis synker bakteriens reaksjonsrate ved at enzymaktiviteten svekkes. Ved ekstreme pH-endringer kan det oppstå denaturering av proteiner (Adams & Moss 2008; Tortora et al. 2007; Walstra et al. 2006). Innholdet i uttrykket 'ekstreme pH-endringer' ble ikke omtalt nærmere i den refererte litteraturen.

Organiske syrer, som melkesyre, fører til nedgang i cytoplasmisk pH, noe som forstyrrer purinbasene i DNA og denaturerer essensielle enzymer. Organiske syrers anion, som anionet fra eddiksyre og maursyre, kan øke bakteriecellens kaliumopptak og gi økt væsketrykk i cellen. Glutamat transporteres ut for å stabilisere trykket, men dette forstyrrer cellens osmotiske trykk. Resultatet blir redusert vekstpotensial og levedyktighet hos bakterien (Warnecke & Gill 2005).

Råmelk har en pH på ca. 6,7. Fermenterte melkeprodukter har ofte en slutt-pH <4,6, og enkelte produkter, slik som yoghurt, kan ha pH <4,0 (Walstra et al. 2006).

2.3.1.5. Vannaktivitet

Vannaktivitet (a_w) er et mål for tilgjengelig vann i et produkt. Tilgjengeligheten gjelder for mikrobielle, enzymatiske eller kjemiske reaksjoner. Prosesser som inndamping, tørking, frysing, eller tilsetning av salt eller sukker reduserer et produkts vannaktivitet (Fellows 2000). Salt (NaCl) reduserer vannaktiviteten mer effektivt enn sukrose (Adams & Moss 2008). Ved vannaktivitet under 0,6 vil nesten all mikrobiell aktivitet stanse (Adams & Moss 2008; Fellows 2000). De fleste bakterier inhiberes ved $a_w < 0,90$. Oksygen, pH, CO₂, konserveringsmidler og temperatur påvirker vannaktivitetens inhiberende effekt. Effekten av lavere vannaktivitet øker når noen av de nevnte faktorene er under den aktuelle mikroorganismens krav for optimal vekst. Melk med pH $> 6,5$ og $a_w > 0,99$ er holdbar i noen dager, mens yoghurt med pH $< 4,5$ og $a_w < 0,95$ er holdbar i noen uker (Fellows 2000).

Fajardo-Lira et al. (1997) viste i sin studie at de benyttede yoghurtkulturene produserte synkende mengde syre når vannaktiviteten gikk ned, og at syreproduksjonen ble lavere ved tilsetning av sukrose enn ved tilsetning av glyserol. Glyserol ga en mye lavere vannaktivitet, muligens grunnet kjemikalietts evne til å bryte hydrogenbindingene i vannmolekyler. Forskjellen i hemmingseffekt mellom sukrose og glyserol kunne skyldes at glyserol økte det osmotiske trykket mer enn sukrose og at denne virkningen var sterkere enn den økte reduksjonen av vannaktivitet forårsaket av glyserol.

Bakterier trenger vann for å vokse, da de henter omtrent alle næringsstoffer fra vannløsninger omkring cellen (Tortora et al. 2007). Bakterienes cytoplasma er en vandig løsning hvor livsnødvendige reaksjoner finner sted (Adams & Moss 2008). Cytoplasma er omsluttet av en plasmamembran som er gjennomtrengelig for vannmolekyler, mens større molekyler går sakte igjennom eller trenger aktiv hjelp. Plasmamembranen inneholder enzymer som kan bryte ned næringsstoffer og produsere energi (Tortora et al. 2007). Dersom konsentrasjonslikevekten mellom cytoplasma og miljøet utenfor cellen forstyrres, kan cellen skades. Skade kan enten skje ved krymping av plasmamembranen grunnet færre vannmolekyler inni cellen enn utenfor, eller ved at plasmamembranen sprekker som følge av for mye vann på innsiden (Adams & Moss 2008; Tortora et al. 2007). Når plasmamembranen løsner fra celleveggen eller ødelegges, inhiberes cellens vekst (Tortora et al. 2007). Lav vannaktivitet hemmer DNA-replikasjon hos *E. coli* (Gabriel & Nakano 2010).

2.3.1.6. Redokspotensial

Redokspotensialet (E_h) påvirker et mediums potensial til å oksideres eller reduseres, noe som avgjør om vekst av aerobe eller anaerobe mikroorganismer kan forekomme. Det påvirkes av fjerning av oksygen eller tilsetning av stoffer med reduserende effekt, slik som hydrogen og sukrose (Adams & Moss 2008).

Molekyler fra redoksreaksjoner forstyrrer elektrontransporten hos bakterier (Bespalov et al. 1996). Under anaerobe forhold vokser *E. coli* godt, og redokspotensialet synker som følge av bakteriell vekst. Nedgang i E_h kan gi forlenget hvilefase og langsommere eller hemmet vekst. Kirakosyan & Trchounian (2007) observerte at tilsetning av kopperioner (Cu^{2+}) til *E. coli* sitt vekstmedium forsinket reduksjonen av redokspotensialet. Kopperioner er oksidanter som i små mengder er viktig for vekst av *E. coli*, mens store mengder kan være skadelig.

Fersk melk inneholder som regel noe O_2 og har et redokspotensial på +0,2 til +0,3 V. Varming vil senke E_h med ca. 0,05 V. Dannelse av melkesyre vil redusere redokspotensialet kraftig, til -0,1 eller -0,2 V, avhengig av hvilke bakterier som er til stede (Walstra et al. 2006).

2.3.1.7. Atmosfære

Aerob respirasjon, det vil si med oksygen, gir et større energiutbytte fra næringsstoffer i forhold til utbyttet ved anaerob respirasjon, altså uten oksygen. Oksygen løses dårlig i vann. Derfor har mange organismer utviklet evnen til å vokse både med og uten oksygen. Dette er fakultativt anaerobe mikroorganismer, som for eksempel *E. coli*. Deres energiutbytte blir mindre når oksygentilgangen synker (Tortora et al. 2007).

Karbondioksid kan påvirke mikrobiell vekst på flere måter. Mikrobiell produksjon eller tilsetning av CO_2 gir anaerobe forhold. pH reduseres fordi CO_2 løses i vann og danner karbonsyre. Karbondioksid kan penetrere plasmamembranen og surgjøre innsiden av cellen. Ved å endre plasmamembranens fysiske egenskaper kan transport av vannløselige næringsstoffer stanse. Enkelte intracellulære enzymer inhiberes, og reaksjon med aminogrupper endrer deres egenskaper og aktivitet. Oksidative Gram-negative bakterier er mest sensitive for CO_2 , mens Gram-positive bakterier, særlig laktobasiller, er mest resistente. Karbondioksid har sterkere inhiberende egenskap ved aerobe forhold enn ved anaerobe. Inhibering av mikroorganismer øker med synkende temperatur, grunnet økt løselighet av CO_2 ved lavere temperaturer (Adams & Moss 2008).

Råmelks oksygeninnhold er ca. 6 mg/kg. Karbondioksidinnholdet i råmelk er ca. 0,2 mmol/l. Melkesyrebakterier vil redusere oksygen og gjøre miljøet mer anaerobt. Innholdet av CO₂ i fermenterte melkeprodukter avhenger av hvilken syrekultur og temperatur som er benyttet. Kulturmilk vil inneholde mer CO₂ enn yoghurt, på grunn av noen av melkesyrebakterienes sitratmetabolisme. Dannelse av CO₂ i yoghurt skyldes *St. thermophilus*' pyruvatmetabolisme (Walstra et al. 2006).

2.4. FERMENTERT MELK

Fermentering er en konserveringsmetode hvor mikroorganismers metabolitter fra karbohydratnedbryting senker pH i produktet (Store norske leksikon u.å.; Walstra et al. 2006). Spesifikke mikroorganismer som tilsettes en råvare for å fermentere den kalles gjerne en syrekultur. Syrekulturen kan bestå av en eller flere arter eller stammer, ofte innen bakteriegruppen kalt melkesyrebakterier. En typisk melkesyrebakterie er Gram-positiv, ikke bevegelig, ikke sporedannende, aerotolerant, syretolerant, katalase negativ og cytokrom negativ. Når bakterien er cytokrom negativ innebærer det at den ikke er i stand til å danne jernholdige porfyringrupper. Melkesyrebakterier har strenge næringskrav, deriblant krav til spesielle aminosyrer og B-vitaminer. Hovedproduktet fra sukkerfermenteringen er melkesyre (Axelsson 2004; Walstra et al. 2006).

Melkesyredannelse har en konserverende effekt på melka og endrer samtidig melkas tekstur og smak. Melkesyrebakterienes fermentering bidrar ofte med mer enn melkesyre, avhengig av bakterietype og deres metabolisme. Diacetyl og acetaldehyd er viktige smaksmetabolitter. Dannelse av CO₂ påvirker tekstur og oppfatning av smak i form av friskhet, mens dannelse av eksopolysakkarider gir en særegen "trådtrekkende" konsistens. Nedbrytning av protein og fett endrer produktets smak og tekstur (Walstra et al. 2006). Melkesyrebakterienes innvirkning på melka og sluttproduktet avhenger av hvilken syrekultur som benyttes.

2.4.1. Kulturmilk

Ifølge Melkevareforskriften (1953) § 4b er kulturmilk "(...) sur helmilk fremstillet ved anvendelse av renkultur av melkesyrebakterier.". I kulturmilk benyttes en mesofil syrekultur av typen DL, som består av *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* og *Leuconostoc (Leuc.) mesenteroides* subsp. *cremoris*. De

to første bakteriene produserer praktisk talt bare melkesyre ved fermentering av laktose, mens de to siste også danner CO₂ og er aromaproduserende, fordi de danner diacetyl fra sitratomsetning. *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* danner mer melkesyre enn hva *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* gjør. *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* er heterofermentativ, som vil si at den i tillegg til melkesyre danner blant annet etanol, CO₂ og acetaldehyd ved laktosenedbrytning (Walstra et al. 2006). Fermenteringen foregår ved ca. 22 °C i ca. 20 timer og avsluttes ved pH <4,6. Denne temperaturen benyttes for å opprettholde kulturen i et stabilt blandingsforhold (Abrahamsen et al. 2003).

2.4.2. Yoghurt

Melkevareforskriften (1953) § 4c omtaler yoghurt som "(...) sur melk fremstillet ved anvendelse av yoghurtkultur, og med minst 2,5 % øket innhold av melketørrstoff." Yoghurtkultur er en termofil syrekultur bestående av *St. thermophilus* og *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Walstra et al. 2006). De to bakteriene lever i en protooperasjon, det vil si at bakteriene kan vokse hver for seg, men de blir gjensidig stimulert av hverandres metabolitter. Begge bakteriene danner melkesyre fra laktose. Noen stammer er også eksopolysakkariddannende. *St. thermophilus* danner CO₂, maursyre, ammoniakk, diacetyl og acetaldehyd. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* danner små peptider og aminosyrer, diacetyl, og yoghurts viktigste aromakomponent acetaldehyd (Walstra et al. 2006; Zourari et al. 1992). Begge bakteriene produserer en betydelig andel acetaldehyd via nedbrytning av den frie aminosyren treonin (Walstra et al. 2006). Inkubasjonstemperatur og -tid ved yoghurtproduksjon er ca. 42-43 °C i ca. 3-6 timer, til pH 4,4 er oppnådd (Abrahamsen et al. 2003).

2.5. BRUK AV UPASTEURISERT MELK

I Norge er det hovedsakelig småskalaprodusenter som selger meieriprodukter basert på upasteurisert melk. Unntakene kan være butikksalg av importerte oster laget av upasteurisert melk. Bruk av upasteurisert melk i et produkt skal merkes skriftlig på emballasjen (Animaliehygieneforskriften 2008).

TINE definerer i praksis småskalaprodusenter som virksomheter som behandler maksimalt 500 000 liter melk per år (TINE 2007). En formell definisjon er ikke fastsatt.

I 2008 hadde Mattilsynet tilsyn hos 157 småskalaprodusenter som foredlet melk (Dahle 2009). I litteratursøk til denne oppgaven har det ikke lyktes å finne en formell oversikt over

hvor stor andel av småskalavirksomhetene som selger produkter basert på upasteurisert melk. Ragnhild Nordbø, kontaktperson i organisasjonen Norsk Gardsost, opplyste ved forespørsel at hun kjenner til få småskalavirksomheter som produserer surmelk av upasteurisert melk, men at det er ganske mange som lager rømme og ferskost av upasteurisert melk med teknologi som likner mesofil syring. Norsk Gardsost har i underkant av 50 medlemmer som i hovedsak produserer ost av upasteurisert melk (Nordbø 2010).

Tradisjonell matproduksjon er en vanlig årsak til at noen ønsker å produsere melkeprodukter av upasteurisert melk (Letnes 2005). Andre årsaker kan være at produsenten ønsker å beholde råmelkas mikroflora (Laupsa-Borge 2006a; Wouters et al. 2002), at teknologien for varmebehandling er for kostbar og krevende i forhold til vedlikehold og dokumentasjon, eller at en av ulike årsaker oppfatter varmebehandling som uheldig (Abrahamsen et al. 2003; Laupsa-Borge 2006a; 2006b). Enkelte av råmelkas "forsvarere" påstår at konsum av råmelk gir bedre helse, at særlig innholdet av vitaminer, mineraler og tilgjengelig kalsium reduseres ved pasteurisering (Enticott 2003; Laupsa-Borge 2006b) og at råmelkas innhold av inhibitorer og melkesyrebakterier hemmer patogene mikroorganismer. Dette er påstander uten vitenskapelig tyngde (Vitenskapskomiteen for mattrygghet 2006). Det naturlige innholdet av inhiberende stoffer i råmelk er tilstede i for lave konsentrasjoner til å drepe patogene mikroorganismer. Råmelkas mikroflora kan bidra til produksjon av spennende produkter hva sensorikk angår, men mikrofloraen er ukontrollert, og en vet aldri hva som befinner seg der.

Også ifølge U.S. Food and Drug Administration (FDA) (FoodQualitynews.com 2010) hevder forkjempere for bruk av upasteurisert melk at råmelk inneholder antimikrobielle stoffer som gjør pasteurisering unødvendig, og at råmelk er mer næringsrik enn pasteurisert melk. FDA slår ned på begge disse påstandene og påpeker at konsum av råmelk har ført til flere hundre sykdomstilfeller i USA i perioden 2001-2002. Det vises blant annet til et sykdomsutbrudd i staten Washington hvor råmelk kontaminert med *E. coli* O157:H7 var årsaken (U.S. Food and Drug Administration 2009a).

Videre konstaterer FDA at råmelk ikke kan drepe skadelige bakterier, at pasteurisering dreper sykdomsframkallende bakterier uten å endre næringsinnholdet i betydelig grad, og at pasteurisering av melk ikke fører til melkeintoleranse eller -allergi (U.S. Food and Drug Administration 2009a; 2009b). Det norske Mattilsynet skriver også at framstilling av produkter fra upasteurisert melk betraktes som risikofylt med tanke på konsumentenes helse

(Statens Næringsmiddeltilsyn 1999; 2000). I en undersøkelse utført for Mattilsynet ble det funnet at 3 av de 293 prøvene av hvit ost, rømme, smør og fløte av upasteurisert melk inneholdt *E. coli* O157:H7. En av fem prøver hadde dårlig mikrobiologisk kvalitet, blant annet grunnet innhold av patogene bakterier (Statens Næringsmiddeltilsyn 1999).

En liten del av den norske storfebesetningen er bærere av EHEC (Statens Næringsmiddeltilsyn 2000). Ifølge Hofshagen et al. (2009) har verotoksindannende *E. coli* O157 ved separate anledninger blitt påvist i storfebesetninger i Norge. På en gård i Møre og Romsdal ble det i 2002 funnet *E. coli* O157 i avføringen fra én tredjedel av dyrebesetningen bestående av storfe, fjørfe og sau (Dyrehelsetilsynet 2002).

Syrnede produkter av upasteurisert melk oppfattes ofte som trygge (Enticott 2003), men ifølge Abrahamsen et al. (2003) kan disse produktene kun betraktes som tryggere enn usyrnede produkter, da syrningen ikke vil være en sikker barriere mot patogene mikroorganismer. Utredningen konkluderes med at det finnes en del teknologier som kan hemme eller drepe mikroorganismer, men ingen av dem kan erstatte pasteuriseringens effekt. Teknologiene vil heller ikke være aktuelle i en småskala melkevirksomhet.

2.6. GJELDENE NORSK LOVGIVNING VED FOREDLING AV MELKEBASERTE PRODUKTER

Melkeforskriften (1995) ble erstattet med nytt hygieneregelverk den 1. mars 2010. I det nye regelverket forutsettes det at hver bransje i næringsmiddelindustrien utvikler egne bransjestandarder, noe det fremdeles arbeides med i meierisektoren. Mye av det som sto i Melkeforskriften er også med i det nye regelverket, men enkelte punkter er endret. Med det nye regelverket følger kravet om innføring av HACCP i meierivirksomhetene. En viktig forskrift er Animaliehygieneforskriften (2008).

Animaliehygieneforskriften (2008) § 21 omtaler krav til varmebehandling av råmelk slik:

”All melk og fløte som omsettes til konsum, skal være varmebehandlet. Som unntak fra dette kravet, kan det fra gård eller seter omsettes rå melk og rå fløte direkte til forbruker for bruk i egen husholdning. Dette unntaket gjelder bare dersom omsetningen skjer tilfeldig og ikke har preg av butikksalg.”

Melkeforskriften §20 inneholdt det samme, i tillegg til avslutningen ”(...) Melk til fremstilling av melkebaserte produkter skal være varmebehandlet med mindre andre tiltak sikrer at produktet er helsemessig trygt.”.

I Animaliehygieneforskriftens (2008) avsnitt IX, kapittel II, del II, punkt 1 gis det ytterligere uttrykk om at det åpnes for bruk av upasteurisert melk til produksjon av melkeprodukter med formuleringen ”Dersom rå melk, råmelk, melkeprodukter eller råmelkbaserte produkter varmebehandles, (...)”. Det skal tas hensyn til HACCP-prinsippene i forordning 852/2004 artikkel 5 og myndighetenes krav i forordning 854/2004 dersom næringsmiddelsetakets driftsansvarlige vurderer om råmelk skal varmebehandles.

Ifølge Melkeforskriften (1995) Vedlegg I skal rå kumelk beregnet til framstilling av ikke varmebehandlede melkebaserte produkter inneholde under eller lik 100 000 kimtall/ml ved 30 °C. På dette punktet kan den gjeldende forskriften, Animaliehygieneforskriften (2008), oppfattes som forvirrende: Ved to punkter blir det oppgitt to ulike grenseverdier og det er vanskelig å se hva forskjellen på verdienes bruksområde. Avsnitt IX lyder slik:

”Kapittel I: Rå melk og råmelk – primærproduksjon

III. Kriterier for rå melk og råmelk

3. a) Driftsansvarlige for næringsmiddelsetak skal innføre framgangsmåter for å sikre at rå melk oppfyller følgende kriterier:

For rå kumelk: Kimtall ved 30 °C (per ml) ≤ 100 000 (...).

Kapittel II: Krav som gjelder melkeprodukter og råmelkbaserte produkter

III. Kriterier for rå kumelk

1. Driftsansvarlige for næringsmiddelsetak som framstiller melkeprodukter skal innføre framgangsmåter for å sikre, umiddelbart før varmebehandlingen og dersom tidsrommet angitt i framgangsmåtene som bygger på HACCP-prinsippene er overskredet,

a) at rå kumelk som brukes til å tilberede melkeprodukter, har et kimtall ved 30 °C på under 300 000 per ml, og

b) at behandlet kumelk som brukes til å tilberede melkeprodukter, har et kimtall ved 30 °C på under 100 000 per ml.”

3. MATERIALER OG METODER

I dette arbeidet ble de kombinerte effektene av pH, temperatur og tid på vekst og overlevelse av en ikke-toksindannende (apatogen) *E. coli* O157:H7 stamme NCTC 1200 (*National Collection of Type Cultures, Collindale, London, England*) inokulert i upasteurisert og pasteurisert melk undersøkt. Melka (*Båsfjøset og Løsdriftsfjøset, UMB, Ås, Norge*) ble fermentert ved separat bruk av to syrekulturer – en DL-kultur og en yoghurtkultur (*henholdsvis Flora Danica og YF-L702, Chr. Hansen, Danmark*).

Tabell 3.1. Forkortelser som blir benyttet i dette kapitlet.

Forkortelse	Betydning
SMAC	Sorbitol MacConkey agar
M17	M17-agar
PCA	Plate Count Agar
VRBA	Violet Red Bile Agar
Rå	Råmelk
Past.	Pasteurisert melk (63 °C i 30 min.)
DL	DL-kultur
Y	Yoghurtkultur
MSB	Melkesyrebakterier
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
Totaltall	Totalt antall mesofile aerobe bakterier

I tillegg til at *E. coli* O157:H7 er en aktuell patogen bakterie, ble den valgt som indikatorbakterie i denne oppgaven av praktiske årsaker. Ved bruk av tradisjonelle mikrobiologiske metoder kan bakterien defineres blant andre koliforme bakterier, fordi den teoretisk sett kan identifiseres med SMAC. En apatogen stamme var tilgjengelig, noe som gjorde forsøket tryggere å utføre. Det ville heller ikke vært mulig å benytte en patogen stamme, da det kreves en Klasse 1 patogen lab for slikt arbeid, og en slik lab finnes ikke ved UMB. Det var interessant å studere hvordan isolering av bakterien fra næringsmidler arter seg, blant annet om SMAC er tilstrekkelig spesifikk og om bakterien lar seg isolere fra uforynnet næringsmiddel.

Beslutningen om å benytte to syrekulturer ble gjort for å studere eventuelle forskjeller på *E. coli* O157:H7 sin respons på ulike varianter av syrekultur, inkubasjonstemperatur, syrningstid og syrningshastighet.

Pasteurisert melk ble benyttet som ”kontroller” og ble brukt for å kunne sammenlikne ”produkter” av upasteurisert melk med ”produkter” av pasteurisert melk.

Pasteuriseringstemperatur og -tid ble satt til 63 °C i 30 minutter med bakgrunn i vanlig praksis hos småskalavirksomheter hvor pasteurisering foretas.

Tidspunkt for prøveuttak i løpet av inkubering og lagring ble valgt av praktiske årsaker i forhold til arbeidskapasitet, samt med tanke på forventet syrningsforløp.

3.1. BRUK AV AGAR

For å finne totaltall bakterier i råmelka ble det benyttet overflatespredning på PCA (*Plate Count Agar, MERCK, Darmstadt, Tyskland*) med inkubering ved 30 °C i 3 døgn.

Koliforme bakterier i råmelka ble kvantifisert ved innstøpning m/agarlokk med VRBA (*Violet Red Bile Lactose Agar, OXOID, Basingstoke, Hampshire, England*) med inkubering ved 37 °C i 24 timer.

E. coli O157 framtrådte som blanke kolonier etter overflatespredning på SMAC (*Sorbitol MacConkey, OXOID*) og inkubering ved 37 °C i 24 timer. Ifølge produktdatabladet for SMAC (OXOID CM0813) kan stammer av *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. og *Klebsiella* spp. vokse på SMAC, men koloniene vil ha et annet utseende enn *E. coli* O157:H7. For nærmere omtale av SMAC, se avsnitt 2.2.3.3.

Petriskåler med M17 (*M 17 broth + 14 g/l Agar-Agar, MERCK*) ble inkubert i 48 timer ved 30 °C for vekst av DL-kultur og ved 42 °C for yoghurtkultur. I tillegg til streptokokker, laktokokker og laktobasiller, kan blant annet *Staph. aureus*, *E. coli* og *Enterococcus faecalis* vokse på M17, jfr. produktdatabladet (MERCK 115029).

3.2. FORFORSØK

Før utføringen av hovedforsøket kunne begynne, måtte bakteriekulturenes vekst og overlevelse kartlegges. Enkelte resultater fra forforsøkene vil bli presentert nedenfor for å gi en god bakgrunn for hovedforsøkets gang.

3.2.1. Bakterienes vekst på SMAC og M17

3.2.1.1. *E. coli* O157:H7

For å sikre best mulig avlesning etter inkubering, måtte *E. coli*-koloniens utseende/tellbarhet på SMAC ved bruk av innstøpningsmetoden og overflatespredningsmetoden undersøkes. Overflatespredning resulterte i best tellbarhet og ble derfor benyttet videre.

Renheten av *E. coli*-kulturen ble kontrollert. En *E. coli*-koloni fra en petriskål ble Gram-farget og mikroskopert. Deretter ble kolonier fra samme skål inokulert i Enterotube (*BD BBL Enterotube II Prepared multimedial tube 211832, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA*), som ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

E. coli-kulturen ble strøket ut på M17 ved bruk av podenål og inkubert ved 30 og 42 °C i 48 timer. Hensikten var å unngå forveksling av *E. coli*-kolonier med melkesyrebakteriekolonier ved vekst på M17 i hovedforsøket. Dette kunne oppnås ved å studere hvordan en koloni av *E. coli*-kulturen artet seg på denne agaren.

3.2.1.2. Melkesyrebakterier

DL-kultur og yoghurtkultur ble strøket ut med podeøse på M17, for å sammenlikne disse koloniene med kolonier av *E. coli* på M17.

Ved bruk av podeøse ble DL-kultur og yoghurtkultur strøket ut på SMAC og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Dette ble gjort for å sjekke om melkesyrebakteriene i disse kulturene kunne vokse på SMAC.

3.2.2. Vekst av *E. coli* O157:H7 ved pH 7 til 3 og i melk ved 22 °C og 42 °C

De to følgende forsøkene ble utført med den hensikt å studere hvordan *E. coli*-kulturen ville oppføre seg under fermentering i hovedforsøket.

3.2.2.1. Vekst av *E. coli* O157:H7 ved pH 7 til 3

BHI-buljong (*Brain Heart Infusion broth, OXOID*) ble tilsatt 2 M og 1 M HCl (*Saltsyre 37 %, MERCK*) slik at pH gradvis ble redusert fra 7 til 6, 5, 4 og 3. For hver pH-enhet ble 10 ml surgjort BHI-buljong overført til 2 reagensrør. Etter autoklaving ble pH målt i den ene rørserien, for å registrere hvilken pH buljongen hadde etter autoklaving. Den andre rørserien ble podet med 0,1 ml *E. coli*. De podede rørene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Vekst ble registrert som grad av opak (blakket) buljong og mengde bunnfall.

3.2.2.2. Vekst av *E. coli* O157:H7 i melk ved 22 °C og 42 °C

2 sterile reagensrør ble tilsatt 10 ml UHT-melk (*TineMelk Hel Langtidsholdbar, TINE Meierier, Norge*), og ble podet med 0,1 ml av *E. coli*-kulturen. Det ene røret ble inkubert ved

22 °C i 24 timer, det andre ved 42 °C i 5 timer. Deretter ble prøve fra hvert rør desimalfortynnet i Ringers løsning (*Ringer's Tablets, MERCK*), og petriskåler med SMAC ble inokulert og inkubert.

3.2.3. Podemengde ved fermenteringsstart

3.2.3.1. *E. coli* O157:H7

Mens forforsøkene pågikk, ble bakteriekulturen med *E. coli* oppbevart i BHI-buljong. Før hovedforsøket startet, ble 3 ml av *E. coli*-kulturen inokulert i 27 ml UHT-melk og overført til cryorør for batchvis nedfrysing ved ca. ± 20 °C, da fryser med lavere temperatur ikke var tilgjengelig for dette forsøket.

Bakteriekulturen ble desimalfortynnet i Ringers løsning og fortynningene 10^{-6} - 10^{-8} ble podet ved overflatespredning på SMAC før nedfrysing og etter tining. Dette ble gjort for å studere *E. coli*-kulturens reaksjon på fryse- og tinebehandling, samt fastslå omtrentlig bakterieinnhold i tint kultur, og dermed beregne podeprosent ved fermenteringsstart i de forskjellige fermenteringsforsøkene i hovedforsøket.

Den tinte bakteriekulturen viste seg å inneholde log 7,66 kde/ml. Ønsket podemengde av *E. coli* var ca. log 4 kde/ml, da dette ble vurdert som en realistisk kontaminasjonsmengde ved småskala produksjon av melkebaserte produkter fra upasteurisert melk. Ved beregninger ble det funnet at ved å inokulere 0,150 ml *E. coli*-kultur i 150 ml melk ville ca. log 7,66 kde/ml bli fortynnet til omtrent log 4 kde/ml.

3.2.3.2. Melkesyrebakterier

Av samme årsak som for *E. coli*, var det nødvendig å fastsette bakteriemengde i syrekulturene før fermenteringsstart. Dette ble gjort ved å inokulere melk slik det var planlagt for hovedforsøket, for å ha podemengde lik omtrent log 6 kde/ml: 1 ml nytint syrekultur i 9 ml UHT-melk, hvorfra 0,15 ml og 0,30 ml av henholdsvis DL-kultur og yoghurtkultur ble inokulert i 150 ml UHT-melk. Herfra ble det laget fortynningsrekker, og skåler med M17 ble inokulert med fortynningene 10^{-6} - 10^{-8} og inkubert.

Det viste seg at prøvene fra begge de fortynnede syrekulturene inneholdt omtrent log 6 kde/ml. Dermed ble denne fortynningsgraden benyttet ved hovedforsøket. Ønsket

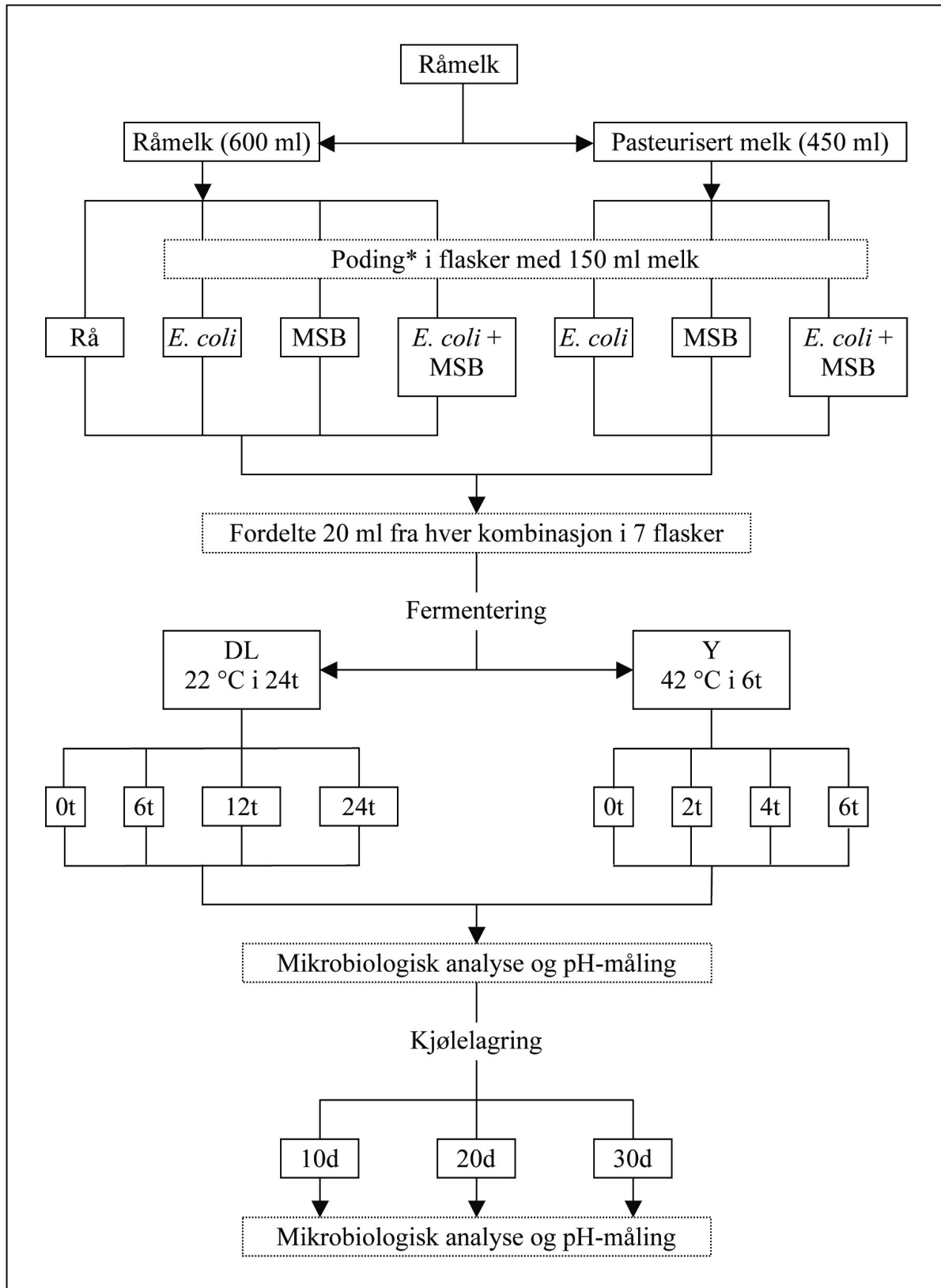
podemengde var log 7 kde/ml fordi dette vil tilsvare omtrent en vanlig podemengde av en syrekultur i melk til framstilling av et surmelksprodukt.

Syrekulturene DL-kultur og yoghurtkultur, som, i henhold til de respektive produktdatabladene, ble oppbevart ved ca. ± 40 °C, ble fordelt i sterile plastrør (*Cellstar PP-TestTubes 15 ml*) for enkelt å kunne ta opp nødvendig mengde fra fryseren før hver forsøksrunde i hovedforsøket.

3.3. HOVEDFORSØKET

3.3.1. Forsøksdesignet

Hovedforsøket med DL-kultur ble gjennomført fire ganger på grunn av for lav podemengde av syrekultur som ble oppdaget etter den første forsøksrunden, etterfulgt av tre forsøksrunder med yoghurtkultur. Hver forsøksrunde strekte seg over totalt 30 døgn, med fire prøveuttak i løpet av fermentering/inkubering og tre prøveuttak under kjølelagring. Figur 3.1. viser flytskjema over hovedforsøket.



Figur 3.1. Flytskjema over hovedforsøket.

*Podemengder ved fermenteringsstart: *E. coli* 0,1 % (ca. log 4 kde/ml), DL 0,1 % (ca. log 7 kde/ml), Y 0,2 % (ca. log 7 kde/ml).

Før hvert hovedforsøk ble omtrent 3 liter råmelk hentet ca. kl. 08:15 fra Løsdriftsfjøset ved UMB. Unntaket var ved første forsøksrunde med DL-kultur, da råmelk ble hentet fra Båsfjøset. Råmelka var fra morgenens og foregående kvelds melking, med unntak ved forsøksrunde 2 med DL-kultur, da det ble tappet fra melketank med kun morgenmelk. Med noe varierende teknikk ble råmelka overført fra melketank til et sterilt melkespann. Teknikken varierte delvis på grunn av tilfeldigheter, men også fordi det i løpet av hovedforsøket ble observert forskjeller i råmelkas mikroflora. Fra og med råmelkshenting til yoghurtforsøkene ble det iverksatt tiltak for å hindre kontaminering ved overføring fra melketank til melkespann. Overføringsteknikkene vises i tabell 3.2.

Tabell 3.2. Oversikt over hvordan råmelka ble overført fra melketank til melkespann ved henting av råmelk til hovedforsøkets forsøksrunder.

Forsøksrunde	Overføringsteknikk fra melketank til melkespann
DL 1	Overført via et litermål. Hentet på Båsfjøset.
DL 2	Tappet direkte fra melketank til melkespann. Kun morgenmelk.
DL 3	Via en skylt bøtte.
DL 4	Via et vasket litermål.
Y 1	Tappet direkte fra melketanken til melkespannet.
Y 2	Direkte fra melketanken etter å ha tappet ut litt først.
Y 3	Direkte fra melketanken etter å ha tappet ut litt først.

På patogenlaboratoriet ble åtte sterile 200 ml pyrexflasker fylt med 150 ml råmelk. Fire av disse melkeflaskene ble plassert i vannbad som holdt 63 °C, og den ene melkeflasken ble benyttet for temperaturkontroll. Melkeflaskene ble holdt i vannbadet i 30 minutter etter at temperaturen hadde nådd 63 °C. Etter denne pasteuriseringen ble melkeflaskene overført til en isoporboks med is for nedkjøling.

Ved starten av hver forsøksrunde ble et rør *E. coli*-kultur og et rør av den aktuelle syrekulturen tint. *E. coli*-kulturen var fortynt i UHT-melk og nedfrost ved ca. $\div 20$ °C. Syrekulturene var fordelt i sterile plastrør og ble oppbevart ved ca. $\div 40$ °C.

Til både råmelk og pasteurisert melk ble én melkeflaske podet med *E. coli*-kultur, én med syrekultur og én med både *E. coli*-kultur og syrekultur. Flaskene ble vendt rolig i noen minutter for å blande melk og bakterier. Den fjerde flasken med råmelk ble ikke podet, og denne ble benyttet for kontroll av råmelkas mikroflora. Dette ga til sammen sju ulike prøvekombinasjoner.

Podemengde *E. coli*-kultur var 0,15 ml i 150 ml melk (0,1 %). Etter første forsøksrunde med DL-kultur ble syrekulturens podemengde økt, da det viste seg at pH sank for sakte. Fortynningen av 1 ml syrekultur i 9 ml melk ble utelatt, slik at 0,15 ml (0,1 %) og 0,30 ml (0,2 %) av henholdsvis DL-kultur og yoghurtkultur ble inokulert ufortynnet i 150 ml melk. Podemengden økte dermed fra ca. log 6 til ca. log 7 kde/ml, noe som fungerte som ønsket ved de tre neste forsøksrundene med DL-kultur.

Før forsøksrundene med yoghurtkultur begynte, ble syrningshastigheten med den nye podemengden undersøkt. To sterile flakser med 150 ml UHT-melk ble inokulert med den gamle og den nye podemengden. Prøvene ble inkubert ved 42 °C i 6 timer. Det ble foretatt pH-målinger ved start og videre hver time, hvor målingene viste at syrningen startet tidligere og endte ved lavere pH etter 6 timer ved bruk av den nye podemengden.

Da én melkeflaske var blitt inokulert, ble prøven fordelt på seks sterile 50 ml pyrexflasker, ca. 20 ml prøve i hver flaske. Disse flaskene ble satt til inkubering i plastbaljer med vann plassert i et inkubasjonsskap. Ved forsøk med DL-kultur var det 22 °C i inkubasjonsskapet, og prøvene ble inkubert i opp til 24 timer. Da yoghurtkultur ble benyttet, var temperaturen 42 °C, og inkubasjonstiden var maks 6 timer. Umiddelbart etter inkubasjonsstart ble det utført mikrobiologisk analyse av prøven, og pH ble målt. Deretter ble neste prøvekombinasjon inokulert, fordelt og satt til inkubering, og prosessen ble gjentatt inntil alle de sju kombinasjonene sto i inkubasjonsskapet.

I løpet av inkuberingen ble det i intervaller tatt ut én flaske av hver prøvekombinasjon for å gjøre mikrobiologisk analyse og pH-måling. Når DL-kultur ble benyttet, ble flaskene tatt ut nøyaktig 6, 12 og 24 timer etter hver prøvekombinasjons inkubasjonsstart. Ved bruk av yoghurtkultur ble prøveuttakene foretatt etter nøyaktig 2, 4 og 6 timer. Etter 24 timer for DL-kultur og 6 timer for yoghurtkultur ble de tre siste flaskene av hver av de sju kombinasjonene flyttet til et kjøleskap for kjølelagring ved ca. 4 °C. Alle kombinasjonene, uavhengig av syrekultur, hadde lagringsuttak 10, 20 og 30 døgn ± 1 døgn etter inkubasjonsstart. Ved disse prøveuttakene ble det ikke tatt hensyn til kombinasjonenes inokuleringsrekkefølge.

Ved forsøksrundene med yoghurtkultur var det ikke praktisk mulig å fullføre de mikrobiologiske analysene for hvert intervalls prøveuttak på to timer dersom alle sju kombinasjoner skulle bli gjennomført samtidig. Dermed ble prøvene med råmelk inkubert

samme dag som melka ble hentet, mens 450 ml melk ble pasteurisert og satt i kjøleskap for å podes og inkuberes neste dag. Av praktiske årsaker ble lagringsuttakene for prøver med pasteurisert melk foretatt samme dag som for prøvene med råmelk.

3.3.2. Mikrobiologisk analyse

Råmelka ble analysert for totaltall bakterier ved bruk av PCA, og for koliforme bakterier ved bruk av VRBA. Ved første forsøksrunde med DL-kultur ble i tillegg prøvekombinasjonen med råmelk og DL-kultur analysert for koliforme bakterier. Dette ble ikke gjentatt ved de andre forsøksrundene, da bakgrunnsflora i råmelk var viktigst og vekst/utvikling av *E. coli* var hovedfokuset.

Kvantifisering av *E. coli* ved bruk av SMAC ble gjort i prøver med råmelk og alle kombinasjoner tilsatt *E. coli*. Vekst av lilla/rosa kolonier ble tatt med i beregningene av log-verdier for petriskålene med råmelk alene, mens kun blanke kolonier ligger til grunn for log-verdiene i de resterende prøvekombinasjonene.

Ved bruk av M17 ble syrekulturens vekstforløp fulgt i alle prøvekombinasjoner tilsatt DL-kultur eller yoghurtkultur. Prøvene med kun råmelk ble også podet på M17.

3.3.3. pH-måling

Etter uttak til mikrobiologisk analyse ble pH i hver prøvekombinasjon målt. pH-målingene ble utført ved bruk av et pH-meter (*PHM210 Standard pH Meter, MeterLab, Radiometer analytical AS, København, Danmark*) med en kombinert pH-elektrode (*pHC2001-8 Red Rod Combined pH Electrode, Radiometer analytical SA, Villeurbanne Cedex, Frankrike*), som ble kalibrert med standard buffer med pH 4 og 7 (MERCK) hver morgen før analyser.

3.4. DATABEHANDLING

De grafiske framstillingene ble laget ved bruk av Microsoft[®] Excel 2008 for Mac (*Microsoft Corporation, USA*) og Adobe[®] Photoshop[®] CS versjon 8 (*Adobe Systems Incorporated, USA*).

4. RESULTATER

4.1. ORGANISERINGEN AV PRESENTASJONEN AV RESULTATENE

Resultater fra forforsøk presenteres i avsnitt 4.2. og resultatene fra hovedforsøket presenteres i avsnitt 4.3. og 4.4. En synliggjøring av effekt av pH på antall *E. coli* vises i avsnitt 4.5.

Figurene er basert på rådata som er tilgjengelig i vedlegget.

Ved presentasjon av hovedforsøket starter framleggingen med mikrobiologisk analyse, i rekkefølgen totaltall bakterier, koliforme bakterier, *E. coli* O157:H7 og melkesyrebakterier. Bakterieinnholdet oppgis i log kde/ml. Deretter følger resultatene fra pH-måling.

Resultatene fra forsøksrunde 1 med DL-kultur vises i separate figurer, med analyser av råmelk i samme figur som tilhørende analyser av inokulert melk.

Ved presentering av totaltall bakterier, koliforme bakterier og melkesyrebakterier i råmelk fra hovedforsøk med DL-kultur og fra hovedforsøk med yoghurtkultur blir alle forsøksrundene fra sine respektive forsøk og analyser vist i samme figur. Det ble valgt å vise alle forsøksrundene framfor å bruke figurer med gjennomsnittlig verdi, siden det enkelte steder var betydelig variasjon mellom forsøksrundene.

Av samme årsak vises også *E. coli* O157:H7-resultatene fra alle forsøksrundene i samme figur. Råmelksverdiene ved SMAC-analyser er basert på kimtall inkludert lilla kolonier, mens det for prøver tilsatt *E. coli* O157:H7 kun ligger kimtall for fargeløse kolonier til grunn.

Figurene for melkesyrebakterier i inokulerte prøver er basert på gjennomsnittlig kimtall for alle forsøksrundene fra tilhørende hovedforsøk. Standardavvik oppgis.

Prøvekombinasjonenes pH-verdi vises som gjennomsnittlig pH-verdi av målinger fra de tre forsøksrundene i DL-forsøkene og i yoghurtforsøkene. Standardavvik oppgis.

Tabell 4.1. Forkortelser som blir benyttet i dette kapitlet.

Forkortelse	Betydning
SMAC	Sorbitol MacConckey agar
M17	M17-agar
PCA	Plate Count Agar
VRBA	Violet Red Bile Agar
Rå	Råmelk
Past.	Pasteurisert melk (63 °C i 30 min.)
DL	DL-kultur
Y	Yoghurtkultur
MSB	Melkesyrebakterier
<i>E. coli</i> , EC	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
Totaltall	Totalt antall mesofile aerobe bakterier

4.2. FORFORSØK

4.2.1. Bakterienes vekst på SMAC-agar og M17-agar

4.2.1.1. *E. coli* O157:H7

Overflatespredning og innstøpning ble sammenliknet med hensyn til *E. coli*-kolonienes utseende etter inkubering. Overflatespredning ga større kolonier enn innstøpning. Dermed ble overflatespredning anvendt. Gram-farging og mikroskopering viste Gram-negative staver. Enterotube viste at *E. coli*-kulturen ikke var sorbitolfermenterende. *E. coli* ga fargeløse runde kolonier på både SMAC og M17 etter inkubering. Ut ifra dette kunne det bekreftes at bakteriekulturen inneholdt *E. coli* O157:H7 og kulturen kunne benyttes i forsøkene. Petriskåler med M17 inokulert med prøve inneholdende *E. coli*-kultur måtte studeres nøye ved avlesing for å unngå telling av feil kolonitype.

4.2.1.2. Melkesyrebakterier

DL-kulturens og yoghurtkulturens vekst på SMAC og M17 ble undersøkt ved poding. Verken DL-kulturen eller yoghurtkulturen vokste på SMAC. Veksten av melkesyrebakteriene var god på M17. Blant de tilsatte bakteriekulturene ved hovedforsøket ville dermed kun *E. coli*-kulturen gi vekst på SMAC, og melkesyrebakteriene kunne kvantifiseres ved bruk av M17.

4.2.2. Vekst av *E. coli* O157:H7 ved pH 7 til 3 og i melk ved 22 °C og 42 °C

4.2.2.1. Vekst av *E. coli* O157:H7 ved pH 7 til 3

Ved å surgjøre BHI-buljong med HCl fra pH 7 til 3, inkludert pH 6, 5 og 4, og inkubering ved 37 °C i 24 timer ble vekst av *E. coli* ved ulike pH observert. Samtidig ble BHI-buljongens pH-endring etter autoklivering undersøkt. Tabell 4.2. viser at pH i BHI-buljong generelt økte i svært liten grad under autoklivering. Basert på visuell vurdering, vokste *E. coli* dårligere etter hvert som pH ble redusert fra 7 til 3. Veksten var åpenbart påvirket av pH. Dette tydet likevel på at *E. coli*-kulturen kunne vokse i et surt miljø, og det kunne forventes å detektere bakterien i syrnet melk under hovedforsøket.

Tabell 4.2. pH-endringer i BHI-buljong etter autoklivering, og visuell vurdering av vekstgrad av *E. coli* O157:H7 i BHI-buljong med pH 7 til 3. Grad av vekst er oppgitt som 3-1, hvor 3 = mye vekst og 1 = noe vekst.

pH i BHI før autoklivering	7,00	6,00	5,00	4,00	3,00
pH i BHI etter autoklivering	7,00	6,06	5,13	4,06	3,06
Grad av vekst av <i>E. coli</i> O157:H7	3	3	2	1	1

4.2.2.2. Vekst av *E. coli* O157:H7 i melk ved 22 °C og 42 °C

Det ble undersøkt hvor godt *E. coli* vokste i UHT-melk under de to fermenteringsbetingelsene 22 °C i 24 timer og 42 °C i 5 timer. Etter inkubering ved 22 °C i 24 timer inneholdt melka log 8,58 kde/ml *E. coli*, mens innholdet var log 8,30 kde/ml etter 5 timer ved 42 °C. *E. coli*-kulturen ville altså overleve og trolig vokse ved disse forholdene.

4.2.3. Podemengde ved fermenteringsstart

4.2.3.1. *E. coli* O157:H7

E. coli-kulturen ble podet i UHT-melk og fryst. Ved å undersøke bakteriemengde før og etter frysing ble det funnet at antall *E. coli* ble redusert med litt over 1 log-enhet. Innholdet var log 8,97 kde/ml før frysing (fortynning 10^{-7}) og log 7,66 kde/ml etter frysing (fortynning 10^{-6}). Dermed var omtrentlig bakterieinnhold i kulturen kjent, og fortynningsgrad kunne beregnes. Se avsnitt 3.2.3.1.

4.2.3.2. Melkesyrebakterier

Det ble undersøkt om fortynning av syrekulturene resulterte i ønsket podemengde, som var ca. log 7 kde/ml. Bakteriemengden i syrekulturene etter fortynning var omtrent som ønsket, henholdsvis log 6,40 og 6,54 kde/ml (fortynning 10^{-6}). Men koloniene var litt små. Det ble besluttet å fortynne melkesyrekulturene som planlagt under hovedforsøkene. Etter første forsøksrunde med DL-kultur ble podemengden økt fra ca. log 6 til ca. log 7 kde/ml.

4.3. HOVEDFORSØK MED DL-KULTUR

I løpet av forsøksrundene forekom diverse problemer ved kolonitelling. I figurene indikerer diverse symboler flere av disse problemene. Tabell 4.3. gir en oversikt over symbolenes betydning.

Tabell 4.3. Symboler i figurene fra hovedforsøk med DL-kultur, og betydningen av disse.

Symbol	Betydning
#	log-verdien er blant annet basert på skåler inneholdende spredere
*	Overgrodd – ikke mulig å telle antall kolonier
>	log-verdien er blant annet basert på skåler med over 300 kolonier
<	log-verdien er blant annet basert på skåler med under 20 kolonier
0	Ingen kolonier på skålene
/	Ikke analysert
x	Prøven ble tatt ut av datasettet pga svært dårlige paralleller
!	Obs: Endring i temperatur og tidsintervall

4.3.1. Mikrobiologisk analyse

Ved inkubasjonsstart, etter 6, 12 og 24 timer (t) ved 22 °C og etter 10, 20 og 30 døgn ved 4 °C ble det foretatt mikrobiologisk analyse av hver av de sju prøvekombinasjonene.

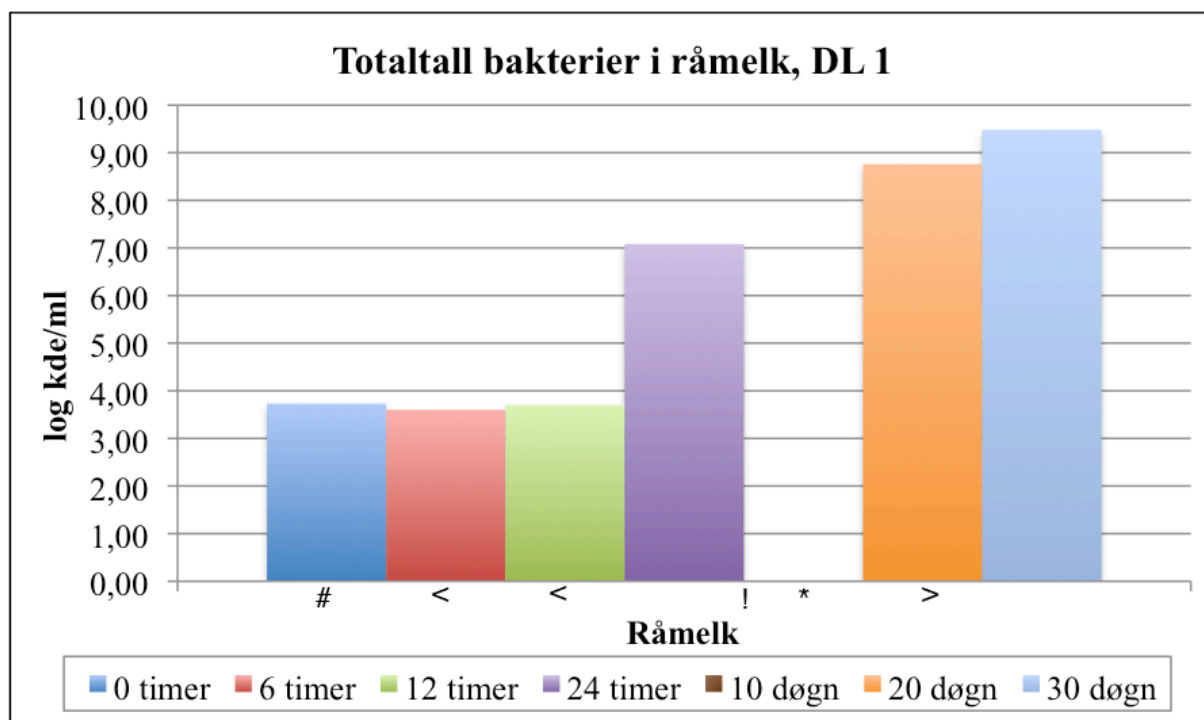
4.3.1.1. Totaltall bakterier

Totaltall bakterier i råmelk ble kvantifisert ved bruk av overflatespredning PCA inkubert ved 30 °C i ca. 3 døgn.

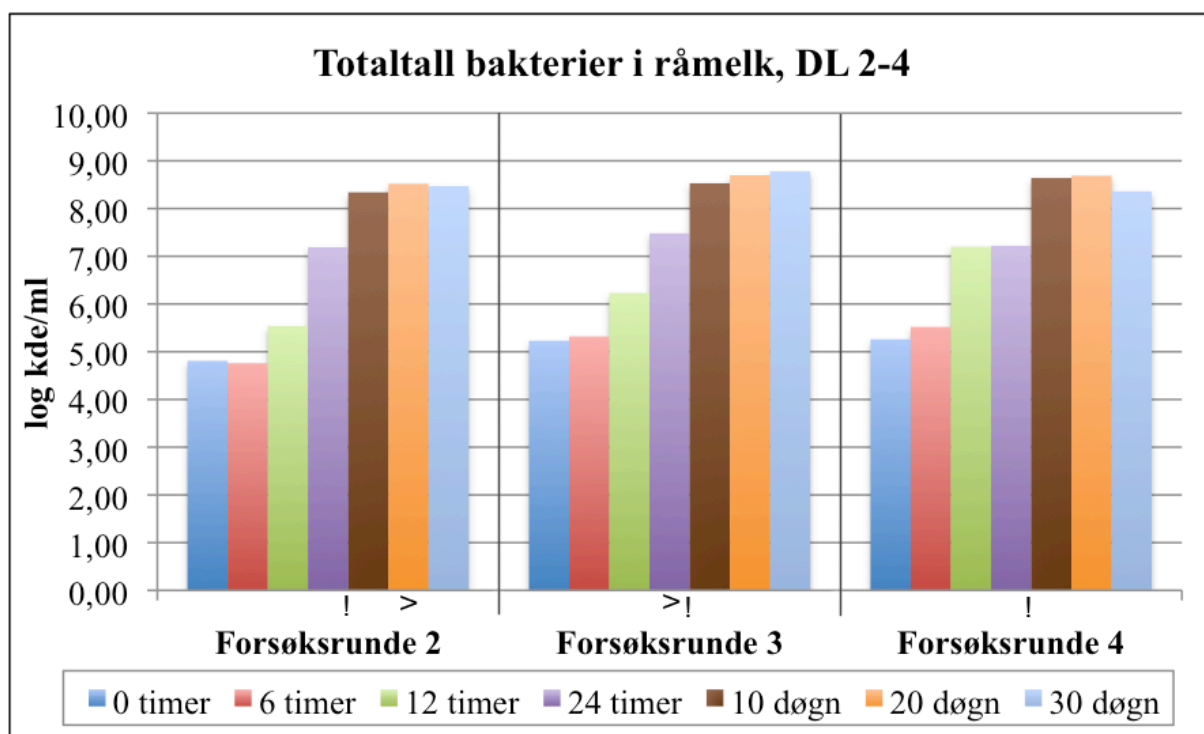
Totaltall bakterier (log kde/ml) i råmelk til forsøksrunde 1 vises i figur 4.1. Under inkuberingen holdt antallet seg jevnt, noe under log 4 kde/ml, fram til uttaket ved 12 t. Uttaket ved 24 t viste en kraftig økning til log 7 kde/ml. Totaltallet økte også i løpet av kjølelagringen: til ca. log 9,5 kde/ml ved 30 døgn.

Resultatene for DL-forsøk 2, 3 og 4 vises i figur 4.2. Totaltallet i råmelk var nokså stabilt rundt log 5 kde/ml ved 0 og 6 t ved alle forsøksrundene. Ved 24 t var totaltallet ca. log 7 kde/ml. Etter 10 døgn ved kjølelagring hadde totaltallet økt til rundt log 8,5 kde/ml, og antallet holdt seg nokså stabilt under videre lagring.

I forhold til DL-forsøk 1 ble totaltallet i DL-forsøk 2, 3 og 4 høyere i løpet av inkuberingen.



Figur 4.1. Antall mesofile aerobe bakterier (log kde/ml) i råmelk ved forsøksrunde 1 med DL-kultur.



Figur 4.2. Antall mesofile aerobe bakterier (log kde/ml) i råmelk ved forsøksrunde 2, 3 og 4 med DL-kultur.

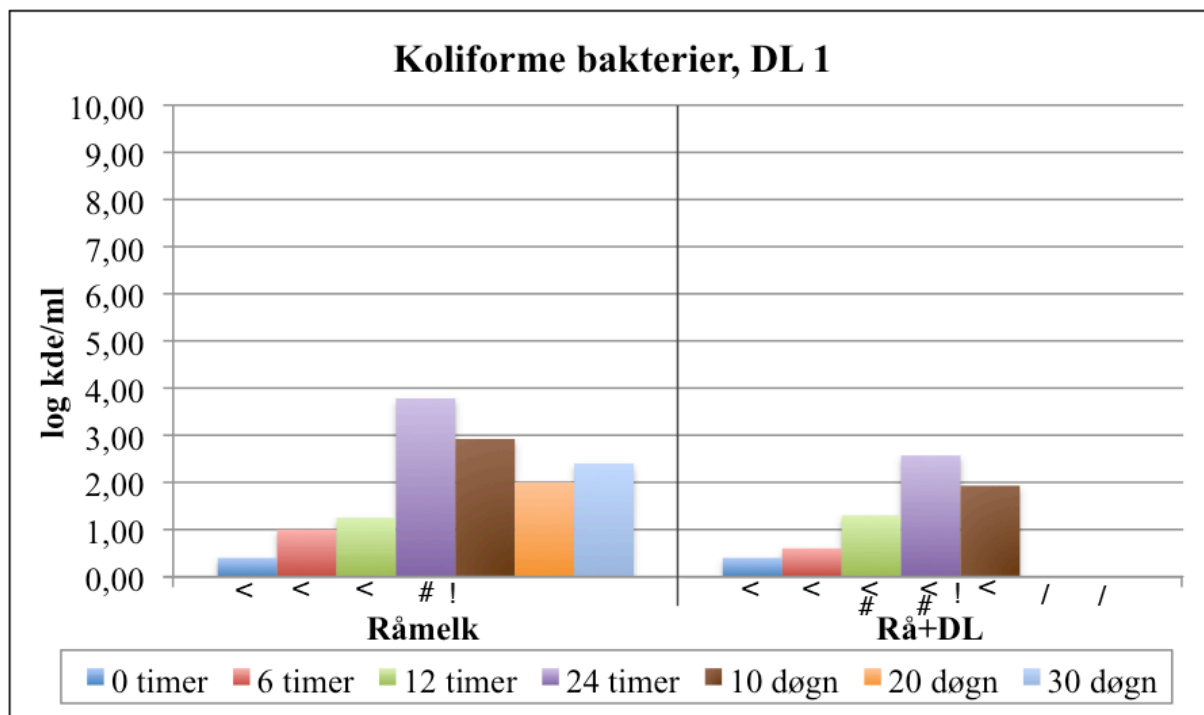
4.3.1.2. Koliforme bakterier

Antall koliforme bakterier i råmelk ble analysert ved bruk av innstøpning i VRBA med agarlokk inkubert ved 37 °C i maks 24 timer. Ved første forsøksrunde ble også prøvekombinasjonen med DL-kultur i råmelk analysert for koliforme bakterier.

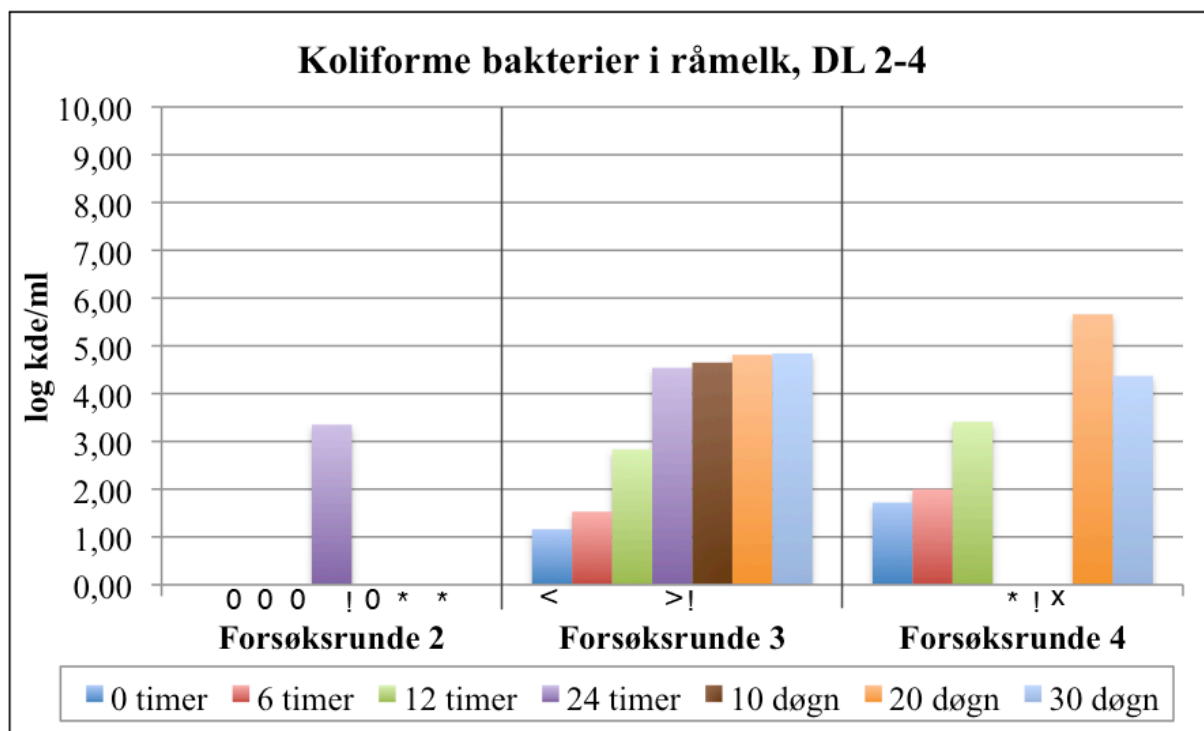
Resultatene fra DL-forsøk 1 vises i figur 4.3. De benyttede fortynningene var 10^0 - 10^{-2} . Startmengden i råmelk var svært lav og hadde kun en svak økning i løpet av inkuberingens første 12 timer. Ved 24 t hadde antall koliforme bakterier økt med ca. log 2,5 kde/ml. Ved kjølelagring ble antall koliforme bakterier omtrent halvert. De samme trendene ble observert i råmelk inokulert med DL-kultur, riktignok med noe lavere log-verdier for koliforme bakterier ved 24 t.

Figur 4.4. viser antall koliforme bakterier (log kde/ml) i råmelk brukt ved forsøksrunde 2, 3 og 4. Innholdet av koliforme bakterier i råmelka varierte ved forsøksrundene. Ved DL-forsøk 2 ble det ikke detektert koliforme bakterier i ufortynnede råmelksprøver ved 0, 6 og 12 t, mens det ved 24 t ble funnet i overkant av log 3 kde/ml. Ufortynnet prøve fra 10 døgn ved kjølelagring inneholdt ingen observerbare koliforme bakterier. Skålene fra 20 og 30 døgn kjølelagring var imidlertid overgrodd av kolonier, henholdsvis ved fortynningene 10^0 - 10^{-1} og 10^{-1} - 10^{-3} . Råmelk ved DL-forsøk 3 inneholdt ca. log 1 kde/ml koliforme bakterier ved inkubasjonsstart. Antallet økte gjennom inkuberingen, mens antallet holdt seg nokså stabilt under kjølelagringen. De samme trendene kunne observeres ved DL-forsøk 4, men med noe reduksjon fra 20 til 30 døgn ved kjølelagring.

I forhold til DL-forsøk 1 var antall koliforme bakterier i DL-forsøk 3 og 4 generelt høyere. Resultatene fra DL-forsøk 2 skiller seg fra de andre forsøksrundene på grunn av en rekke prøver uten detekterbare bakteriemengder, samt mangel på resultater ved 20 og 30 døgn grunnet overgrodde petriskåler.



Figur 4.3. Antall koliforme bakterier (log kde/ml) i råmelk og i råmelk med DL-kultur ved forsøksrunde 1.



Figur 4.4. Antall koliforme bakterier (log kde/ml) i råmelk ved forsøksrunde 2, 3 og 4 med DL-kultur.

4.3.1.3. *E. coli* O157:H7

Ved bruk av overflatespredning på SMAC inkubert ved 37 °C i maks 24 timer ble *E. coli* kvantifisert i råmelk og prøvekombinasjoner tilsatt *E. coli*-kultur. Vekst av lilla kolonier på SMAC ligger til grunn for beregningene av log-verdier for petriskålene med råmelk alene, mens kun fargeløse kolonier er tatt med for log-verdiene i de resterende prøvekombinasjonene hvor SMAC ble benyttet. Ved overflatespredning av råmelk ble fortynningene 10^0 - 10^{-2} benyttet. Fortynningene 10^0 - 10^{-2} ble benyttet for kjølelagrede prøver inokulert med *E. coli* og DL-kultur.

Resultatet fra forsøksrunde 1 vises i figur 4.5. I råmelk ble det ikke detektert bakterier på SMAC fram til 20 døgn. Ved 20 døgn inneholdt råmelk ca. log 2 kde/ml, og antallet hadde økt med i overkant av 1 log-enhet ved 30 døgn.

I melk inokulert med *E. coli* ble det generelt observert en økning i løpet av inkubering og en nedgang ved kjølelagring. Antall *E. coli* i pasteurisert melk var høyere enn i råmelk, samt noe høyere i prøver uten DL-kultur enn i prøver tilsatt syrekultur.

Figur 4.6. viser resultatene fra forsøksrunde 2, 3 og 4. Råmelkas bakterieantall på SMAC varierte mellom de tre forsøksrundene, hvor DL-forsøk 2 hadde lavest bakterieantall på SMAC. Generelt så bakterieantallet ut til å øke både ved inkubering og kjølelagring.

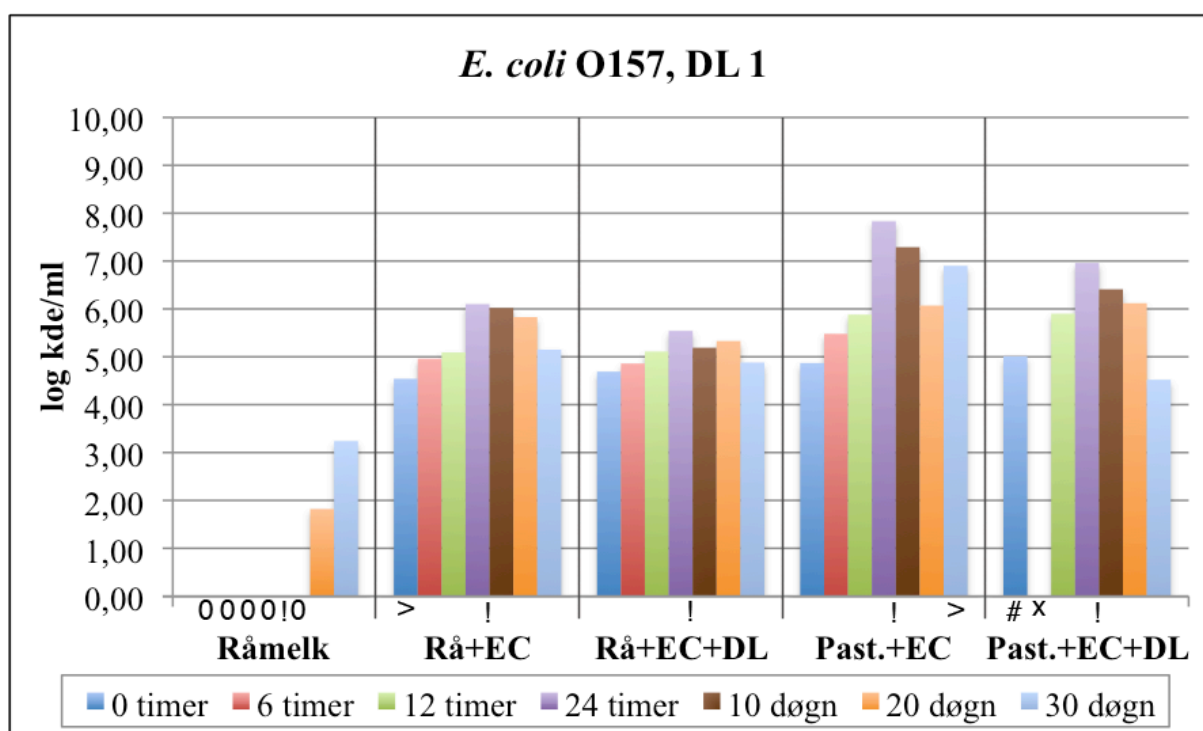
I de inokulerte prøvene gikk også antallet *E. coli* opp i løpet av inkubering. Antall *E. coli* i prøver uten DL-kultur økte i noe større grad enn i prøvene tilsatt syrekultur. De pasteuriserte prøvene hadde et høyere *E. coli*-innhold enn prøvene med inokulert råmelk. Denne forskjellen i antall *E. coli* var imidlertid større mellom prøver med *E. coli* alene enn mellom prøver inokulert med både DL-kultur og *E. coli*.

Antall *E. coli* sank ved kjølelagring i alle inokulerte prøver. Kjølelagring førte til fullstendig reduksjon av *E. coli* i begge prøvekombinasjonene med DL-kultur. Unntaket var pasteurisert melk ved DL-forsøk 4 hvor log-verdien sank fra log 5 kde/ml ved 24 t til log 3 kde/ml ved 10 døgn.

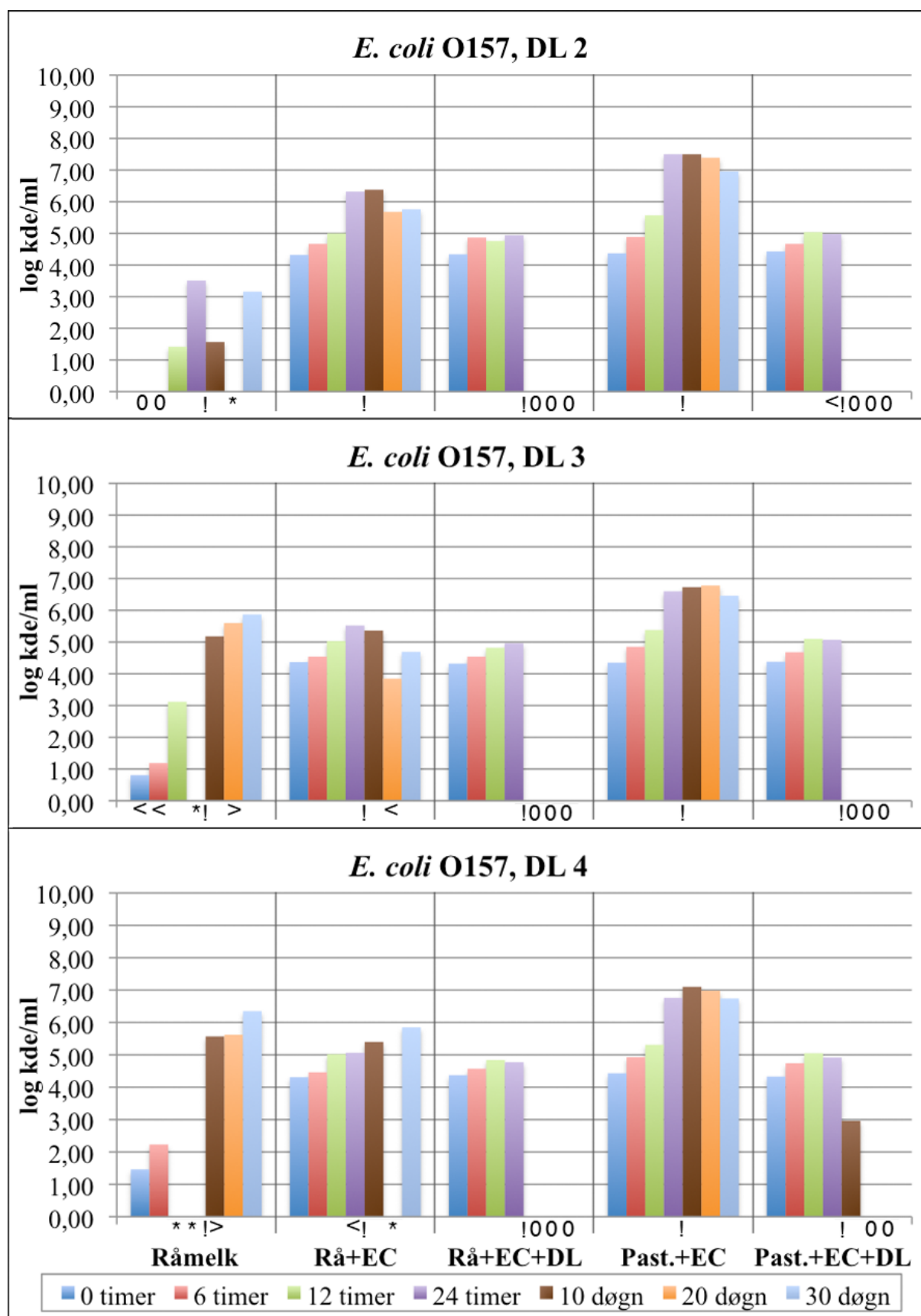
I forholdt til DL-forsøk 1 ble *E. coli* i melk med DL-kultur hemmet i større grad ved DL-forsøk 2, 3 og 4. I råmelk med DL-kultur økte *E. coli* med ca. log 0,5 kde/ml mer i løpet av

inkubering ved første forsøksrunde, og kun en liten reduksjon ble observert ved kjølelagring. I pasteurisert melk med DL-kultur økte *E. coli* med log 1,5 kde/ml mer ved inkubering i DL-forsøk 1 enn ved de andre forsøksrundene.

Kjølelagring reduserte *E. coli* med maks log 2,5 kde/ml i DL-forsøk 1, i motsetning til de senere forsøksrundene, hvor *E. coli* i melk med DL-kultur ikke kunne registreres etter 10 og 20 døgn. I prøvene uten syrekultur ble *E. coli* redusert i mindre grad ved DL-forsøk 2, 3 og 4, sammenliknet med tilsvarende prøver ved DL-forsøk 1.



Figur 4.5. Antall *E. coli* inkludert lilla kolonier (log kde/ml) i råmelk og *E. coli* O157:H7 inokulert i råmelk og pasteurisert melk med og uten DL-kultur ved forsøksrunde 1.



Figur 4.6. Antall *E. coli* inkludert lilla kolonier (log kde/ml) i råmelk og *E. coli* O157:H7 inokulert i råmelk og pasteurisert melk med og uten DL-kultur ved forsøksrunde 2, 3 og 4.

4.3.1.4. Melkesyrebakterier

Overflatespreding på M17 inkubert ved 30 °C i ca. 2 døgn ble benyttet for analyse av råmelk og for å følge syrekulturens vekstforløp i prøvekombinasjoner tilsatt DL-kultur.

Resultater fra forsøksrunde 1 vises i figur 4.7. Råmelkas bakterieinnhold var stabilt ved ca. log 3,5 kde/ml på M17 de første 12 timene, etterfulgt av en dobling ved 24 t. Verdiene fra kjølelagring mangler på grunn av overgrodde petriskåler, hvor fortynningene 10^{-4} - 10^{-6} ble benyttet. I prøvene inokulert med DL-kultur økte antall melkesyrebakterier fra ca. log 6 til ca. log 9 kde/ml i løpet av inkuberingen. Ved kjølelagring holdt bakterienivået seg stabilt i melk tilsatt DL-kultur alene, mens prøvene med *E. coli* hadde en reduksjon med ca. log 0,5 kde/ml på M17.

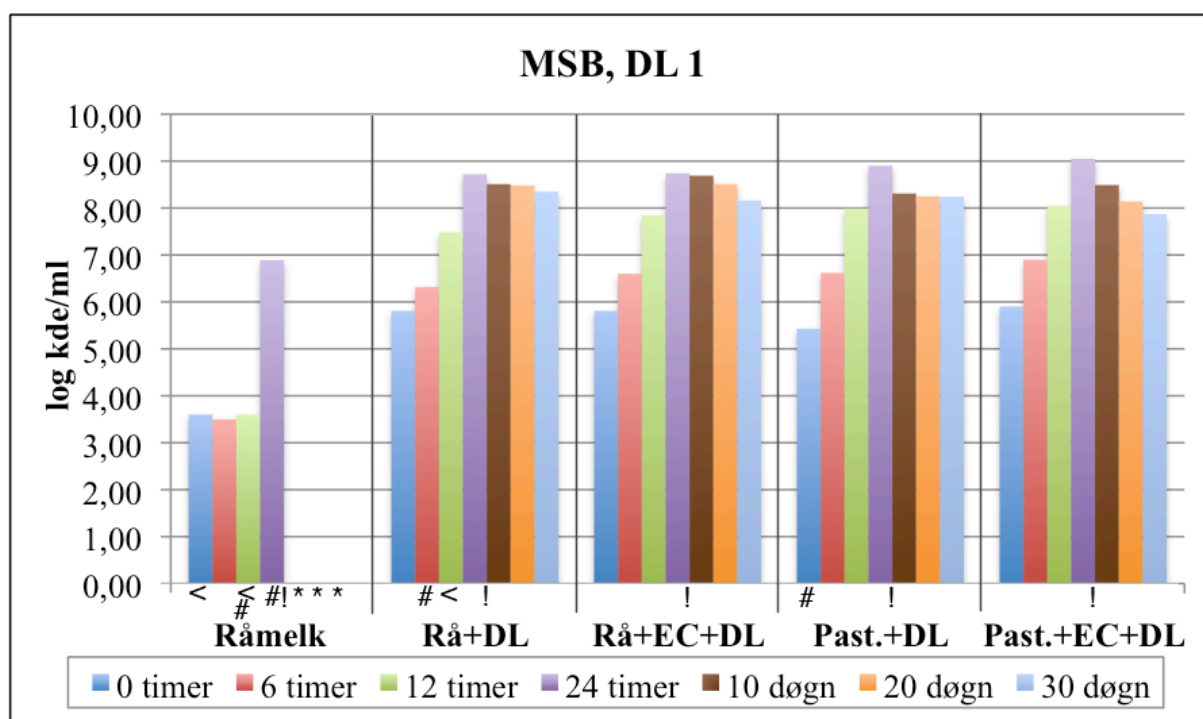
Resultatene fra råmelk til forsøksrunde 2, 3 og 4 vises i figur 4.8. Råmelk ved DL-forsøk 2 hadde et noe lavere bakterieinnhold på M17 enn råmelk ved de to siste forsøksrundene. Grad vekstøkning var imidlertid lik ved alle forsøksrundene. Det samme gjelder det noenlunde stabile bakterieinnholdet på ca. log 8,5 kde/ml ved kjølelagring. Overgrodde skåler ved 12 og 24 timer hadde henholdsvis fortynningene 10^{-1} - 10^{-3} og 10^{-2} - 10^{-4} .

Etter DL-forsøk 1 ble podemengden økt fra ca. log 6 til ca. log 7 kde/ml. Gjennomsnitt av kimtallene fra forsøksrunde 2, 3 og 4 for melk inokulert med DL-kultur vises i figur 4.9. Prøvenes standardavvik er også vist. Innhold av melkesyrebakterier var praktisk talt likt mellom de ulike prøvekombinasjonene inokulert med DL-kultur. Melkesyrebakterienes antall økte til ca. log 8,8 kde/ml etter 12 timers inkubering og holdt seg stabilt på dette nivået til 24 t.

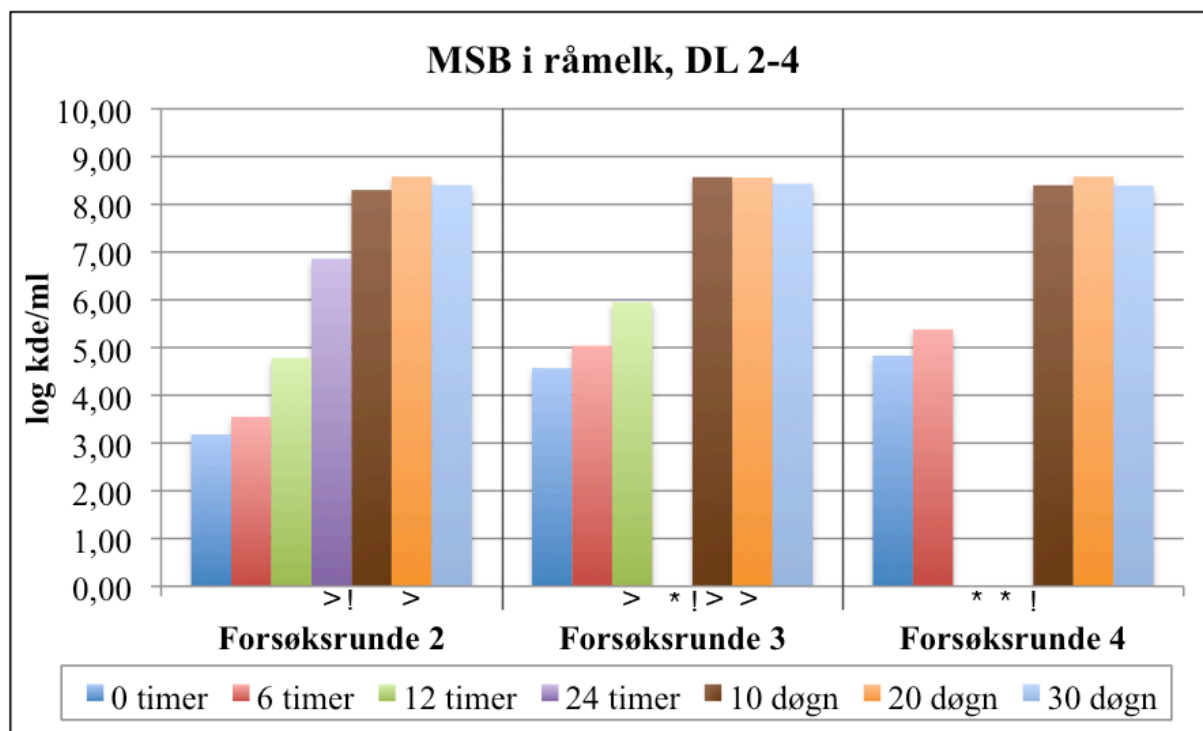
Etter 10 døgn ved kjølelagring hadde antall melkesyrebakterier blitt redusert til ca. log 8 kde/ml. Bakterieinnholdet ble redusert ytterligere med ca. 0,5 log-enhet ved 20 døgn og holdt seg deretter stabilt ut lagringen.

Standardavvikene var relativt små og varierte fra 0 til ca. log 0,3 kde/ml.

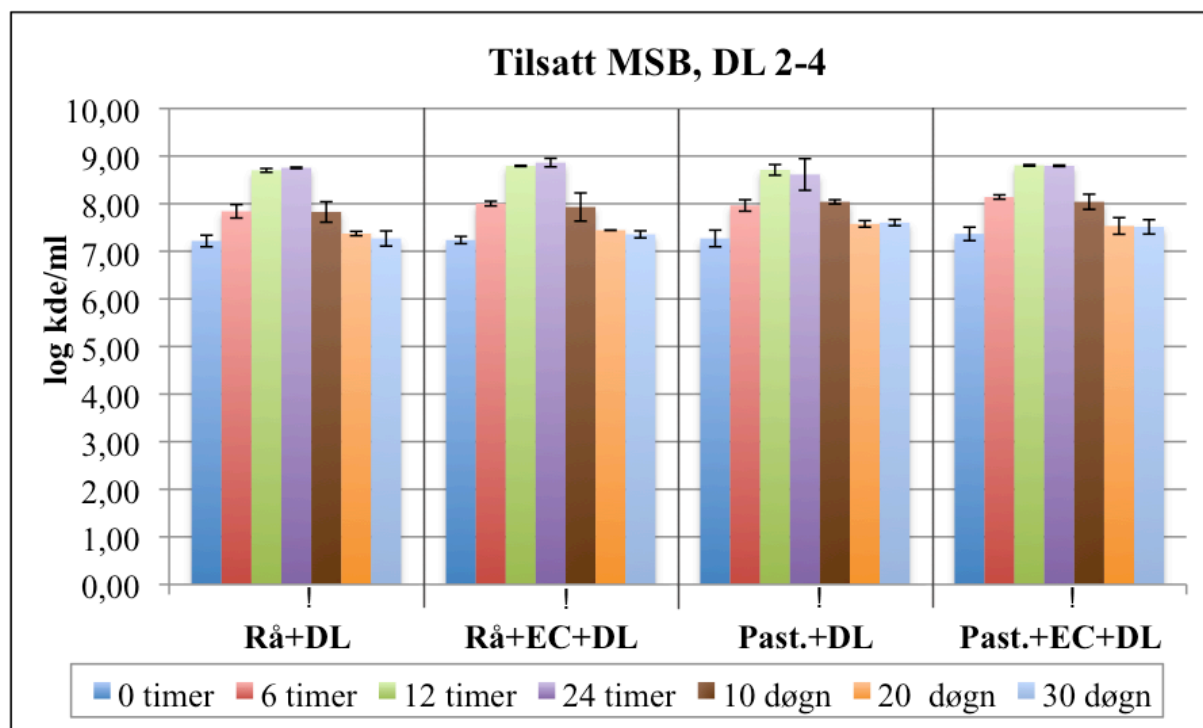
Råmelk ved alle forsøksrundene så ut til å inneholde noenlunde lik bakteriemengde. Manglende verdier vanskeliggjør imidlertid sammenlikningen. Podemengden ved DL-forsøk 1 var ca. 1 log-enhet lavere enn ved senere forsøksrunder. Ved 12 t var innholdet framdeles ca. 1 log-enhet lavere ved første forsøksrunde, sammenliknet med tilsvarende tidspunkt ved de tre andre. Antallet melkesyrebakterier var omtrent likt ved 24 t ved alle forsøksrundene. Utvikling i løpet av kjølelagring varierte, hvor innholdet var relativt stabilt ved DL-forsøk 1 i motsetning til reduksjonen ved de tre andre forsøksrundene.



Figur 4.7. Antall bakterier (log kde/ml) i råmelk på M17-agar og melkesyrebakterier i DL-kultur inokulert i råmelk og pasteurisert melk alene og sammen med *E. coli* O157:H7 ved forsøksrunde 1.



Figur 4.8. Antall bakterier (log kde/ml) i råmelk på M17-agar til forsøksrunde 2, 3 og 4 med DL-kultur.



Figur 4.9. Gjennomsnittlig antall melkesyre bakterier (log kde/ml) fra DL-kultur fra forsøksrunde 2, 3 og 4 inokulert i råmelk og pasteurisert melk alene og sammen med *E. coli* O157:H7, samt prøvenes standardavvik.

4.3.2. pH-måling

Etter uttak til mikrobiologisk analyse ble det målt pH i alle prøvekombinasjonene.

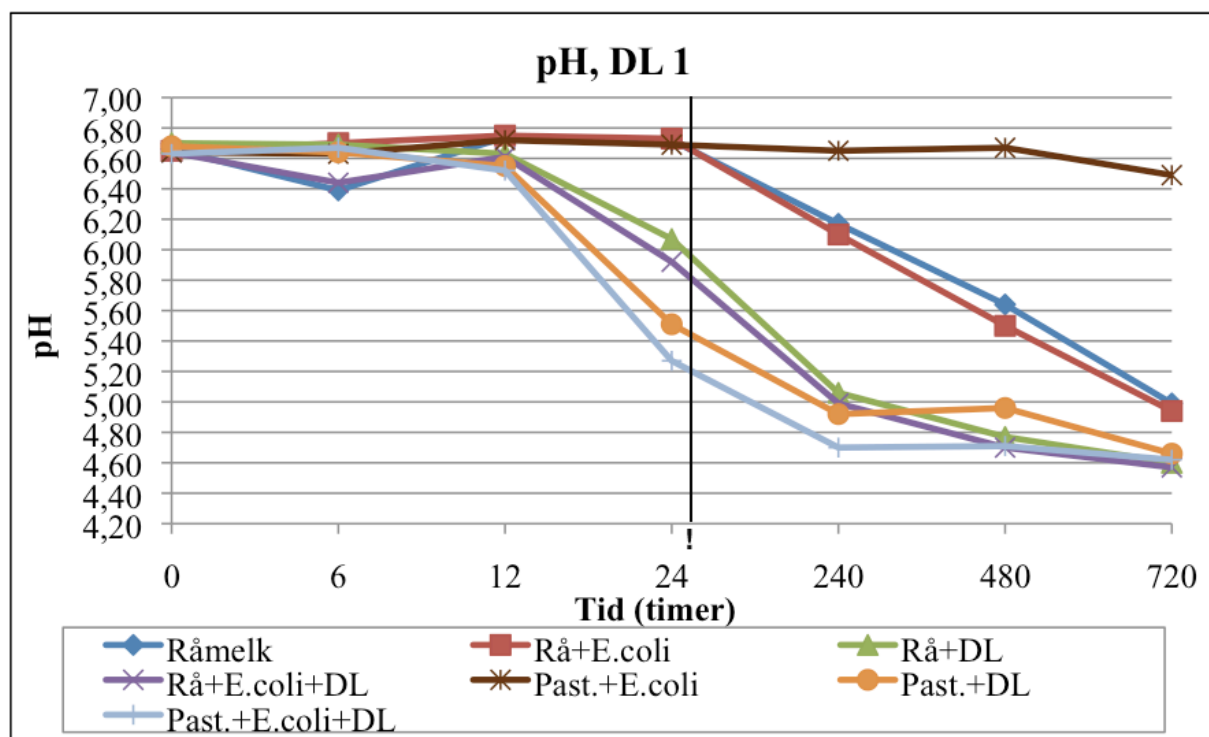
Resultatene fra målingene ved forsøksrunde 1 vises i figur 4.10. Prøvenes pH var nokså stabil ved pH 6,7-6,6 fram til uttak ved 12 t. Mellom uttakene ved 12. og 24. time sank pH i alle prøver inokulert med DL-kultur. Råmelksprøvene hadde imidlertid en høyere pH enn prøvene med pasteurisert melk. Prøvene uten syrekultur viste ingen tydelig pH-utvikling gjennom inkubasjonsperioden.

Ved kjølelagring forble pH temmelig stabil i pasteurisert melk med *E. coli* alene. I råmelk og råmelk inokulert bare med *E. coli* sank pH jevnt mellom uttakene ved 24 t og 30 døgn, med slutt-pH 5. Prøvene med syrekultur fortsatte å syrne ved kjølelagring og endte på ca. pH 4,6.

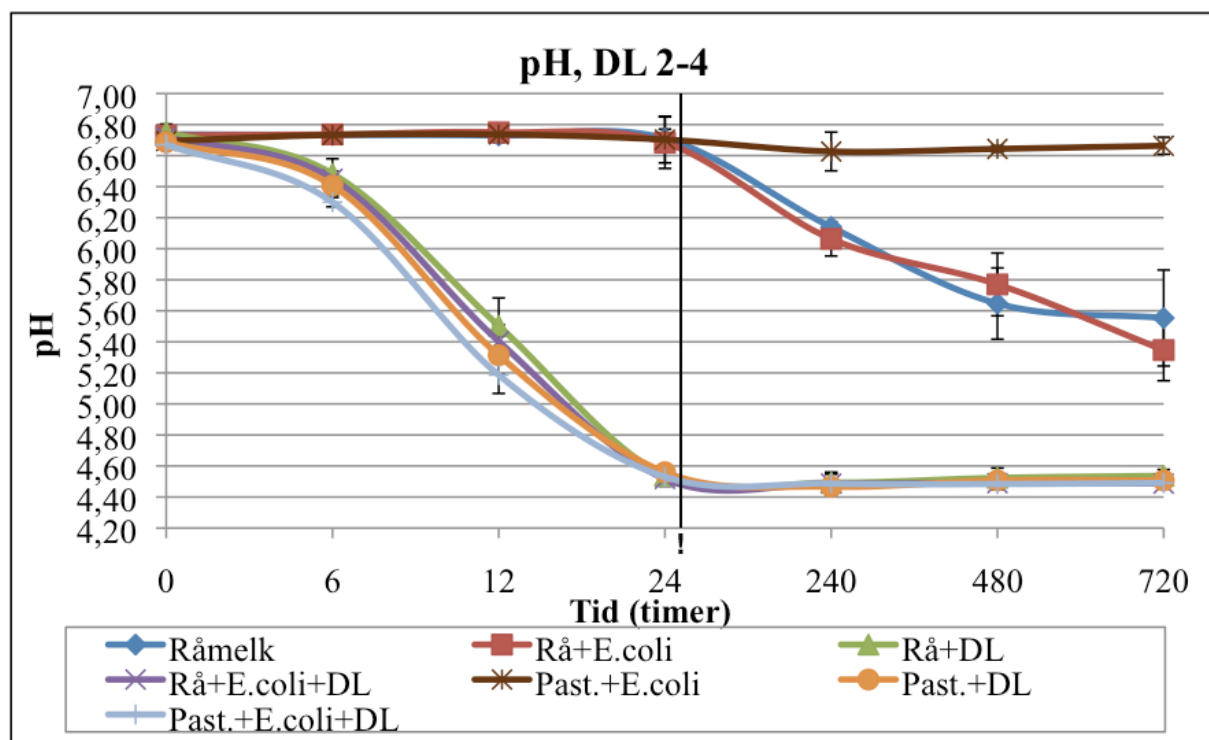
Figur 4.11. viser gjennomsnittlig pH-verdi i prøvene ved forsøksrunde 2, 3 og 4, samt prøvenes standardavvik. I prøvene tilsatt syrekultur hadde pH gått noe ned ved uttak ved 6 t, mens den sank raskere mellom 6 og 24 timer. Ved 12 t var pH noe høyere i prøver av råmelk enn i prøver av pasteurisert melk. Slutt-pH i prøvene med DL-kultur var pH 4,6-4,5. I prøvene uten syrekultur var pH stabil ved ca. pH 6,7 gjennom hele inkubasjonen. Under kjølelagring forble pH stabil i alle prøvene unntatt i råmelk og råmelk tilsatt *E. coli* alene, hvor pH ble redusert til henholdsvis pH 5,55 og pH 5,35.

Standardavvikene var relativt små, med de mest markante ved 12 t i melk tilsatt DL-kultur, og fra 24 t til endt kjølelagring i råmelksprøvene med og uten *E. coli*. Ved 30 døgn hadde råmelk det høyeste standardavviket blant alle prøveuttakene på ca. 0,3 pH-enheter.

Det var nokså store forskjeller i syrningen ved forsøksrunde 1 sammenliknet med de tre andre forsøksrundene. Ved DL-forsøk 1 hadde ikke syrningen startet i prøver med DL-kultur før uttak ved 12 t, og pH ved endt inkubering var omtrent 1-2 pH-enheter høyere. I tillegg fortsatte syrningen ved kjølelagring, noe den ikke gjorde ved DL-forsøk 2, 3 og 4. Slutt-pH i råmelk og råmelk med *E. coli* alene var 0,4-0,6 pH-enheter lavere ved DL-forsøk 1 enn ved DL-forsøk 2, 3 og 4.



Figur 4.10. pH i alle prøvekombinasjoner ved forsøksrunde 1 med DL-kultur.



Figur 4.11. Gjennomsnittlig pH fra forsøksrunde 2, 3 og 4 med DL-kultur for alle sju prøvekombinasjoner, samt prøvenes standardavvik.

4.4. HOVEDFORSØK MED YOGHURTKULTUR

Det forekom ulike problemer ved kolonitelling i løpet av forsøksrundene. I figurene indikerer diverse symboler flere av disse problemene. En oversikt over symbolenes betydning vises i tabell 4.4.

Tabell 4.4. Symboler benyttet i figurene fra hovedforsøk med yoghurtkultur, og betydningen av disse.

Symbol	Betydning
*	Overgrodd – ikke mulig å telle antall kolonier
>	log-verdien er blant annet basert på skåler med over 300 kolonier
<	log-verdien er blant annet basert på skåler med under 20 kolonier
0	Ingen kolonier på skålene
L	Overgrodd av lilla kolonier – ikke mulig å telle/observere blanke kolonier
!	Obs: Endring i temperatur og tidsintervall

4.4.1. Mikrobiologisk analyse

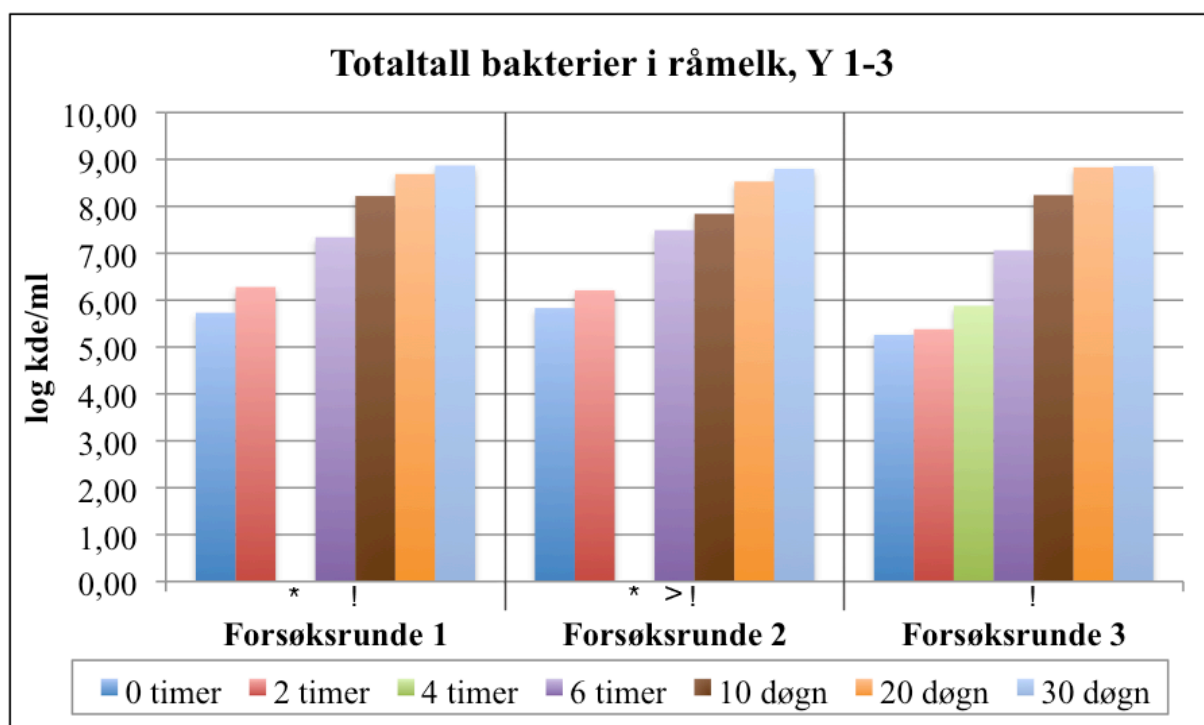
Ved inkubasjonsstart, etter 2, 4 og 6 timer ved 42 °C og etter 10, 20 og 30 døgn ved 4 °C ble det foretatt mikrobiologisk analyse av hver av de sju prøvekombinasjonene.

4.4.1.1. Totaltall bakterier

Prøveuttak med råmelk alene ble overflatespredt på PCA for kvantifisering av totaltall bakterier.

Resultatene fra forsøksrunde 1, 2 og 3 vises i figur 4.12. Både bakterieantall og vekstforløp var praktisk talt likt ved sammenlikning av totaltall bakterier i råmelk ved de tre forsøksrundene. Startmengden var mellom log 5 og 6 kde/ml og økte til log 7,0-7,5 kde/ml ved 6 t. I løpet av kjølelagring økte totaltallet til ca. log 8 ved 10 døgn og noe under log 9 kde/ml ved 30 døgn. Overgrodde skåler ved 4 t hadde fortynningene 10^{-2} - 10^{-4} .

Sammenliknet med totaltall bakterier i råmelk til hovedforsøk med DL-kultur (figur 4.1. og 4.2.) var bakterieantallet noe høyere i råmelk til hovedforsøk med yoghurtkultur.



Figur 4.12. Antall mesofile aerobe bakterier (log kde/ml) i råmelk til forsøksrunde 1, 2 og 3 med yoghurtkultur.

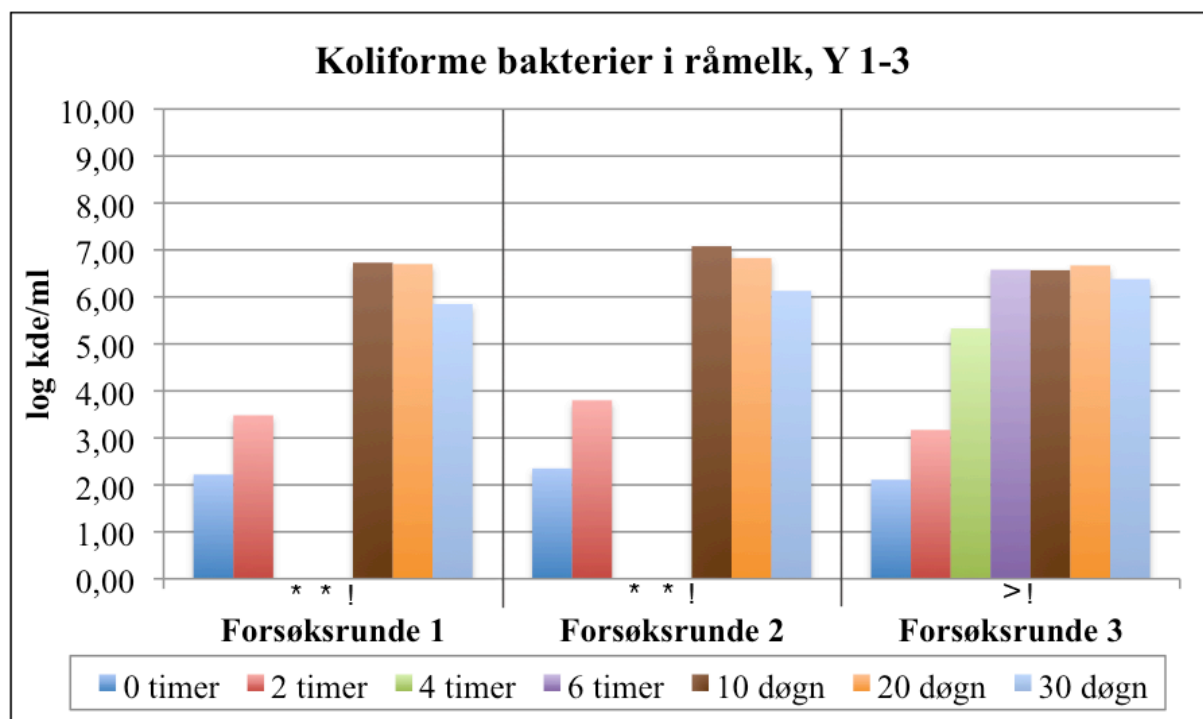
4.4.1.2. Koliforme bakterier

Antall koliforme bakterier i råmelk ble funnet ved innstøpning i VRBA med agarlokk.

Figur 4.13. viser resultatene fra forsøksrunde 1, 2 og 3. Antall koliforme bakterier ved inkubering var noenlunde likt ved de tre forsøksrundene, hvor startmengden var ca. log 2 kde/ml. Manglende verdier grunnet overgrodde petriskåler ved 4 og 6 t ved Y-forsøk 1 og 2 vanskeliggjør imidlertid sammenlikningen. Fortynningene som ble brukt for disse uttakene var 10^0 - 10^{-2} ved Y-forsøk 1 og 10^{-1} - 10^{-3} ved Y-forsøk 2.

Etter 10 og 20 døgn ved kjølelagring var innholdet av koliforme bakterier rundt log 7 kde/ml ved alle forsøksrundene, med omtrent 1 log-enhet reduksjon etter 30 døgn ved Y-forsøk 1 og 2. Antall koliforme bakterier var noe mer stabilt i løpet av kjølelagring ved Y-forsøk 3.

Innholdet av koliforme bakterier i råmelk til hovedforsøk med yoghurtkultur var høyere enn i råmelk til hovedforsøk med DL-kultur (figur 4.3. og 4.4.).



Figur 4.13. Antall koliforme bakterier (log kde/ml) i råmelk til forsøksrunde 1, 2 og 3 med yoghurtkultur.

4.4.1.3. *E. coli* O157:H7

Overflatespredning på SMAC ble benyttet for å finne antall *E. coli* i råmelk og *E. coli* i råmelk og pasteurisert melk med og uten yoghurtkultur. Vekst av lilla kolonier på SMAC ligger til grunn for beregningene av log-verdier for petriskålene med råmelk alene, mens kun fargeløse kolonier er tatt med for log-verdiene hos prøvekombinasjoner hvor *E. coli* ble tilsatt.

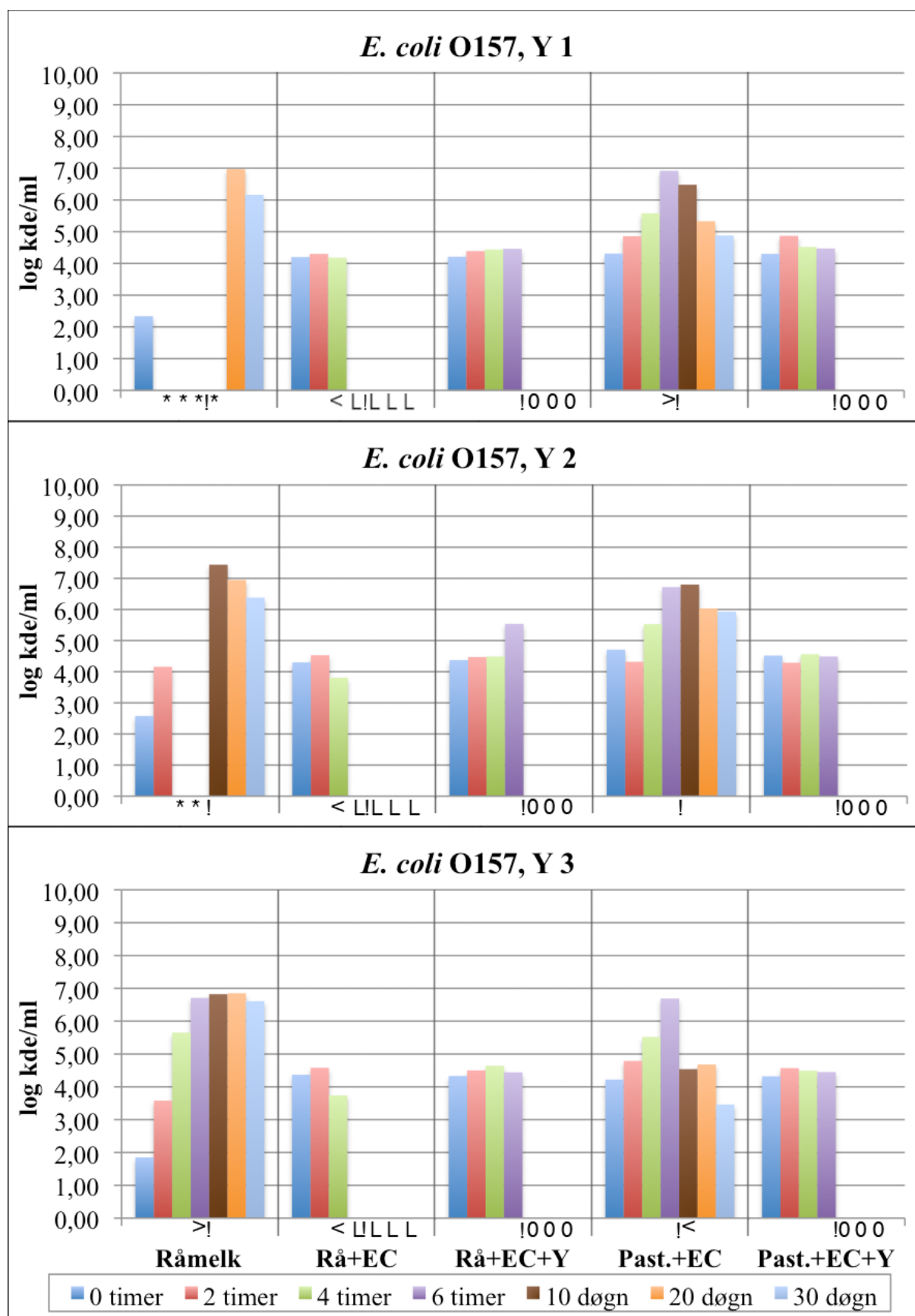
E. coli sitt vekstforløp ved forsøksrunde 1, 2 og 3 vises i figur 4.14. Manglende verdier grunnet overgrodde petriskåler vanskeliggjør sammenlikning av antall *E. coli* i råmelk ved de tre forsøksrundene. Fortynninger som ble benyttet for de overgrodde skålene var 10^0 - 10^{-2} ved inkubasjon i Y-forsøk 1, 10^{-3} - 10^{-4} ved 10 døgn i Y-forsøk 1 og 10^{-1} - 10^{-3} ved inkubasjon i Y-forsøk 2. Utviklingen av bakterier i råmelk på SMAC var noenlunde lik for de tre forsøksrundene, både under inkuberingen og under kjølelagringen.

I de inokulerte prøvene var det små variasjoner mellom de tre forsøksrundene når det gjaldt bakterieantall og vekstforløp ved sammenlikning av samme prøvekombinasjon. Pasteurisert melk med *E. coli* alene ved Y-forsøk 3 hadde en kraftigere reduksjon ved kjølelagring enn ved de to foregående forsøksrundene.

Fellestrekk ved forsøksrundene var at det ikke var mulig å observere tilstedeværelse av *E. coli* i uforynnede prøver med yoghurtkultur etter kjølelagring. I prøver inokulert med *E. coli* i råmelk var det en overvekst av lilla kolonier på petriskålene, hvor fortynningene varierte fra 10^{-2} til 10^{-6} . Her ble lilla kolonier observert allerede ved inkubasjonsstart. Dominans av sorbitolfermenterende bakterier ble observert ved uttak ved 4 t. Ved uttak ved 6 t kunne ikke *E. coli* observeres, en trend som fortsatte ut lagringstiden.

Dominansen av lilla kolonier i råmelk inokulert med *E. coli* vanskeliggjør sammenlikning av vekst i råmelk med og uten yoghurtkultur. Det var imidlertid tydelig at *noen* bakterietyper, riktignok ukjente, var i stand til å vokse i råmelk uten syrekultur, mens vekst av disse samt tilsatt *E. coli* ble hemmet og stanset i råmelk tilsatt yoghurtkultur (fortynning 10^0 - 10^{-2}). *E. coli* hadde omtrent likt vekstforløp i råmelk og pasteurisert melk tilsatt yoghurtkultur. Når *E. coli* var inokulert i pasteurisert melk alene, økte antall *E. coli* ved inkubering til ca. log 7 kde/ml. Antallet ble gradvis redusert ved kjølelagring, men ikke fullstendig.

Vekstforløp hos *E. coli* ved hovedforsøk med yoghurtkultur skilte seg fra hovedforsøk med DL-kultur (figur 4.6.), blant annet ved at antall *E. coli* ikke økte ved inkubering i alle prøvene og at *E. coli* ble mer redusert ved kjøling i pasteurisert melk uten yoghurtkultur.



Figur 4.14. Antall *E. coli* inkludert lilla kolonier (log kde/ml) i råmelk og *E. coli* O157:H7 inokulert i råmelk og pasteurisert melk med og uten yoghurtkultur ved forsøksrunde 1, 2 og 3.

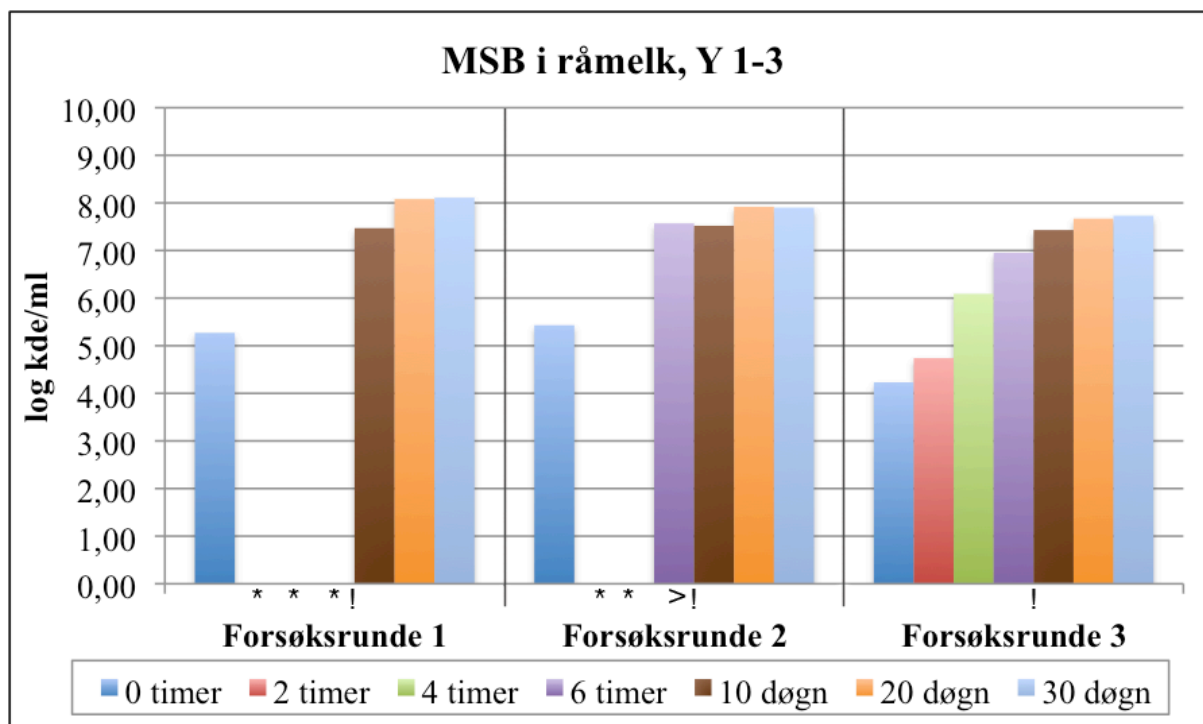
4.4.1.4. Melkesyrebakterier

Vekstforløpet hos melkesyrebakteriene ble fulgt ved overflatespredning på M17. Bakterier i råmelk på M17 ved forsøksrunde 1, 2 og 3 vises i figur 4.15. Både bakterieinnhold og vekstforløp i råmelk var omtrent likt ved forsøksrundene, riktignok med en startmengde med 1 log-enhet lavere ved Y-forsøk 3 enn ved de to foregående forsøksrundene. Inkubering ved forsøksrunde 1 og 2 var preget av overgrodde petriskåler ved fortykning 10^{-1} - 10^{-3} . Ved 6 t ble log 7 kde/ml observert ved Y-forsøk 3. Noe vekst kunne observeres i starten av kjølelagringen ved alle forsøksrundene, hvor bakterieantallet var mellom log 7,5 og 8 kde/ml fra lagringens start til slutt.

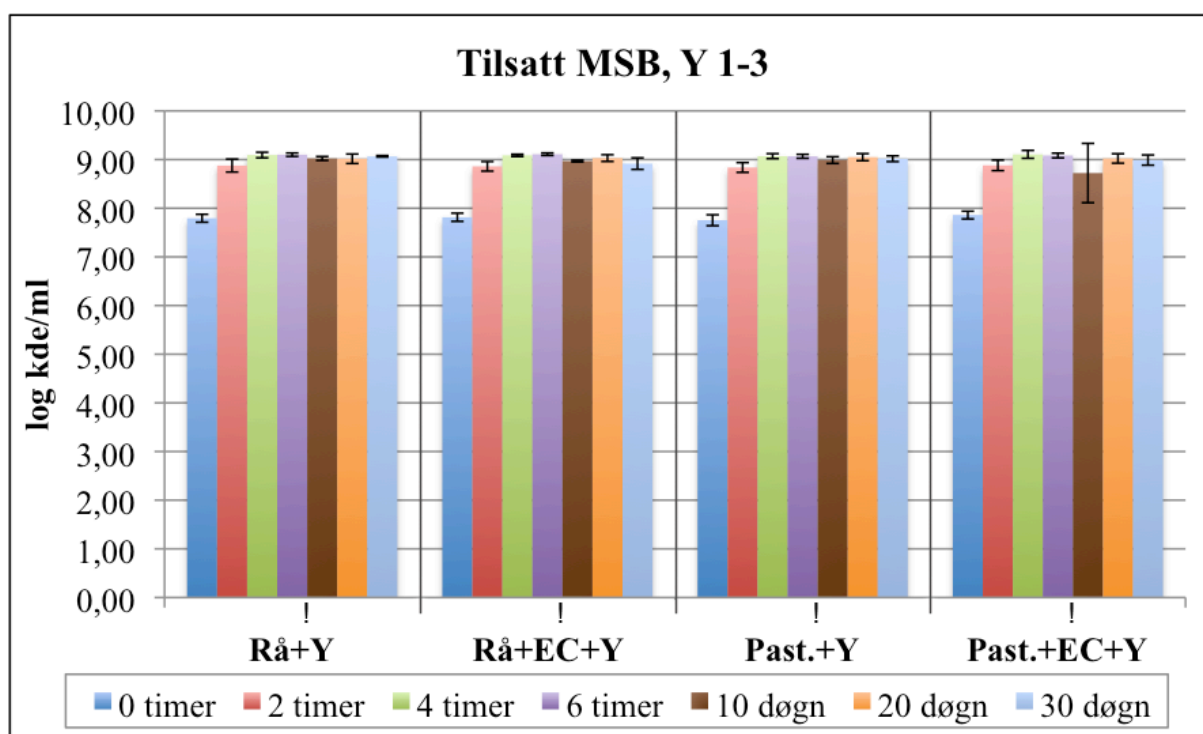
Figur 4.16. viser yoghurtkulturens vekstforløp, hvor log-verdiene er basert på gjennomsnitt av kimtallene fra forsøksrunde 1, 2 og 3. Prøvenes standardavvik er også vist. Startmengden var noe under log 8 og økte til noe under log 9 kde/ml innen 2 timers inkubering.

Bakterieinnholdet holdt seg stabilt ved log 9 kde/ml fra og med uttak ved 4 t fram til kjølelagringens slutt. Det var praktisk talt ingen variasjon mellom prøvekombinasjonene. Blant alle prøvekombinasjonene hadde pasteurisert melk med *E. coli* og yoghurtkultur det eneste nevneverdige standardavviket. Dette avviket var på ca. 0,6 log-enheter, mens de andre prøvene hadde svært små standardavvik.

Bakterietallet i råmelk på M17 til hovedforsøk med yoghurtkultur startet noe høyere ved inkubering og var en anelse lavere ved kjølelagring, sammenliknet med råmelk til hovedforsøk med DL-kultur (figur 4.8.). Inokuleringsmengden var ca. log 0,5 kde/ml høyere ved yoghurtforsøkene enn ved DL-forsøkene. Ved 2 t i yoghurtforsøkene hadde antall melkesyrebakterier nådd samme nivå som ved 24 t i DL-forsøkene. Antallet melkesyrebakterier holdt seg stabilt gjennom kjølelagring av prøver med yoghurtkultur, mens antallet ble redusert i prøver med DL-kultur.



Figur 4.15. Antall bakterier (log kde/ml) i råmelk på M17-agar til forsøksrunde 1, 2, 3 med yoghurtkultur.

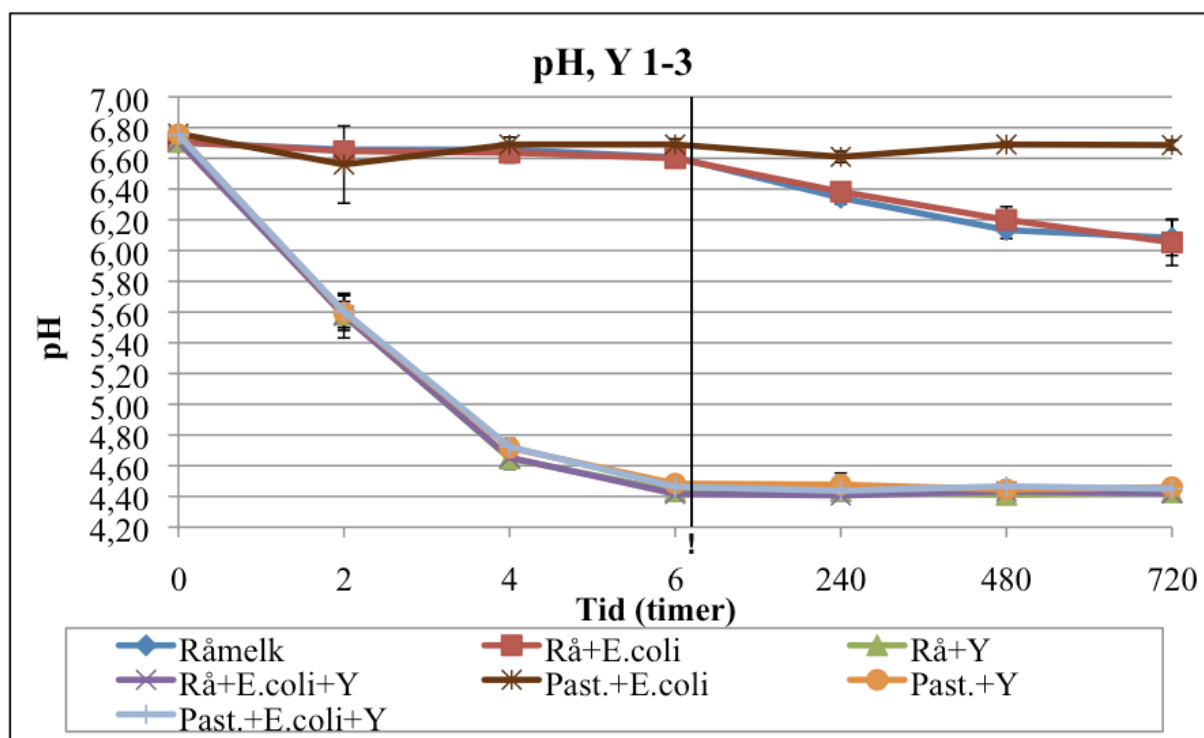


Figur 4.16. Gjennomsnittlig antall melkesyrebakterier (log kde/ml) fra yoghurtkultur fra forsøksrunde 1, 2 og 3 inokulert i råmelk og pasteurisert melk alene og sammen med *E. coli* O157:H7, samt prøvenes standardavvik.

4.4.2. pH-måling

Det ble utført pH-måling i alle prøvekombinasjonene etter uttak til mikrobiologisk analyse. Gjennomsnittlig pH-verdi fra forsøksrundene, samt standardavvik, vises i figur 4.17. Det ble observert en nokså jevn nedgang i pH i prøvene inokulert med yoghurtkultur, til slutt-pH 4,5-4,4 ved 6 t. I prøvene uten syrekultur forble pH stabil under inkubasjonen. Pasteurisert melk med *E. coli* hadde det eneste nevneverdige standardavviket: ca. 0,25 pH-enheter ved 2 t. Under kjølelagring var pH stabil i alle prøvekombinasjonene bortsett fra i råmelk og råmelk inokulert med *E. coli* alene. I disse prøvene ble pH gradvis redusert til en slutt-pH på ca. 6,0 under kjølelagringen.

Slutt-pH i prøvene med yoghurtkultur var noe lavere enn i prøvene med DL-kultur (figur 4.11.). Råmelk og råmelk med *E. coli* alene hadde henholdsvis 0,50 og 0,65 pH-enheter høyere slutt-pH ved bruk av yoghurtkultur enn ved bruk av DL-kultur.

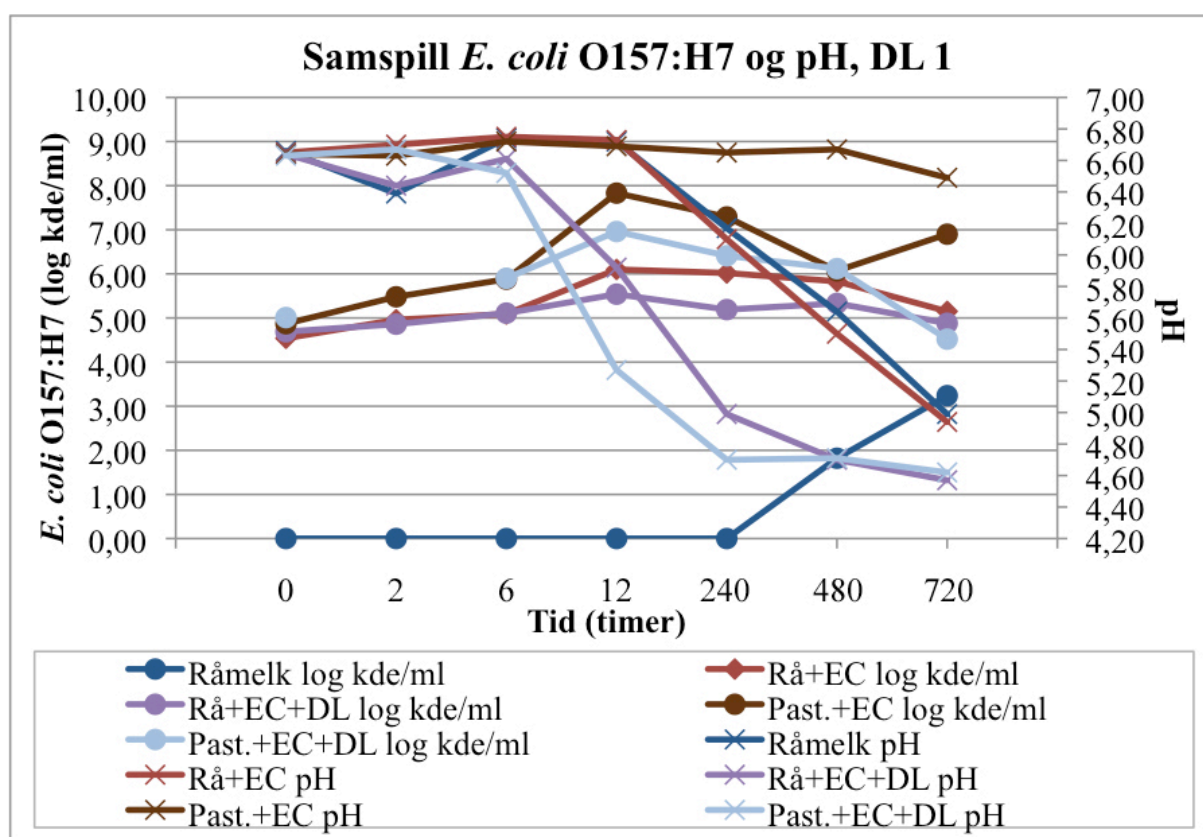


Figur 4.17. Gjennomsnittlig pH fra forsøksrunde 1, 2 og 3 med yoghurtkultur, samt prøvenes standardavvik.

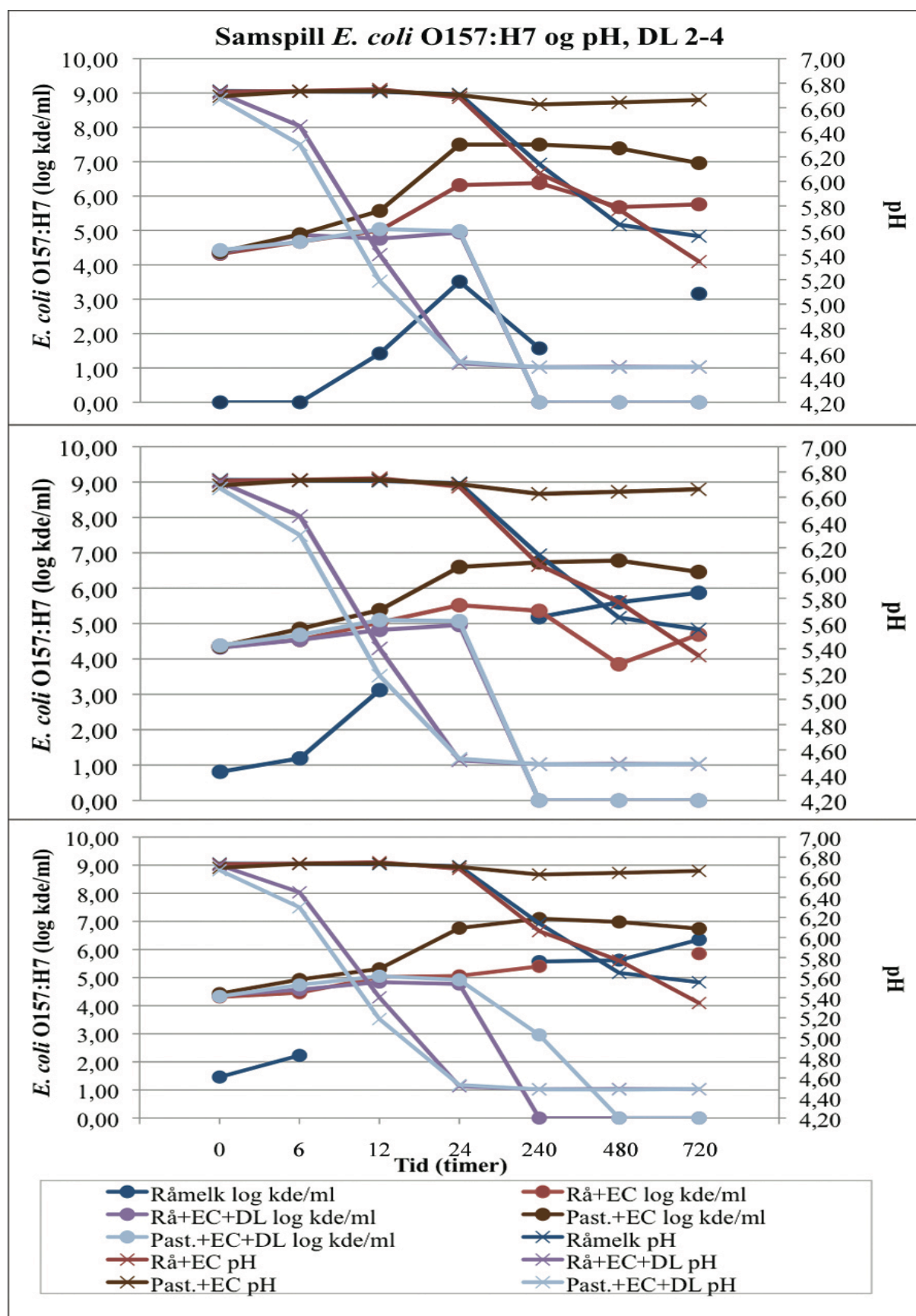
4.5. SAMMENLIKNING AV UTVIKLING AV pH OG ANTALL *E. COLI* O157:H7

Målet med denne oppgaven var å studere effekten melkesyrebakteriers syreproduksjon på utviklingen av *E. coli*. Derfor ble det laget en figur som viser samspillet mellom pH-utvikling og utvikling i antall *E. coli* ved forsøksrundene med DL-kultur og yoghurtkultur.

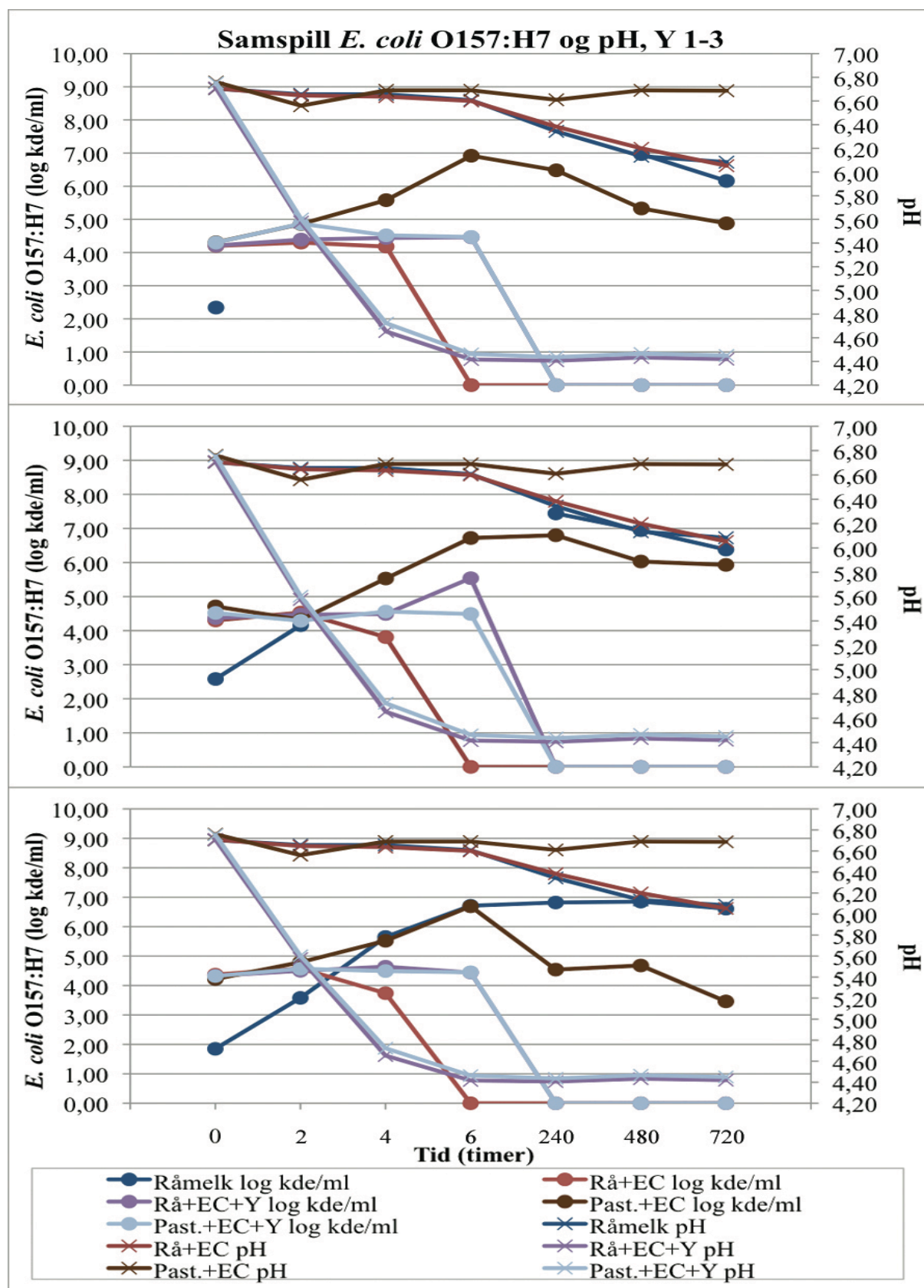
Figur 4.18., figur 4.19. og figur 4.20 viser samspillet for henholdsvis DL-forsøk 1, DL-forsøkene 2, 3 og 4 og yoghurtforsøkene 1, 2 og 3. Figurene viser at når pH synker, går veksten av *E. coli* langsommere eller stanser. *E. coli* vokser best i melk hvor pH ikke blir redusert. Bakterien vokser også best ved langsom pH-reduksjon i forhold til ved rask pH-reduksjon.



Figur 4.18. Samspill mellom *E. coli* O157:H7 og pH i melk med og uten DL-kultur (podemengde ca. log 6 kde/ml), forsøksrunde 1.



Figur 4.19. Samspill mellom *E. coli* O157:H7 og pH i melk med og uten DL-kultur (podemengde ca. log 7,2 kde/ml), forsøksrunde 2, 3 og 4.



Figur 4.20. Samspill mellom *E. coli* O157:H7 og pH i melk med og uten yoghurtkultur (podemengde ca. log 7,8 kde/ml), forsøksrunde 1, 2 og 3.

5. DISKUSJON

Et økende antall småskalavirksomheter lager melkeprodukter av upasteurisert melk. Samtidig kan slik produksjon øke faren for tilstedeværelse av patogene bakterier, som *E. coli* O157:H7, i næringsmidlet (Desmarchelier & Fegan 2002; Frank & Hassan 2002; Mead & Griffin 1998; Walstra et al. 2006). Denne bakterien har vist seg å ha evnen til å vokse ved lavere pH enn flere andre patogene bakterier, inkludert andre *E. coli*-stammer (Bachrouri et al. 2002; Lin et al. 1995). Flere surmelksprodukter kontaminert med *E. coli* O157:H7 har vært årsak til sykdomsutbrudd (Desmarchelier & Fegan 2002; Mead & Griffin 1998; Wasteson 2007).

Målet med denne oppgaven var å studere effekten av melkesyrebakteriers metabolisme på utviklingen av *E. coli* O157:H7 inokulert i både upasteurisert og pasteurisert melk. Melkesyrebakteriene som ble benyttet var syrekulturene DL-kultur og yoghurtkultur.

5.1. FORFORSØK

Overflatespredning ga bedre avlesning av *E. coli* O157:H7 på Sorbitol MacConkey agar (SMAC), sammenliknet med innstøpningsmetoden. Dermed ble overflatespredning benyttet ved videre analyser, noe som fungerte godt. På bakgrunn av Gram-farging og resultatene fra Enterotube ble bakteriene i *E. coli*-kulturen bekreftet identifisert som O157:H7-stamme.

Et av forforsøkene viste at *E. coli*-kulturen kunne vokse både på SMAC og M17-agar. Enkelte utfordringer oppstod i løpet av hovedforsøket når det gjaldt avlesning av *E. coli* O157:H7 på SMAC. Dette omtales nærmere i avsnitt 5.2.2. Ved gjennomføring av hovedforsøket ble det ikke observert problemer med avlesning av melkesyrebakterier på M17-agar som følge av *E. coli* O157:H7 sin evne til å vokse på denne agaren. Som forventet, vokste melkesyrebakteriene fra syrekulturene tilfredsstillende på M17-agar, og agaren ble dermed benyttet ved videre analyser. Det ble ikke observert vekst av bakterier fra syrekulturene på SMAC. Dermed ville ikke inokulering av prøver som inneholdt syrekultur medføre upålitelig avlesning av *E. coli* O157:H7 på SMAC.

Det ble registrert vekst av *E. coli* O157:H7-kulturen ved hver hele pH-enhet fra pH 7 til 3 i BHI-buljong ved 37 °C etter 24 timer, noe som lovet godt med tanke på hovedforsøket. Det kan tenkes at *E. coli* O157:H7 vil vokse annerledes i BHI-buljong enn i melk, som var

hovedforsøkets vekstmedium, på grunn av ulikt i næringsinnhold. Dette forforsøket burde derfor blitt utført i UHT-melk for å oppnå paralleller nærmere hovedforsøkets design.

Det ble utført et forforsøk hvor bakteriens evne til vekst i melk ved hovedforsøkets to forskjellige inkuberingsforhold ble studert. For å kunne være mest mulig likt hovedforsøkets design, burde 6 timer blitt benyttet istedenfor 5 timer under inkuberingen ved 42 °C. Her burde det også blitt utført kvantifisering av *E. coli*-kulturens bakterieinnhold før inkubering for en mer presis konklusjon av analysen. Basert på resultatene som forelå ble det konkludert at bakterien vokste, eller i det minste overlevde, i UHT-melk ved 22 °C i 24 timer og 42 °C i 5 timer.

Kontrolleringen av bakterieinnhold i *E. coli* O157:H7-kulturen etter frysing, videre beregning av podemengde for hovedforsøket, samt valg av ønsket podemengde viste seg ved hovedforsøket å være vellykket. Startmengde *E. coli* O157:H7 var omtrent log 4 kde/ml og så ut til å bli påvirket i varierende grad av vekstforholdene i de ulike prøvekombinasjonene.

Ved kvantifisering av antall melkesyrebakterier i de to syrekulturene ble det utført fortyninger slik det hadde blitt planlagt for hovedforsøket, etterfulgt av inokulering på M17-agar og inkubering. Beregnet log-verdi var da omtrent som ønsket. Antallet kolonier fra 10^{-6} fortykning var imidlertid lavt, noe som burde blitt viet mer oppmerksomhet. Dette var en indikasjon på for lav podemengde. I tillegg til analyse av bakterieantall umiddelbart etter fortykning, burde de inokulerte melkeprøvene blitt inkubert for å følge pH-utvikling i prøvene. Feil podemengde kunne da blitt oppdaget.

5.2. HOVEDFORSØKET

5.2.1. Platetelling

Platetelling er en tradisjonell metode for kvantifisering av mikroorganismer i ulike medier, deriblant næringsmidler. Hvilke mikroorganismer som kvantifiseres er avhengig av hvilken agar som benyttes, da innholdet i ulike agarer kan fremme eller hemme vekst av forskjellige mikrober. Platetellingsmetoden er enkel og relativt billig i bruk og gir resultater raskt. Resultatene er imidlertid ikke helt nøyaktige: Prøven må blandes godt for å fordele bakteriene og få en representativ prøveandel på agarskålen; ikke alle bakteriene i inokulatet vil klare å danne kolonier; koloniene kan ha ulik størrelse og kan stamme fra flere enn én bakterie. På

den måten kan kolonitellingen gi et for lavt eller for høyt antall kolonidannende enheter. Såkalte spredere kan også forekomme, hvor en eller flere bakterier har dannet en sammenhengende koloni som sprer seg utover agaroverflaten. Valg av agar og fortynningsgrad, samt fordeling av prøven i eller på agaren vil også påvirke resultatet (Adams & Moss 2008).

I dette forsøket var bruk av platetelling relativt vellykket. Usikkerhet og svingning rundt antall kolonier vil som sagt kunne oppstå, noe som kan forklare små forskjeller observert mellom de ulike prøvene. De største utfordringene i dette forsøket var ved analysering av råmelkas bakterieinnhold. Både antall og type bakterier i råmelka var naturligvis ukjent på forhånd, slik at valg av fortynningsgrad måtte gjøres ved kvalifisert gjetting. Denne gjettingen hadde varierende suksess.

Bruk av et høyere antall fortynninger for hver prøve ville antakelig gitt brukbare resultater for en større andel av prøvene. Stor arbeidsmengde og korte tidsintervaller mellom prøveuttak skapte imidlertid et dilemma, og valg av fortynningsgrad ble dermed ofte basert på resultater fra foregående forsøksrunder.

5.2.2. Sorbitol MacConkey agar

Sorbitol MacConkey agar ble benyttet for kvantifisering av *E. coli* O157:H7. Tross manglende erfaring med denne agaren, var bruk av SMAC stort sett vellykket. Inokulering av uforynnnet lagringsprøve ga grums på agarskålene, slik at det var utfordrende å skille klumper av prøvemateriale fra eventuelle kolonier. Koliforme bakterier som *Klebsiella* spp. og *Proteus* spp., samt de psykrotrofe bakteriene i *Pseudomonas*-slekten, kan vokse på SMAC og danne lilla kolonier (March & Ratnam 1986; Zadik et al. 1993). Eventuell forekomst av et fåtall lilla kolonier, altså sorbitolfermenterende bakterier, i enkelte prøver hindret ikke kvantifisering av *E. coli* O157:H7.

Problemer oppsto imidlertid når sorbitolfermenterende bakterier ble dominerende og på den måten hindret observering av *E. coli* O157:H7 sine fargeløse kolonier. Dette forekom i råmelk inokulert med *E. coli* O157:H7 ved alle forsøksrundene ved hovedforsøket med yoghurtkultur. Denne høye andelen av lilla kolonier ble ikke observert ved hovedforsøket med DL-kultur. Det kan tenkes at høyere antall koliforme bakterier i råmelk til yoghurtforsøkene har bidratt til vekst av større andel sorbitolfermenterende bakterier på

SMAC (Noveir & Halkman 2000). Ved kjølelagringen av råmelk tilsatt *E. coli* O157:H7 blir trolig psykrotrofe bakterier mer dominerende, og *E. coli* O157:H7 klarer seg relativt dårlig i et vekstmiljø ved lav temperatur med konkurrerende bakterier (Wasteson 2007).

For å unngå problemet med overvekst av lilla kolonier kunne det blitt brukt tilsetningsstoffer som cefixime og tellurite i SMAC for å gjøre agaren mer selektiv for *E. coli* O157:H7 (Fujisawa et al. 2000; Mead & Griffin 1998), men råmelkas mikroflora og dominans av bakterier som dannet lilla kolonier var vanskelig å forutse før hovedforsøket, og med tanke på forsøksdesign ville det vært feil å endre vekstmediets sammensetning midt i forsøksforløpet.

5.2.3. Råmelkas mikroflora

Inkubering ved 22 og 42 °C stimulerte vekst av råmelkas bakterieflora. Totaltall bakterier omfatter svært mange forskjellige mikroorganismer som kan stamme fra en rekke kilder. Kontaminasjonskilder som fjøsmiljøet, kyrne og melkingsutstyret er omtalt i avsnitt 2.1.2.3. Mesofile bakterier vil dominere under inkuberingen ved 22 °C og sammen med termofile bakterier ved 42 °C, mens psykrotrofe bakterier overtar dominansen ved kjølelagringen av usyrnet råmelk (Lafarge et al. 2004; Rasolofa et al. 2010). Temperaturen som ble benyttet ved inkubering av agarskålene med PCA var 30 °C, noe som er en mer optimal veksttemperatur for mesofile bakterier, men psykrotrofe bakterier kan også vokse ved den temperaturen. Dermed er antakelig PCA-resultatene fra lagringsuttakene basert på både mesofile og psykrotrofe bakterier.

Kvantifiseringen av koliforme bakterier i råmelk ble gjort ved bruk av VRBA, som er en selektiv agar for koliforme bakterier, og med inkubasjonstemperaturen 37 °C, som hindrer vekst av psykrotrofe bakterier. Det ble ikke observert vekst av koliforme bakterier i råmelk ved kjølelagring: Bakterieveksten på VRBA viste reduksjon i antall koliforme bakterier. Flere av bakteriene som kan vokse på VRBA kan som sagt også vokse på SMAC. Dette er tydelig ved sammenlikning av bakterieantallet i råmelk inokulert på de to respektive agarene, hvor antallet enten var likt eller noe høyere på VRBA.

Det samme forholdet kan trolig være tilfelle mellom bakterieantallet i råmelk inokulert på PCA og M17-agar. Med tanke på uendret pH i råmelka ved inkubering, stammer koloniene på M17-agar inokulert med råmelk sannsynligvis ikke fra melkesyrebakterier. Ifølge produktdatabladet for M17-agaren (MERCK 115029) er streptokokker og enterokokker blant

bakteriene som kan vokse på denne agaren, i tillegg til melkesyrebakterier. Manglende pH-reduksjon i råmelk ved inkubering ble observert ved alle de sju forsøksrundene.

Det finnes ingen grunn til å anta at melkeproduksjonen ved UMBs to fjøs skiller seg betydelig fra andre fjøs. Sannsynligheten for kontaminering med melkesyrebakterier i råmelka vil dermed være den samme i fjøsene ved UMB som i andre fjøs. Dersom råmelk fra et gjennomsnittlig fjøs ikke har et naturlig innhold av et tilstrekkelig antall melkesyrebakterier til å syrne melka på en god måte under inkubasjonen, vil et av hovedargumentene for bruk av upasteurisert melk til produksjon av fermenterte melkeprodukter bli betydelig svekket. Det kunne vært interessant å utføre flere råmelksanalyser, fra flere fjøs og med flere agartyper, for å studere innholdet av melkesyrebakterier i råmelk fra kyr i norske fjøs under dagens melkingsprosedyrer og lagringsbetingelser for melka på gården.

Råmelkas mikroflora varierte mellom forsøksrundene. Noen av variasjonene kan skyldes platetellingsmetoden, slik som omtalt ovenfor i avsnitt 5.2.1. Teknikkene som ble brukt for å overføre råmelka fra melketank til melkespann (se tabell 3.2.) kan også ha bidratt til varierende mikroflora. Med tanke på at overføringsteknikkene benyttet ved yoghurtforsøkene teoretisk sett var mer sterile enn teknikkene ved DL-forsøkene, kunne det tenkes at råmelka ved yoghurtforsøkene fikk et lavere bakterieinnhold. Råmelk til forsøksrundene med yoghurtkultur hadde imidlertid et høyere antall totaltall bakterier, koliforme bakterier og bakterier på SMAC og M17-agar i forhold til hovedforsøket med DL-kultur. Forskjellene kan blant annet skyldes ulike rutiner blant arbeiderne ved melking, variasjoner i kyrnes mikroflora eller utilfredsstillende rengjøring av rør- og tanksystem (Frank & Hassan 2002; Walstra et al. 2006).

Ulik vekst og utvikling av *E. coli* O157:H7 ved forsøksrundene kan skyldes den varierende bakgrunnsfloraen. Som tidligere nevnt kunne ikke *E. coli* O157:H7 observeres i råmelk inokulert med *E. coli* O157:H7 ved yoghurtforsøkene. I begge hovedforsøkene vokste *E. coli* O157:H7 bedre i pasteurisert melk enn i råmelk, antakelig på grunn av manglende konkurranse fra andre bakterier. Wang et al. (1997) observerte det samme ved 8, 15 og 22 °C.

Melkesyrebakteriene ser ikke ut til å være påvirket av bakgrunnsfloraen, da bakterieinnholdet i de ulike prøvekombinasjonene var nokså likt ved de forskjellige forsøksrundene.

5.2.4. Bakteriernes utvikling

5.2.4.1. Utvikling ved ulike temperaturer

Under inkuberingen ved både 22 og 42 °C ble det i samtlige prøvekombinasjoner observert en økning i bakterieantallet ved prøvenes respektive mikrobiologiske analyser. Varme gir et bedre vekstmiljø enn kulde, men 22 °C er en bedre temperatur enn 42 °C for både mesofile og psykrotrofe bakterier. Psykrotrofe bakterier kan ikke vokse ved over 40 °C (Tortora et al. 2007). Observerte forskjeller i vekstforløpet av *E. coli* O157:H7 ved 22 og 42 °C kan forklares med at vekst ofte foregår saktere ved temperaturer over optimumstemperaturen, som for *E. coli* er 37 °C (Adams & Moss 2008; Wasteson 2007). Det kan også skyldes råmelkas mikroflora, som diskutert i avsnittet ovenfor, eller de to ulike syrekulturene, siden vekstforløpet i pasteurisert melk alene er praktisk talt likt ved hovedforsøkene.

Generelt ble antallet av både koliforme bakterier, *E. coli* O157:H7 og DL-forsøkernes melkesyrebakterier redusert ved kjølelagringen, mens totaltallet hadde en liten økning og antallet melkesyrebakterier ved yoghurtforsøkene forble stabilt. Blant de nevnte bakteriene er det bare psykrotrofe bakterier i totaltallet som har evnen til å vokse i usyrnet råmelk ved 4 °C. Ved kjøling senkes eller stanses de øvrige bakteriernes vekst. Bakteriene befinner seg i stasjonær vekstfase ved inkuberingens slutt, hvor Gram-negative bakterier – som de koliforme – er mer mottakelige for kuldesjokk enn Gram-positive – som melkesyrebakterier (Adams & Moss 2008). Det ble observert at antall melkesyrebakterier i syrnet melk ble redusert under kjølelagring ved DL-forsøkene, mens antallet melkesyrebakterier ved yoghurtforsøkene forble stabilt. Dette var uventet, siden yoghurtkulturens bakterier er termofile og dermed vokser dårligere ved lave temperaturer enn de mesofile bakteriene i DL-kulturen (Narvhus 2010; Walstra et al. 2006). Det kan tenkes at yoghurtbakteriene tåler den lave pH-verdien bedre enn DL-kulturen (Abrahamsen 2010).

E. coli O157:H7 i pasteurisert melk uten syrekultur ser ut til å ha blitt hemmet i større grad under kjølelagringen ved yoghurtforsøkene enn ved DL-forsøkene. Årsaken kan være at bakteriene har blitt utsatt for et større kuldesjokk ved overføringen fra 42 til 4 °C i forhold til flyttingen fra 22 °C (Adams & Moss 2008).

5.2.4.2. pH-utvikling

I melk tilsatt syrekulturer blir pH redusert på grunn av melkesyrebakteriernes metabolisme, hvor blant annet melkesyre produseres (Axelsson 2004; Piard & Desmazeaud 1991; Walstra

et al. 2006). Ved DL-forsøkene var pH en anelse høyere i råmelk med syrekultur enn i pasteurisert melk med syrekultur. Det kan spekuleres i om dette skyldes større konkurranse i råmelk enn i pasteurisert melk. Muligens klarer DL-kulturen seg dårligere ved konkurranse generelt eller mot noen spesielle bakterietyper enn yoghurtkulturen. Det kan også tenkes at råmelka inneholdt enkelte bakterier som dannet metabolitter som nøytraliserte DL-kulturens syre. Ved litteratursøk lyktes det ikke å finne relevant litteratur om dette temaet.

Ifølge yoghurtkulturens produktdatablad (Chr. Hansen YF-L702) danner disse melkesyrebakteriene lite syre etter endt inkubering, og den observerte pH-utviklingen under inkubering likner pH-utviklingen som vises i databladet. Dette tyder på at yoghurtkulturens metabolisme var som forventet under denne oppgavens forsøk.

Melkesyrebakteriene vil drive metabolisme ved kjølelagring, men svært sakte (Narvhus 2010). I motsetning til de andre forsøksrundene, fortsatte pH å synke i syrnet melk under kjølelagringen ved DL-forsøk 1. Under kjølelagring ble pH redusert i prøvene med bare råmelk og råmelk tilsatt *E. coli* O157:H7 ved alle forsøksrundene. Det er mulig at psykrotrofe bakterier kan produsere syre, men antagelig ikke i store mengder (Narvhus 2010). Det viste seg å være vanskelig å finne litteratur som kunne forklare disse interessante observasjonene.

Ved DL-forsøkene hadde prøvene med bare råmelk og råmelk tilsatt *E. coli* O157:H7 lavere slutt-pH enn ved yoghurtforsøkene. Dette kan skyldes tilstedeværelse av ulike bakterier som driver ulik metabolisme i råmelka.

5.2.4.3. Utvikling av *E. coli* O157:H7 i melk tilsatt syrekultur

Det ble funnet at antallet *E. coli* O157:H7 i melk med syrekultur praktisk talt ikke endret seg i løpet av inkubering ved yoghurtforsøkene, i motsetning til den observerte veksten ved DL-forsøkene. Her kan flere faktorer ha hatt betydning, deriblant podemengde, syrekultur, syrningshastighet, pH, samt temperatur, som ble diskutert i avsnitt 5.2.4.1.

Melkesyrebakteriene viste hurtigere økning i antall ved DL-forsøk 2, 3 og 4 enn ved DL-forsøk 1 på grunn av høyere podemengde. Det ble også observert hurtigere økning i antall melkesyrebakterier ved yoghurtforsøkene – hvor podemengden var noe høyere – enn ved DL-forsøkene. I tillegg til bedre vekst av *E. coli* O157:H7 ved inkubering ved DL-forsøkene enn ved yoghurtforsøkene, vokste bakterien mye bedre ved DL-forsøk 1 enn ved forsøksrunde 2,

3 og 4. Dette kan ha sammenheng med funnene i Mufandaedza et al. (2006) sin studie, hvor *E. coli* O157:H7 vokste bedre i råmelk hvor antall melkesyrebakterier var 1 log-enhet mindre enn i UHT-melk. Jo større bakterieantallet i vekstmiljøet er, jo større vil konkurransen mellom bakteriene være.

Syrekulturene ser ut til å ha hatt ulik effekt på *E. coli* O157:H7, da bakterien vokste bedre sammen med DL-kultur. McIngvale et al. (2000) observerte vekst med 1 log-enhet hos *E. coli* O157:H7 under fermentering ved produksjon av skummet kulturmelk. Det er sannsynlig at både fermenteringstemperatur og pH-utvikling har hatt betydning for utviklingen av *E. coli* O157:H7 i denne oppgavens forsøk.

Syrningshastighet har ved flere studier vist seg å påvirke utviklingen av *E. coli* O157:H7: Hurtigere pH-reduksjon gir bedre veksthemming enn langsom pH-reduksjon (Mufandaedza et al. 2006; Ogwaro et al. 2002). Dette ble også sett i dette forsøket, og det er et tydelig samspill mellom pH-utvikling og vekst av *E. coli* O157:H7, hvor pH virker veksthemmende. De to syrekulturene viste som forventet ulik syrningshastighet. Dette var noe av bakgrunnen for forsøksdesignet. Den første forsøksrunden med DL-kultur, hvor podemengden var for lav, viste seg å bidra til en interessant demonstrasjon av syrningshastighetens betydning: Ved DL-forsøk 1 startet pH-nedgangen senere, og det tok atskillig lengre tid å redusere pH til ca. 4,6 enn ved de andre forsøksrundene med DL-kultur. I pasteurisert melk med syrekultur ved DL-forsøk 1 økte antall *E. coli* O157:H7 med 2 log-enheter under inkuberingen, i motsetning til økningen på under 1 log-enhet ved forsøksrunde 2, 3 og 4 med DL-kultur.

I tillegg overlevde *E. coli* O157:H7 kjølelagringen ved DL-forsøk 1, hvor pH var høyere enn ved de andre forsøksrundene. Ved de resterende DL-forsøkene og yoghurtforsøkene var pH 4,6-4,4 etter inkubering i henholdsvis 24 og 6 timer. Ved disse forsøkene døde *E. coli* O157:H7 i løpet av kjølelagringen. Flere studier har vist at *E. coli* O157:H7 kan overleve i mellom 3 og 13 døgn i fermenterte melkeprodukter ved kjølelagring (Bachrouri et al. 2002; Dineen et al. 1998; Hsin-Yi & Chou 2001; Ogwaro et al. 2002; Tsegaye & Ashenafi 2005). Wang et al. (1997) undersøkte vekst av *E. coli* O157:H7 i upasteurisert og pasteurisert melk og fant at bakterien vokste ved 8 °C, men ikke ved 5 °C.

Ifølge Lin et al. (1995) kan *E. coli* O157:H7 vokse ved pH 4,4, og det har ved flere studier blitt observert overlevelse av bakterien ved pH 3 (Benjamin & Datta 1995; Cheng et al. 2003;

Goodson & Rowbury 1989; Lin et al. 1995). Varierende syreressistens blant stammene kan være årsaken til at *E. coli* O157:H7 døde under kjølelagring i denne oppgavens forsøksrunder (Benjamin & Datta 1995; Dlamini & Buys 2009). I tillegg til lav pH har kuldesjokk og konkurrerende bakterier antakelig vært en medvirkende årsak til stress og svekket overlevelsessevne hos *E. coli* O157:H7 (Adams & Moss 2008; Goldstein et al. 1990; Piard & Desmazeaud 1991; Wasteson 2007). Det har blitt framlagt en hypotese om at bakteriens syreressistensmekanismer fungerer dårligere ved kjølelagring (Elhanafi et al. 2004). Strocchi et al. (2006) viste at kjølelagring inaktiverer gener hos *E. coli* som trengs for bakteriens metabolisme. Vold et al. (2000) fant at vekst av den samme *E. coli*-stammen som ble benyttet i dette forsøket ble hemmet av ulike melkesyrebakterier i kjøttdeig ved 12 °C. Under aerob lagring ble inhiberingsgraden påvirket av type melkesyrebakterie, mens ved anaerobe forhold ble ikke denne forskjellen observert. Det ble også observert vekst av bakterien ved 8 °C under aerobe forhold, men ikke ved anaerobe. Det kan derfor tenkes at atmosfæren i melka har påvirket utviklingen av *E. coli* O157:H7 ved forsøksrundene i denne oppgaven. Melk uten syrekultur vil ha et aerobt miljø, mens miljøet ble mer anaerobt når syrekulturene vokser.

Bruk av SMAC for deteksjon av *E. coli* O157:H7 kan ha gitt flere feilkilder i denne oppgavens forsøk enn tidligere antatt. McIngvale et al. (2000) refererer til studier som har vist at SMAC ikke egner seg til deteksjon av *E. coli* som er skadet eller stresset av syre, og at tryptisk soya-agar med VRBA-lokk burde benyttes ved slike tilfeller istedenfor SMAC. Bruk av en ikke-selektiv agar ville derimot trolig bidratt til å skape problemer ved forsøke i denne oppgaven på grunn av bakgrunnsfloraen i råmelka. Wu (2008) skriver at skadede celler kan unnsnippe deteksjon på selektivt medium. Dersom bakteriene blir flyttet til et bedre vekstmiljø, kan de muligens klare å restituere seg og gjenoppta vekst i næringsmidlet. Ved tilfeller hvor det forventes tilstedeværelse av skadede bakterier, burde forholdene tilrettelegges for slik restitusjon før utførelse av kvantitative analyser.

5.3. PRAKTISK ANVENDELSE AV FORSØKSRESULTATENE

Det ble ikke observert pH-reduksjon i fersk råmelk i løpet av fermenteringen. Dermed må syrekultur tilsettes ved produksjon av fermenterte meieriprodukter, og et av hovedargumentene for bruk av upasteurisert melk svekkes. Bruk av tilstrekkelig podemengde og en syrekultur som gir hurtig pH-reduksjon er viktig for å forebygge utvikling av *E. coli* O157:H7 under fermenteringen.

I denne oppgaven ble det første lagringsuttaket gjort etter 10 døgn ved 4 °C. Ved dette tidspunktet ble det ikke detektert *E. coli* O157:H7 i verken kulturmilk eller yoghurt. Basert på denne observasjonen kan det anbefales å unngå konsum av produkter framstilt av upasteurisert melk før de har blitt kjølelagret i minimum 1 uke. For å få et tydeligere bilde av utviklingen av *E. coli* O157:H7 i syrnet melk under kjølelagring, hadde det vært interessant å utføre forsøk med hyppigere uttak under lagringsperioden.

5.4. FRAMTIDSASPEKTER

Råmelka til forsøksrundene inneholdt et varierende antall bakterier, noe som førte til manglende resultater ved flere prøveuttak grunnet bruk av for høy eller lav fortynning. Dersom liknende studier skal utføres, bør det benyttes flere fortynninger for å unngå slike hull i datasettet.

Naturlig tilstedeværelse av melkesyrebakterier er et av hovedargumentene for bruk av upasteurisert melk til produksjon av melkeprodukter, og det påstås at disse bakteriene sikrer et helsemessig trygt produkt. Dersom råmelksprøvene i dette forsøket inneholdt melkesyrebakterier, var i hvert fall ikke antallet stort nok til å redusere pH under fermenteringen. Derfor kunne det være interessant å studere råmelk fra norske fjøs for å kartlegge naturlig tilstedeværelse av melkesyrebakterier under dagens melkeproduksjons- og kjølelagringssystemer for råmelk. I tillegg til kvantifisering ville det også være spennende å undersøke hvilke bakteriestammer som forekommer og om deres evne til å redusere pH i melk skiller seg fra kommersielle syrekulturers egenskaper.

Dersom metabolitter fra mikrobiell omdanning av forskjellige næringsstoffer i melk hadde blitt analysert, kunne flere av endringene som oppstår i melka under både inkubering og kjølelagring blitt vist – ikke bare antall bakterier og pH-utvikling. På den måten kunne eventuelle andre bakteriehemmende komponenter enn syre detekteres, samt mengden av de ulike syrene og komponentene.

For å gjøre Sorbitol MacConkey agar mer selektiv for *E. coli* O157:H7 kan cefixime og tellurite tilsettes. Dette kan hindre vekst av sorbitolfermenterende bakterier på agaren. Tryptisk soya-agar med VRBA-lokk kan kanskje benyttes for å gi bedre vekstvilkår til

skadede bakterier. Muligens burde en kjølelagret prøve oppbevares i et såkalt gjenopplivingsmedium, med lite næring og stoffer som fjerner frie radikaler, før inokulering på en selektiv agar. Skadede *E. coli* kan da restituere seg og være i stand til å vokse ved inkubering på SMAC.

Dersom det skal gjøres videre studier basert på denne oppgaven, vil det være hensiktsmessig å utføre hyppigere lagringsuttak, for eksempel daglig. På den måten kan *E. coli* O157:H7 sin utvikling gjennom kjølelagringen følges enda tettere, og et mer nøyaktig tidspunkt for eliminering av bakterien kan oppdages. Dette vil også gjøre det mulig å studere forskjellene mellom DL-kultur og yoghurtkultur nærmere, da det kan tenkes at tidspunkt for eliminering er ulikt for disse kulturene.

6. KONKLUSJON

I denne studien ble det vist at *E. coli* O157:H7 inokulert i upasteurisert og pasteurisert melk kan vokse under inkubering ved 22 °C i 24 timer sammen med DL-kultur og overleve inkubering ved 42 °C i 6 timer sammen med yoghurtkultur.

I både upasteurisert og pasteurisert melk tilsatt syrekultur døde *E. coli* O157:H7 innen 10 døgn ved kjølelagring ved 4 °C.

Ved inokulering uten syrekultur vokste *E. coli* O157:H7 bedre i pasteurisert melk enn i upasteurisert melk.

7. REFERANSER

- Abbar, F. & Kaddar, H. K. (1991). Bacteriological studies on Iraqi milk products. *Journal of Applied Bacteriology*, 71: 497-500.
- Abrahamsen, R. K., Narvhus, J. A. & Skeie, S. B. (2003). Kartlegging av alternative barrierer for produksjon av melkebaserte produkter produsert av ikke-varmebehandlet melk: en meieriteknologisk utredning. Oslo: Statens Næringsmiddeltilsyn.
- Abrahamsen, R. K. (2010). *Skriftlig tilbakemelding* (E-post).
- Adams, M. R. & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology*. 3. utg. Cambridge: RSC Publishing.
- Animaliehygieneforskriften. (2008). *Forskrift om særlige hygieneregler for næringsmidler av animalsk opprinnelse av 22. desember 2008 nr 1624*: Fiskeri- og kystdepartementet Landbruks- og matdepartementet Helse- og omsorgsdepartementet. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-20081222-1624.html#map006> (lest 10. mai 2010).
- Appelmelk, B. J., An, Y.-Q., Geerts, M., Thijs, B. G., de Boer, H. A., MacLaren, D. M., de Graaff, J. & Nuijens, J. H. (1994). Lactoferrin Is a Lipid A-Binding Protein. *Infection and Immunity*, 62 (6): 2628-2632.
- Asperger, H. & Zangerl, P. (2002). *Staphylococcus aureus*. I: Fuquay, J., Roginski, H. & Fox, P. (red.) b. 4 *Encyclopedia of Dairy Science*: Elsevier Science Ltd.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. I: Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (red.) *Lactic Acid Bacteria; Microbiological and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bachrouri, M., Quinto, E. J. & Mora, M. T. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 During Storage of Yogurt at Different Temperatures. *Journal of Food Science*, 67 (5): 1899-1903.
- Backmann, H. P. & Sphar, U. (1995). The fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheese Made for Raw Milk. *Journal of Dairy Science*, 78: 476-483.
- Baylis, C. (2009). Review: Raw milk and raw cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology*, 62 (3): 293-307.
- Benjamin, M. M. & Datta, A. R. (1995). Acid Tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (4): 1669-1672.
- Bespalov, V. A., Zhulin, I. B. & Taylor, B. L. (1996). Behavior responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 10084-10089.

- Borczyk, A. A., Lior, H. & Ciebin, B. (1987). Short Communication: False positive identifications of *Escherichia coli* O157 in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 4: 347-349.
- Bylund, G. (2003). *Dairy Processing Handbook*. 2. utg. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Castanie-Cornet, M.-P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F. & Foster, J. W. (1999). Control of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181 (11): 3525-3535.
- Cheng, C.-M. & Kaspar, C. W. (1998). Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 15: 157-166.
- Cheng, H.-Y., Yu, R.-C. & Chou, C.-C. (2003). Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaption time and conditions of acid challenge. *Food Research International*, 36: 49-56.
- Dahle, M. B. (2009). Koordinering av Mattilsynets arbeid med småskala melkevirksomheter: Mattilsynet.
- Desmarchelier, P. & Fegan, N. (2002). *Escherichia coli*. I: Fuquay, J., Roginski, H. & Fox, P. (red.) b. 2 *Encyclopedia of Dairy Science*: Elsevier Science Ltd.
- Dineen, S. S., Takeuchi, K., Soudah, J. E. & Boor, K. J. (1998). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Fermentation Systems. *Journal of Food Protection*, 61 (12): 1602-1608.
- Dlamini, B. C. & Buys, E. M. (2009). Adaption of *Escherichia coli* O157:H7 to acid in traditional and commercial goat milk amasi. *Food Microbiology*, 26: 58-64.
- Dyrehelsetilsynet. (2002). *Funn av hamburgerbakterien (E. coli O157) på gård i Møre og Romsdal*: Mattilsynet.no. Tilgjengelig fra:
http://www.mattilsynet.no/portal/page?_pageid=54_40083&_dad=portal&_schema=P_ORTAL&_piref54_40088_54_40083_40083.artSectionId=213&_piref54_40088_54_40083_40083.articleId=958&navigation1_parentItemId=2021&navigation2_parentItemId=2021&navigation2_selectedItemId=2021 (lest 9. april 2010).
- Elhanafi, D., Leenanon, B., Bang, W. & Drake, M. A. (2004). Impact of Cold and Cold-Acid Stress on Poststress Tolerance and Virulence Factor Expression of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 67 (1): 19-26.
- Ellis, K. A., Innocent, G. T., Mihm, M., Cripps, P., McLean, W. G., Howard, C. V. & Grove-White, D. (2007). Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farm in the UK. *Journal of Dairy Research*, 74: 302-310.
- Enticott, G. (2003). Lay Immunology, Local Foods and Rural Identity: Defending Unpasteurised Milk in England. *Sociologia Ruralis*, 43 (3): 197-210.
- Erdei, J., Forsgren, A. & Naidu, A. S. (1994). Lactoferrin Binds to Porins OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 62 (4): 1236-1240.

- Fajardo-Lira, C., García-Garibay, M., Wachter-Rodarte, C., Farrés, A. & Marshall, V. M. (1997). Influence of Water Activity on the Fermentation of Yogurt Made with Extracellular Polysaccharide-producing or Non-producing Starters. *International Dairy Journal*, 7: 279-281.
- Fellows, P. J. (2000). *Food processing technology: Principles and practice*. 2 utg. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Food Standards Australia New Zealand. (2009). Microbiological Risk Assessment of Raw Cow Milk: Risk Assessment Microbiology Section.
- FoodQualitynews.com. (2010). *FDA warns on raw milk*: foodqualitynews.com. Tilgjengelig fra: <http://www.foodqualitynews.com/Food-Alerts/FDA-warns-on-raw-milk> (lest 8. april 2010).
- Frank, J. F. & Hassan, A. N. (2002). Microorganisms associated with milk. I: Fuquay, J., Roginski, H. & Fox, P. (red.) b. 3 *Encyclopedia of Dairy Science*, s. 1786-1796: Elsevier Science Ltd.
- Fujisawa, T., Sata, S., Aikawa, K., Takahashi, T., Yamai, S. & Shimada, T. (2000). Modification of Sorbitol MacConkey Medium Containing Cefixime and Tellurite for Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Radish Sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (7): 3117-3118.
- Gabriel, A. A. & Nakano, H. (2010). Influences of simultaneous physiochemical stress exposures on injury and subsequent responses of *E. coli* O157:H7 to resuscitative and inactivative challenges. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 182-192.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 251-260.
- Goldstein, J., Pollitt, N. S. & Inouye, M. (1990). Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (1): 283-287.
- Goodson, M. & Rowbury, R. J. (1989). Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at sub-lethal acid pH value. *Letters in Applied Microbiology*, 8: 77-79.
- Gorden, J. & Small, P. L. C. (1993). Acid Resistance in Enteric Bacteria. *Infection and Immunity*, 61 (1): 364-367.
- Gran, H. M., Wetlesen, A., Mutukumira, A. N., Rukure, G. & Narvhus, J. A. (2003). Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. *Food Control*, 14: 539-544.
- Haddadin, M. S., Ibrahim, S. A. & Robinson, R. K. (1996). Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. *Food Control*, 7 (3): 149-152.
- Hofshagen, M., Heier, B. T. & Hauge, K. (2009). Zoonoserapporten 2008: Veterinærinstituttet.

- Hsin-Yi, C. & Chou, C.-C. (2001). Short communication: Acid adaption and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiology*, 70: 189-195.
- Jayarao, B. M. & Henning, D. R. (2001). Prevalence of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk. *Journal of Dairy Science*, 84: 2157-2162.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. (2004). Review: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, 2: 123-140.
- Kaur, P., Chakraborti, A. & Asea, A. (2010). Review Article: Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2010: 1-10.
- Kirakosyan, G. & Trchounian, A. (2007). Redox sensing by *Escherichia coli*: Effects of copper ions as oxidizers on proton-coupled membrane transport. *Bioelectrochemistry*, 70: 58-63.
- Korhonen, H. (2001). Antibacterial and antiviral activities of whey proteins. I: *The Importance of Whey and Whey Components in Food and Nutrition: Proceedings of the 3rd International Whey Conference, Munich 2001*. Hamburg, Tyskland: B. Behr's Verlag GmbH & Co.
- Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-Y., Gruss, A. & Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9): 5644-5650.
- Laupsa-Borge, J. (2006a). De beste ostene lages av rå melk. *Mat&Helse*, 11.
- Laupsa-Borge, J. (2006b). Pasteurisert melk...er det sunt? *Mat&Helse*, 12.
- Leistner, L. & Gorris, L. G. M. (1995). Review: Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 41-46.
- Letnes, O. (2005). *God og trygg ost - på bestemors vis*: Forskning.no. Tilgjengelig fra: <http://www.forskning.no/artikler/2005/september/1126176107.39> (lest 12.09.2005).
- Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L. & Foster, J. W. (1995). Comparative Analysis of Extreme Acid Survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177 (14): 4097-4104.
- Lin, J., Smith, M. P., Chapin, K. C., Baik, H. S., Bennett, G. N. & Foster, J. W. (1996). Mechanisms of Acid Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9): 3094-3100.
- March, S. B. & Ratnam, S. (1986). Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 23 (5): 869-872.
- McIngvale, S. C., Chen, X. Q., McKillip, J. L. & Drake, M. A. (2000). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Buttermilk as Affected by Contamination Point and Storage Temperature. *Journal of Food Protection*, 63 (4): 441-444.

- McPhee, J. D. & Griffiths, M. W. (2002). Psychrotrophic bacteria: *Pseudomonas* spp. I: Fuquay, J., Roginski, H. & Fox, P. (red.) b. 4 *Encyclopedia of Dairy Science*: Elsevier Science Ltd.
- Mead, P. S. & Griffin, P. M. (1998). Seminar: *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, 352: 1207-1212.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. (1999). Synopses: Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5 (5): 607-625.
- Melkeforskriften. (1995). *Forskrift om produksjon og omsetning mv. av rå melk, varmebehandlet melk og melkebaserte produkter av 30. juni 1995 nr 636*: Helse- og omsorgsdepartementet. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-19950630-0636.html> (lest 1. november 2009).
- Melkevareforskriften. (1953). *Forskrift om melk of fløte m.v. av 17. juli 1953 nr 9637*: Helse- og omsorgsdepartementet. Tilgjengelig fra: <http://www.lovdata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-19530717-9637.html> (lest 24. januar 2010).
- Mufandaedza, J., Viljoen, B. C., Feresu, S. B. & Gadaga, T. H. (2006). Short communication: Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *Journal of Food Microbiology*, 108: 147-152.
- Narvhus, J. A. (2010). *Skriftlig tilbakemelding* (E-post).
- Nordbø, R. (2010). *Småskalavirksomheter med foredling av upasteurisert melk i Norge* (E-post).
- Noveir, M. R. & Halkman, A. K. (2000). A Study on Selective Broths and Agar Media for the Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 Serotype. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 24: 459-464.
- Ogwaro, B. A., Gibson, H., Whitehead, M. & Hill, D. J. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 79: 105-112.
- Pakkanen, R. & Aalto, J. (1997). Review Paper: Growth Factors and Antimicrobial Factors of Bovine Colostrum. *International Dairy Journal*, 7: 285-297.
- Piard, J. C. & Desmazeaud, M. (1991). Review: Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71: 525-541.
- Piard, J. C. & Desmazeaud, M. (1992). Review: Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113-142.
- Polissi, A., De Laurentis, W., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G. & Dehò, G. (2003). Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperatur. *Research in Microbiology*, 154: 573-580.

- Rainard, P. (1986). Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria. *Veterinary Microbiology*, 11 (4): 387-392.
- Rasolofoa, E. A., St-Gelais, D., LaPointe, G. & Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *international Journal of Food Microbiology*, 138: 108-118.
- Reed, B. A. & Grivetti, L. E. (2000). Controlling On-Farm Inventories of Bulk-Tank Raw Milk - An Opportunity to Protect Public Health. *Journal of Dairy Science*, 83: 2988-2991.
- Reiter, B. (1978). Antimicrobial systems in milk. *Journal of Dairy Research*, 45 (1): 131-147.
- Rysanek, D., Zouharova, M. & Babak, V. (2009). Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. *Journal of Dairy Research*, 76: 117-123.
- Rørvik, L. M. & Granum, P. E. (2007). *Staphylococcus aureus*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning: Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*. Kristiansand: HøyskoleForlaget.
- Scheiring, J., Andreoli, S. P. & Zimmerhackl, L. B. (2008). Educational review: Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatric Nephrology*, 23: 1749-1760.
- Seifu, E., Buys, E. M. & Donkin, E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 137-154.
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. & Slonczewski, J. L. (1994). Acid and Base Resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: Role of *rpoS* and Growth pH. *Journal of Bacteriology*, 176 (6): 1729-1737.
- Statens Næringsmiddeltilsyn. (1999). *Undersøkelse av upasteuriserte melkeprodukter*: Mattilsynet.no. Tilgjengelig fra: http://www.mattilsynet.no/portal/page?_pageid=54,40083&_dad=portal&_schema=PORTAL&_piref54_40088_54_40083_40083.artSectionId=213&_piref54_40088_54_40083_40083.articleId=3241&navigation1_parentItemId=2021&navigation2_parentItemId=2021&navigation2_selectedItemId=2021 (lest 9. april 2010).
- Statens Næringsmiddeltilsyn. (2000). *Produksjon av melkeprodukter*: Mattilsynet.no. Tilgjengelig fra: http://mattilsynet.no/publikasjoner/faktaark/mat/produksjon_av_melkeprodukter_22480 (lest 9. april 2010).
- Stepaniak, L. (2002). Psychrotrophic bacteria: Bacteria Other than *Pseudomonas* spp. I: Fuquay, J., Roginski, H. & Fox, P. (red.) b. 4 *Encyclopedia of Dairy Science*: Elsevier Science Ltd.
- Store norske leksikon. (u.å.). *Fermentering*: snl.no. Tilgjengelig fra: <http://snl.no/fermentering> (lest 24. januar 2010).

- Strocchi, M., Ferrer, M., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2006). Research Article: Low temperature-induced system failure in *Escherichia coli*: Insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics*, 6: 193-206.
- TINE. (2007). *TINE Medlemshåndbok Region Øst*: TINE BA.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2007). *Microbiology: An introduction*. 9. utg. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Trujillo, A. J., Pozo, P. I. & Guamis, B. (2007). Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in caprine milk. *Small Ruminant Research*, 67: 243-246.
- Tsegaye, M. & Ashenafi, M. (2005). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the processing and storage of Ergo and Ayib, traditional Ethiopian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 11-21.
- U.S. Food and Drug Administration. (2003). *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook: The "Bad Bug Book"*. Tilgjengelig fra: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/default.htm> (lest 21. april 2010).
- U.S. Food and Drug Administration. (2009a). *FDA Warns Consumers to Avoid Drinking Raw Milk*: fda.gov. Tilgjengelig fra: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2005/ucm108535.htm> (lest 8. april 2010).
- U.S. Food and Drug Administration. (2009b). *The Dangers of Raw Milk: Unpasteurized Milk Can Pose a Serious Health Risk*: fda.gov. Tilgjengelig fra: <http://www.fda.gov/Food/ResourcesForYou/Consumers/ucm079516.htm> (lest 8. april 2010).
- Vitenskapskomiteen for mattrygghet. (2006). A qualitative assessment to the risks of transmission of microorganisms to humans resulting from the consumption of raw milk and raw cream in Norway.
- Vold, L., Holck, A., Wasteson, Y. & Nissen, H. (2000). High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *international Journal of Food Microbiology*, 56: 219-225.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M. & Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology*. 2. utg. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Wang, G., Zhao, T. & Doyle, M. P. (1997). Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Unpasteurized and Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection*, 60 (6): 610-613.
- Warnecke, T. & Gill, R. T. (2005). Review: Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, 4 (25).
- Wasteson, Y. (2007). *Escherichia coli*. I: Granum, P. E. (red.) *Matforgiftning: Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*. Kristiansand: HøyskoleForlaget.

- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J. & Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12: 91-109.
- Wu, V. C. H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25: 735-744.
- Yamauchi, K., Tomita, M., Giehl, T. J. & Ellison III, R. T. (1993). Antibacterial Activity of Lactoferrin and a Pepsin-Derived Lactoferrin Peptide Fragment. *Infection and Immunity*, 61 (2): 719-728.
- Zadik, P. M., Chapman, P. A. & Siddons, C. A. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology*, 39: 155-158.
- Zourari, A., Accolas, J. P. & Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait*, 72: 1-34.

VEDLEGG: RÅDATA FRA ANALYSENE I HOVEDFORSØKET

VEDLEGG

RÅDATA FRA ANALYSENE I HOVEDFORSØKET

Ved hovedforsøk med DL-kultur ble det utført fire forsøksrunder. Prøvene ble inkubert ved 22 °C i 0, 6, 12 og 24 timer.

Ved hovedforsøk med yoghurtkultur ble det utført tre forsøksrunder. Inkubasjonen foregikk ved 42 °C i 0, 2, 4 og 6 timer.

Kjølelagring foregikk ved 4 °C i 10, 20 og 30 døgn, uavhengig av benyttet syrekultur.

Følgende forkortelser benyttes i tabellene:

DL = Forsøk med DL-kultur.

Y = Forsøk med yoghurtkultur.

1 = Råmelk.

2 = Råmelk + *E. coli* O157.

3 = Råmelk + syrekultur.

4 = Råmelk + *E. coli* O157 + syrekultur.

5 = Pasteurisert melk + *E. coli* O157.

6 = Pasteurisert melk + syrekultur.

7 = Pasteurisert melk + *E. coli* O157 + syrekultur.

Tallet bak kommategnet angir tiden, hvor de fire første tallene i en prøvekombinasjon er oppgitt i antall timer ved inkubering i varmeskap, mens de tre siste er oppgitt i antall døgn ved kjølelagring.

For eksempel: DL2, 6 = Hovedforsøk med DL-kultur, Råmelk + *E. coli* O157, ved 6 timers inkubasjon.

Tabell 1. Totaltall bakterier (log kde/ml) ved alle forsøksrundene i hovedforsøk med DL-kultur og med yoghurtkultur, samt gjennomsnitt og standardavvik.

	Forsøksrunde 1 (log kde/ml)	F.runde 2 (log kde/ml)	F.runde 3 (log kde/ml)	F.runde 4 (log kde/ml)	Gjennomsnitt (log kde/ml)	Standardavvik
DL1, 0	3,73	4,81	5,23	5,26	5,10	0,25
DL1, 6	3,60	4,76	5,32	5,52	5,20	0,39
DL1, 12	3,70	5,54	6,23	7,20	6,32	0,83
DL1, 24	7,08	7,19	7,48	7,22	7,30	0,16
DL1, 10	>7,48	8,34	8,53	8,64	8,50	0,15
DL1, 20	8,76	8,52	8,70	8,69	8,64	0,10
DL1, 30	9,48	8,47	8,78	8,36	8,54	0,22
Y1, 0	5,73	5,83	5,26	/	5,61	0,30
Y1, 2	6,28	6,21	5,38	/	5,96	0,50
Y1, 4	>6,48	>6,48	5,88	/	5,88	
Y1, 6	7,34	7,49	7,06	/	7,30	0,22
Y1, 10	8,22	7,84	8,24	/	8,10	0,23
Y1, 20	8,69	8,53	8,83	/	8,68	0,15
Y1 30	8,87	8,80	8,86	/	8,84	0,04

/ Ikke analysert.

Tabell 2. Koliforme bakterier (log kde/ml) ved alle forsøksrundene i hovedforsøk med DL-kultur og med yoghurtkultur, samt gjennomsnitt og standardavvik.

	Forsøksrunde 1 (log kde/ml)	F.runde 2 (log kde/ml)	F.runde 3 (log kde/ml)	F.runde 4 (log kde/ml)	Gjennomsnitt (log kde/ml)	Standardavvik
DL1, 0	0,40	<1 '	1,16	1,72	0,96	0,88
DL1, 6	1,00	<1 '	1,53	2,00	1,18	1,05
DL1, 12	1,25	<1 '	2,83	3,41	2,08	1,82
DL1, 24	3,78	3,35	4,54	>4,48	3,95	0,84
DL1, 10	2,92	<1 '	4,65	x	2,33	3,29
DL1, 20	2,00	>3,48	4,81	5,66	5,24	0,60
DL1, 30	2,40	>5,48	4,84	4,37	4,61	0,33
DL3, 0	0,40	/	/	/	/	/
DL3, 6	0,60	/	/	/	/	/
DL3, 12	1,30	/	/	/	/	/
DL3, 24	2,57	/	/	/	/	/
DL3, 10	1,93	/	/	/	/	/
DL3, 20	/	/	/	/	/	/
DL3, 30	/	/	/	/	/	/
Y1, 0	2,22	2,35	2,11	/	2,23	0,12
Y1, 2	3,48	3,80	3,17	/	3,48	0,32
Y1, 4	*	>5,48	5,33	/	5,33	
Y1, 6	*	>5,48	6,58	/	6,58	
Y1, 10	6,73	7,08	6,57	/	6,79	0,26
Y1, 20	6,70	6,83	6,67	/	6,73	0,09
Y1, 30	5,85	6,13	6,38	/	6,12	0,27

/ Ikke analysert.

* Overgrodd.

x Tatt ut pga dårlige paralleller.

' kde/ml.

Tabell 3. *E. coli* O157:H7 (log kde/ml) ved alle forsøksrundene i hovedforsøk med DL-kultur og med yoghurtkultur, samt gjennomsnitt og standardavvik.

	Forsøksrunde 1 (log kde/ml)	F.runde 2 (log kde/ml)	F.runde 3 (log kde/ml)	F.runde 4 (log kde/ml)	Gjennomsnitt (log kde/ml)	Standardavvik
DL1, 0	<1 '	<1 '	0,81	1,46	0,76	0,73
DL1, 6	<1 '	<1 '	1,19	2,23	1,14	1,12
DL1, 12	<1 '	1,42	3,12	>3,48	2,27	1,20
DL1, 24	<1 '	3,51	*	>3,48	3,51	
DL1, 10	<1 '	1,57	5,18	5,57	4,11	2,21
DL1, 20	1,82	>3,48	5,6	5,62	5,61	0,01
DL1, 30	3,24	3,16	5,87	6,35	5,13	1,72
DL2, 0	4,54	4,32	4,37	4,31	4,33	0,03
DL2, 6	4,96	4,67	4,54	4,46	4,56	0,11
DL2, 12	5,09	5,00	5,03	5,02	5,02	0,02
DL2, 24	6,10	6,32	5,52	5,06	5,63	0,64
DL2, 10	6,02	6,38	5,36	5,40	5,71	0,58
DL2, 20	5,83	5,68	3,85	>6,48	4,77	1,29
DL2, 30	5,15	5,76	4,69	5,85	5,43	0,65
DL4, 0	4,69	4,34	4,32	4,37	4,34	0,03
DL4, 6	4,86	4,87	4,54	4,57	4,66	0,18
DL4, 12	5,11	4,76	4,82	4,84	4,81	0,04
DL4, 24	5,54	4,94	4,96	4,77	4,89	0,10
DL4, 10	5,19	<100 '	<1 '	<1 '	0,00	0,00
DL4, 20	5,33	<1 '	<1 '	<1 '	0,00	0,00
DL4, 30	4,88	<1 '	<1 '	<1 '	0,00	0,00
DL5, 0	4,87	4,37	4,35	4,43	4,38	0,04
DL5, 6	5,48	4,89	4,85	4,93	4,89	0,04
DL5, 12	5,88	5,57	5,38	5,31	5,42	0,13
DL5, 24	7,83	7,50	6,60	6,76	6,95	0,48
DL5, 10	7,29	7,50	6,73	7,10	7,11	0,39
DL5, 20	6,07	7,39	6,78	6,98	7,05	0,31
DL5, 30	6,90	6,96	6,46	6,74	6,72	0,25
DL7, 0	5,01	4,43	4,38	4,33	4,38	0,05
DL7, 6	x	4,67	4,68	4,74	4,70	0,04
DL7, 12	5,90	5,04	5,10	5,05	5,06	0,03
DL7, 24	6,96	4,98	5,07	4,92	4,99	0,08
DL7, 10	6,41	<100	<1 '	2,96	0,99	1,71
DL7, 20	6,12	<1 '	<1 '	<1 '	0,00	0,00
DL7, 30	4,52	<1 '	<1 '	<1 '	0,00	0,00
Y1, 0	2,34	2,58	1,85	/	2,26	0,37
Y1, 2	*	4,16	3,58	/	3,87	0,41
Y1, 4	*	>5,48	5,65	/	5,65	
Y1, 6	*	*	6,71	/	6,71	
Y1, 10	>6,48	7,44	6,82	/	7,13	0,44
Y1, 20	6,97	6,95	6,85	/	6,92	0,06
Y1, 30	6,16	6,38	6,61	/	6,38	0,23
Y2, 0	4,20	4,30	4,37	/	4,29	0,09
Y2, 2	4,30	4,53	4,58	/	4,47	0,15
Y2, 4	4,18	3,81	3,74	/	3,91	0,24
Y2, 6	<100 'L	<100 'L	<1000 'L	/	0,00	0,00
Y2, 10	<10000 'L	<10000 'L	<10000 'L	/	0,00	0,00
Y2, 20	<10000 'L	<10000 'L	<1000 'L	/	0,00	0,00
Y2, 30	<1000 'L	<1000 'L	<1000 'L	/	0,00	0,00
Y4, 0	4,21	4,37	4,33	/	4,30	0,08

Vedlegg

Y4, 2	4,39	4,47	4,50	/	4,45	0,06
Y4, 4	4,44	4,49	4,64	/	4,52	0,10
Y4, 6	4,46	5,54	4,44	/	4,81	0,63
Y4, 10	<1 '	<1 '	<10 '	/	0,00	0,00
Y4, 20	<1 '	<1 '	<1 '	/	0,00	0,00
Y4, 30	<1 '	<1 '	<1 '	/	0,00	0,00
Y5, 0	4,31	4,71	4,22	/	4,41	0,26
Y5, 2	4,86	4,32	4,79	/	4,66	0,29
Y5, 4	5,58	5,53	5,52	/	5,54	0,03
Y5, 6	6,92	6,72	6,69	/	6,78	0,13
Y5, 10	6,48	6,80	4,54	/	5,94	1,22
Y5, 20	5,33	6,03	4,68	/	5,35	0,68
Y5, 30	4,88	5,93	3,46	/	4,76	1,24
Y7, 0	4,30	4,52	4,32	/	4,38	0,12
Y7, 2	4,87	4,29	4,57	/	4,58	0,29
Y7, 4	4,52	4,56	4,49	/	4,52	0,04
Y7, 6	4,47	4,49	4,45	/	4,47	0,02
Y7, 10	<1 '	<1 '	<10 '	/	0,00	0,00
Y7, 20	<1 '	<1 '	<1 '	/	0,00	0,00
Y7, 30	<1 '	<1 '	<1 '	/	0,00	0,00

/ Ikke analysert.

* Overgrodd.

x Tatt ut pga dårlige paralleller.

' kdc/ml.

L For mange lilla kolonier for å kunne observere noen blanke kolonier.

Tabell 4. Melkesyre bakterier (log kde/ml) ved alle forsøksrundene i hovedforsøk med DL-kultur og med yoghurtkultur, samt gjennomsnitt og standardavvik.

	Forsøksrunde 1 (log kde/ml)	F.runde 2 (log kde/ml)	F.runde 3 (log kde/ml)	F.runde 4 (log kde/ml)	Gjennomsnitt (log kde/ml)	Standardavvik
DL1, 0	3,60	3,18	4,57	4,83	4,19	0,89
DL1, 6	3,50	3,55	5,04	5,38	4,66	0,97
DL1, 12	3,60	4,78	5,95	>5,48	5,37	0,83
DL1, 24	6,89	6,86	>6,48	>6,48	6,86	
DL1, 10	>7,48	8,30	8,57	8,40	8,42	0,14
DL1, 20	>8,48	8,58	8,56	8,58	8,57	0,01
DL1, 30	>8,48	8,40	8,43	8,39	8,41	0,02
DL3, 0	5,81	7,11	7,19	7,35	7,22	0,12
DL3, 6	6,32	7,86	7,69	7,97	7,84	0,14
DL3, 12	7,48	8,66	8,70	8,74	8,70	0,04
DL3, 24	8,72	8,74	8,75	8,77	8,75	0,02
DL3, 10	8,51	8,04	7,61	7,83	7,83	0,22
DL3, 20	8,48	7,40	7,32	7,40	7,37	0,05
DL3, 30	8,35	7,39	7,09	7,33	7,27	0,16
DL4, 0	5,81	7,17	7,22	7,32	7,24	0,08
DL4, 6	6,60	8,01	7,95	8,05	8,00	0,05
DL4, 12	7,84	8,80	8,78	8,80	8,79	0,01
DL4, 24	8,74	8,95	8,77	8,87	8,86	0,09
DL4, 10	8,69	8,21	7,96	7,62	7,93	0,30
DL4, 20	8,51	7,44	7,44	7,45	7,44	0,01
DL4, 30	8,16	7,44	7,30	7,33	7,36	0,07
DL6, 0	5,43	7,09	7,28	7,44	7,27	0,18
DL6, 6	6,62	7,85	8,09	7,95	7,96	0,12
DL6, 12	7,99	8,58	8,77	8,78	8,71	0,11
DL6, 24	8,90	8,23	8,81	8,80	8,61	0,33
DL6, 10	8,31	8,06	7,99	8,07	8,04	0,04
DL6, 20	8,25	7,50	7,63	7,60	7,58	0,07
DL6, 30	8,24	7,53	7,65	7,63	7,60	0,06
DL7, 0	5,90	7,29	7,28	7,53	7,37	0,14
DL7, 6	6,90	8,10	8,19	8,13	8,14	0,05
DL7, 12	8,05	8,82	8,81	8,79	8,81	0,02
DL7, 24	9,05	8,78	8,81	8,80	8,80	0,02
DL7, 10	8,49	7,86	8,10	8,16	8,04	0,16
DL7, 20	8,14	7,36	7,53	7,71	7,53	0,18
DL7, 30	7,87	7,34	7,60	7,60	7,51	0,15
Y1, 0	5,27	5,43	4,23	/	4,98	0,65
Y1, 2	>5,48	>5,48	4,74	/	4,74	
Y1, 4	*	>6,48	6,09	/	6,09	
Y1, 6	*	7,57	6,95	/	7,26	0,44
Y1, 10	7,47	7,52	7,43	/	7,47	0,05
Y1, 20	8,08	7,92	7,67	/	7,89	0,21
Y1, 30	8,11	7,90	7,73	/	7,91	0,19
Y3, 0	7,84	7,84	7,70	/	7,79	0,08
Y3, 2	8,81	9,03	8,79	/	8,88	0,13
Y3, 4	9,03	9,14	9,11	/	9,09	0,06
Y3, 6	9,06	9,12	9,12	/	9,10	0,03
Y3, 10	8,98	9,03	9,06	/	9,02	0,04
Y3, 20	8,91	9,04	9,10	/	9,02	0,10
Y3, 30	9,08	9,05	9,07	/	9,07	0,02

Vedlegg

Y4, 0	7,77	7,91	7,76	/	7,81	0,08
Y4, 2	8,83	8,97	8,78	/	8,86	0,10
Y4, 4	9,06	9,10	9,10	/	9,09	0,02
Y4, 6	9,08	9,13	9,12	/	9,11	0,03
Y4, 10	8,96	8,96	8,99	/	8,97	0,02
Y4, 20	9,07	8,95	9,07	/	9,03	0,07
Y4, 30	9,00	8,78	8,97	/	8,92	0,12
Y6, 0	7,85	7,78	7,63	/	7,75	0,11
Y6, 2	8,95	8,80	8,76	/	8,84	0,10
Y6, 4	9,13	9,04	9,04	/	9,07	0,05
Y6, 6	9,06	9,03	9,11	/	9,07	0,04
Y6, 10	9,03	8,91	9,03	/	8,99	0,07
Y6, 20	9,11	8,97	9,07	/	9,05	0,07
Y6, 30	9,06	8,95	9,04	/	9,02	0,06
Y7, 0	7,95	7,80	7,83	/	7,86	0,08
Y7, 2	9,00	8,79	8,85	/	8,88	0,11
Y7, 4	9,20	9,06	9,06	/	9,11	0,08
Y7, 6	9,10	9,03	9,12	/	9,08	0,05
Y7, 10	9,06	8,02	9,09	/	8,72	0,61
Y7, 20	9,13	8,94	9,00	/	9,02	0,10
Y7, 30	9,09	8,88	9,00	/	8,99	0,11

/ Ikke analysert.

* Overgrodd.

Tabell 5. pH ved alle forsøksrundene i hovedforsøk med DL-kultur og med yoghurtkultur, samt gjennomsnitt og standardavvik.

	Forsøksrunde 1	F.runde 2	F.runde 3	F.runde 4	Gjennomsnitt	Standardavvik
DL1, 0	6,66	6,66	6,78	6,77	6,74	0,07
DL1, 6	6,39	6,70	6,78	6,72	6,73	0,04
DL1, 12	6,74	6,72	6,78	6,69	6,73	0,05
DL1, 24	6,72	6,67	6,78	6,68	6,71	0,06
DL1, 240	6,17	6,14	6,15	6,13	6,14	0,01
DL1, 480	5,64	5,49	5,54	5,91	5,65	0,23
DL1, 720	4,99	5,64	5,21	5,81	5,55	0,31
DL2, 0	6,65	6,70	6,76	6,73	6,73	0,03
DL2, 6	6,70	6,71	6,76	6,74	6,74	0,03
DL2, 12	6,75	6,72	6,79	6,74	6,75	0,04
DL2, 24	6,73	6,53	6,86	6,66	6,68	0,17
DL2, 240	6,10	6,05	6,18	5,96	6,06	0,11
DL2, 480	5,50	5,54	5,85	5,92	5,77	0,20
DL2, 720	4,94	5,17	5,31	5,56	5,35	0,20
DL3, 0	6,70	6,70	6,78	6,77	6,75	0,04
DL3, 6	6,69	6,50	6,57	6,38	6,48	0,10
DL3, 12	6,63	5,57	5,64	5,30	5,50	0,18
DL3, 24	6,07	4,51	4,56	4,54	4,54	0,03
DL3, 240	5,06	4,43	4,55	4,50	4,49	0,06
DL3, 480	4,77	4,45	4,56	4,56	4,52	0,06
DL3, 720	4,60	4,49	4,56	4,56	4,54	0,04
DL4, 0	6,64	6,67	6,79	6,70	6,72	0,06
DL4, 6	6,44	6,45	6,50	6,40	6,45	0,05
DL4, 12	6,61	5,38	5,52	5,31	5,40	0,11
DL4, 24	5,92	4,48	4,57	4,50	4,52	0,05
DL4, 240	4,99	4,43	4,57	4,46	4,49	0,07
DL4, 480	4,70	4,44	4,51	4,52	4,49	0,04
DL4, 720	4,57	4,47	4,50	4,49	4,49	0,02
DL5, 0	6,64	6,67	6,71	6,70	6,69	0,02
DL5, 6	6,63	6,71	6,77	6,72	6,73	0,03
DL5, 12	6,72	6,72	6,76	6,73	6,74	0,02
DL5, 24	6,69	6,56	6,86	6,69	6,70	0,15
DL5, 240	6,65	6,63	6,75	6,50	6,63	0,13
DL5, 480	6,67	6,65	6,62	6,66	6,64	0,02
DL5, 720	6,49	6,60	6,70	6,69	6,66	0,06
DL6, 0	6,68	6,66	6,71	6,69	6,69	0,03
DL6, 6	6,64	6,47	6,41	6,34	6,41	0,07
DL6, 12	6,55	5,39	5,38	5,17	5,31	0,12
DL6, 24	5,51	4,54	4,60	4,54	4,56	0,03
DL6, 240	4,92	4,42	4,51	4,47	4,47	0,05
DL6, 480	4,96	4,45	4,53	4,54	4,51	0,05
DL6, 720	4,66	4,50	4,51	4,51	4,51	0,01
DL7, 0	6,63	6,64	6,70	6,67	6,67	0,03
DL7, 6	6,67	6,27	6,30	6,33	6,30	0,03
DL7, 12	6,52	5,05	5,24	5,27	5,19	0,12
DL7, 24	5,27	4,50	4,58	4,51	4,53	0,04
DL7, 240	4,70	4,43	4,55	4,48	4,49	0,06
DL7, 480	4,71	4,46	4,49	4,50	4,48	0,02
DL7, 720	4,62	4,48	4,50	4,49	4,49	0,01
Y1, 0	6,67	6,76	6,68	/	6,70	0,05
Y1, 2	6,63	6,71	6,63	/	6,66	0,05

Vedlegg

Y1, 4	6,57	6,67	6,73	/	6,66	0,08
Y1, 6	6,62	6,59	6,61	/	6,61	0,02
Y1, 240	6,38	6,35	6,30	/	6,34	0,04
Y1, 480	6,08	6,13	6,19	/	6,13	0,06
Y1, 720	5,95	6,15	6,15	/	6,08	0,12
Y2, 0	6,67	6,75	6,70	/	6,71	0,04
Y2, 2	6,61	6,71	6,62	/	6,65	0,06
Y2, 4	6,57	6,70	6,64	/	6,64	0,07
Y2, 6	6,56	6,64	6,60	/	6,60	0,04
Y2, 240	6,40	6,38	6,37	/	6,38	0,02
Y2, 480	6,29	6,12	6,19	/	6,20	0,09
Y2, 720	5,91	6,04	6,21	/	6,05	0,15
Y3, 0	6,67	6,75	6,71	/	6,71	0,04
Y3, 2	5,52	5,55	5,68	/	5,58	0,09
Y3, 4	4,58	4,65	4,71	/	4,65	0,07
Y3, 6	4,43	4,43	4,44	/	4,43	0,01
Y3, 240	4,40	4,44	4,46	/	4,43	0,03
Y3, 480	4,41	4,38	4,44	/	4,41	0,03
Y3, 720	4,42	4,43	4,43	/	4,43	0,01
Y4, 0	6,68	6,75	6,70	/	6,71	0,04
Y4, 2	5,58	5,43	5,72	/	5,58	0,15
Y4, 4	4,61	4,61	4,74	/	4,65	0,08
Y4, 6	4,40	4,42	4,43	/	4,42	0,02
Y4, 240	4,37	4,42	4,43	/	4,41	0,03
Y4, 480	4,45	4,42	4,43	/	4,43	0,02
Y4, 720	4,43	4,40	4,43	/	4,42	0,02
Y5, 0	6,75	6,76	6,77	/	6,76	0,01
Y5, 2	6,27	6,70	6,71	/	6,56	0,25
Y5, 4	6,68	6,70	6,69	/	6,69	0,01
Y5, 6	6,70	6,72	6,65	/	6,69	0,04
Y5, 240	6,58	6,60	6,65	/	6,61	0,04
Y5, 480	6,68	6,68	6,71	/	6,69	0,02
Y5, 720	6,66	6,68	6,72	/	6,69	0,03
Y6, 0	6,76	6,75	6,76	/	6,76	0,01
Y6, 2	5,47	5,70	5,62	/	5,60	0,12
Y6, 4	4,65	4,76	4,74	/	4,72	0,06
Y6, 6	4,44	4,50	4,51	/	4,48	0,04
Y6, 240	4,39	4,51	4,53	/	4,48	0,08
Y6, 480	4,41	4,44	4,49	/	4,45	0,04
Y6, 720	4,44	4,47	4,47	/	4,46	0,02
Y7, 0	6,75	6,75	6,76	/	6,75	0,01
Y7, 2	5,49	5,63	5,69	/	5,60	0,10
Y7, 4	4,67	4,75	4,75	/	4,72	0,05
Y7, 6	4,47	4,47	4,45	/	4,46	0,01
Y7, 240	4,38	4,45	4,48	/	4,44	0,05
Y7, 480	4,45	4,48	4,47	/	4,47	0,02
Y7, 720	4,43	4,45	4,47	/	4,45	0,02

/ Ikke analysert.