



Forord

Denne oppgaven er utformet som avsluttende del av 2-årig masterprogram i matvitenskap ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU). Den praktiske delen av arbeidet med oppgaven ble utført ved matforskningsinstituttet Nofima AS, Ås, i perioden januar til mai 2015.

Først og fremst en stor takk til seniorforsker og hovedveileder ved Nofima AS, Dr. Askild Holck og medveileder post doc., Dr. Anette McLeod for god og støttende veiledning gjennom hele prosessen. Setter utrolig stor pris på all hjelp, godt humør og ikke minst for den gode hjelpen til korrekturlesning av oppgaven.

Spesielt takk til laboratorieingeniør Signe M. Drømtoep for opplæring og mye god hjelp på laboratoriet. Takk til også sensorisk dommerpanel ved Nofima for sensorisk produktvurdering og alle som tok seg tid til å delta på forbrukertest, samt alle ansatte ved mikrobiologisk avdeling.

Takk til professor Helge Holo som veileder ved NMBU.

Til slutt vil jeg takke alle mine medstudenter og nye venner for å ha bidratt til å gjøre tiden på Nofima til en veldig hyggelig tid.

Ås, 15. mai 2015

Birgitte Vikrem

Sammendrag

Mattrygghet og kvalitetssikring av ferske fjørfeprodukter byr i dag på flere utfordringer innen fjørfeindustrien. Mikrobiologiske krav skaper stadig større behov for utvikling av nye metoder for forbedret produktkvalitet, og bruken av ultrafiolett (UV) belysning ved dekontaminering har de senere år blitt møtt med en økende interesse.

Formålet med denne oppgaven var å se hvordan UV-lys kan påvirke mikrobiologisk flora forbundet med fersk, skinnfri kyllingfilet. Ved å belyse kyllingprøver med kontinuerlig UVC-lys og puls UV-lys ble reduksjon i antall tilsatte bakterier undersøkt. Antibiotikaresistente mutantstammer av forringelsesbakteriene *Carnobacterium divergens* og *Pseudomonas spp.*, samt ESBL-produserende *Escherichia coli*, ble tilsatt kyllingprøver benyttet i belsningsforsøkene. Prøver ble belyst med kontinuerlig UVC-lys i 5, 10 og 30 sekunder, samt 1 og 5 minutter, ved bølgelengde 253,7 nm og lysintensitet 10 mW/cm². Prøver belyst med puls UV-lys ble utsatt for ulike UV-doser mellom 1,6-18,0 J/cm². Ingen store forskjeller mellom belsningsmetodene ble observert ut ifra størrelsen på bakteriedrapet, og generell reduksjon for alle bakterieartene lå mellom 1,0-3,0 log CFU/cm² kyllingfilet. Resultatene indikerte god drapseffekt uavhengig av UV-dose, hvor økt dose ga lite økning i antall log-reduksjoner. Eventuelle endringer i kvalitet og sensoriske produkttegenskaper som følge av belsningen ble vurdert av et profesjonelt sensorisk dommerpanel og ved en mindre forbrukertest. Belyste kyllingfileter viste kun lav indikasjon på endring i sensoriske egenskaper og produktkvalitet når filetene ble utsatt for de største UV-dosene. Forbrukerne klarte ikke å skille mellom belyste og ubelyst kyllingprøver.

Belysning med kontinuerlig UVC og puls UV-lys viste seg å være raske, enkle og effektive metoder for reduksjon i bakterietall av *C. divergens*, *Pseudomonas spp.* og ESBL-produserende *E. coli*. Metodene medførte kun marginale endringer i sensoriske egenskaper.

Abstract

Food safety and quality assurance of fresh poultry products involves several challenges in today's poultry industry. Microbial requirements have created increased demands in the development of new methods for improved product quality. In recent years, the use of ultraviolet (UV) light as a decontamination method has been met with increasing interest.

The aim of this thesis was to investigate the effect of UV light on microbial flora associated with fresh, skinless chicken fillets. By illuminating chicken samples with continuous UVC light and pulsed UV light, reductions in the number of added bacteria were examined. Antibiotic resistant mutant strains of the spoilage bacteria *Carnobacterium divergens* and *Pseudomonas spp.*, were in addition to ESBL producing *Escherichia coli* added to chicken fillets in the UV experiments. In the continuous UVC light experiments, samples were exposed for 5, 10 and 30 seconds and 1 and 5 minutes, at a wavelength of 253,7 nm and intensity 10 mW/cm². Samples illuminated with pulsed UV light were exposed to different UV doses between 1,6 and 18,0 J/cm². No major differences between the applied illuminating methods were observed in relation to the number of bacterial reductions. The general reductions for all bacterial species were in the range between 1,0-3,0 logs CFU/cm² chicken fillet. The results indicated good killing effect regardless of UV dose used, and increasing dose gave only minor increase in the number of log reductions. Changes in the quality or sensory properties as a result of illumination were assessed by a professional sensory panel and by a smaller consumer test. Only minor changes in sensory properties and product quality could be noticed when the fillets were exposed to the highest doses. The consumers could not differentiate the illuminated chicken samples from an untreated control sample.

Experiments showed that illumination using continuous UVC and pulsed UV light were effective, quick and easy methods for reducing bacterial counts of *C. divergens*, *Pseudomonas spp.* and ESBL producing *E. coli*. The methods resulted in only marginal changes in sensory properties.

Innholdsfortegnelse

1.0 Innledning	s 9
2.0 Bakgrunn	s 10
2.1 Mikrobiologi og kvalitetsforringelse	s 10
2.1.1 <i>Carnobacterium</i>	s 11
2.1.2 <i>Pseudomonas</i>	s 12
2.1.3 <i>Brochothrix</i>	s 13
2.2 Antibiotikaresistente bakterier på kylling	s 15
2.2.1 ESBL-produserende <i>Escherichia coli</i>	s 15
2.3 Mikrobiologiske analyser og molekylære metoder	s 17
2.3.1 Bioscreen-analyse	s 17
2.3.2 Polymerase Chain Reaction	s 17
2.3.3 16S rDNA-sekvensering	s 18
2.4 Ultrafiolett lys som desinfeksjonsmetode	s 19
2.5 Produktvurdering	s 20
3.0 Materialer og metoder	s 21
3.1 Forsøksoversikt	s 21
3.2 Bakterier og stammer	s 23
3.3 Vekstbetingelser og oppdyrking av bakterier	s 24
3.3.1 Tillaging av antibiotikaresistente bakteriestammer	s 25
3.4 Bioscreen-analyse	s 27
3.5 PCR og 16S rDNA-sekvensering	s 28
3.5.1 PCR – gjennomførelse og betingelser	s 28
3.5.2 Gel-elektroforese og rensing av PCR-produkt	s 29
3.5.3 Innmerking av PCR-produkt og 16S rDNA-sekvensering	s 30
3.6 UV-belysning av kyllingfilet og agarskåler	s 31
3.6.1 Forsøksprosedyre	s 31
3.6.2 Belysningsforsøk med kontinuerlig UVC-lys	s 33
3.6.3 Belysningsforsøk med puls UV-lys	s 34

3.7 Belysningsforsøk av kylling til sensorisk produktvurdering og forbrukertest	s 35
4.0 Resultater	s 37
4.1 Kontroll av antibiotikaresistente mutantstammer	s 37
4.2 UV-belysning av kyllingfilet og agarskåler	s 39
4.2.1 Belysningsforsøk med kontinuerlig UVC-lys	s 39
4.2.2 Belysningsforsøk med puls UV-lys	s 43
4.2.3 Temperaturendringer under UV-belysning	s 47
4.2.4 Bakgrunnsflora på kylling	s 47
4.3 Profesjonell sensorisk produktvurdering og forbrukervurdering av belyst og ubelyst kyllingfilet	s 48
5.0 Diskusjon	s 51
5.1 Antibiotikaresistente stammer	s 51
5.2 UV-belysning reduserte bakterietall på fersk kyllingfilet	s 52
5.3 Produktvurderinger av UV-belyste kyllingfileter	s 56
5.4 Konklusjon og videre arbeid	s 58
6.0 Referanser	s 59

4 Vedlegg

Forkortelser

β	Beta
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony-forming units
cMRS	Cystein-de Man, Rogosa and Shape
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESBL	Extended spectrum beta-laktamase
F	Forward
FDA	Food and Drug Administration
OD	Optical density (optisk tetthet)
ON	Over natt
PCR	Polymerase chain reaction
R	Reverse
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
spp.	Species (arter)
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultra violet (ultrafiolett)
vt	Villtype

1.0 Innledning

Markedet for kyllingkjøtt og prosesserte kyllingprodukter har på verdensbasis økt betraktelig i de senere år. Siden 1960-tallet har økningen i konsum vært betydelig, noe som hovedsakelig skyldes lavere produksjonskostnader som igjen har ført til større produksjon, samt utvikling av flere og varierte prosesserte fjørfeprodukter. I tillegg til en mer effektivisert fjørfeoppdrettsnæring, har fokuset på helsemessige fordeler ved inntak av hvitt fjørfekjøtt kontra rødt storfekjøtt blitt betraktelig større (Keklik et al., 2010). Kyllingkjøtt er ernæringsmessig gunstig da det er magert og proteinrikt, samtidig som innholdet av flerumettede fettsyrer er relativt høyt (Krishnan et al., 2014).

I Norge var inntaket av fjørfekjøtt i 2013 beregnet til 10,3 kg pr innbygger, en økning på 12,6 % fra året før. Det totale kjøttforbruket har de siste årene hatt en svak økning som følge av økt forbruk av fjørfekjøtt, samtidig som konsumet av rødt kjøtt har gått ned (Animalia, 2014). Som resultat av et økende forbruk av kylling- og fjørfeprodukter har også fokuset på mattrygghet og mikrobielle utfordringer blitt større. Ferskt kyllingkjøtt er et meget skjørt produkt da det er lett utsatt for mikrobiell kontaminering både under og etter produksjon og lagring. Oppblomstring av forringelsesflora og sykdomsfremkallende (patogene) mikroorganismer på ferske fjørfeprodukter, er for produsentene et stort økonomisk problem som fører til stadig utvikling av nye metoder for å forbedre produktkvaliteten. Generell mattrygghet og kvalitetssikring av produktene er en stor utfordring for fjørfeindustrien (Krishnan et al., 2014).

I denne oppgaven har formålet vært å se hvordan ultrafiolett (UV) lys kan påvirke mikrobiologisk flora normalt forbundet med fersk, skinnfri kyllingfilet. Hovedfokuset var å øke mattrygghet og forlenge produktholdbarhet ved å redusere kvalitetsforringende mikroorganismer ved bruk av ulike doser UV-lys. I oppgaven ble kyllingfiletene tilsatt aktuelle forringelsesbakterier og UV-belyst ved bestemte betingelser, hvor noen fileter ble pakket og lagret for profesjonell sensorisk vurdering og for en mindre forbrukertest. Ved undersøkelse av reduksjon i antall bakterier ble det benyttet både kontinuerlig UVC-lys og puls UV-lys.

2.0 Bakgrunn

2.1 Mikrobiologi og kvalitetsforringelse

Kyllingfilet og andre typer kjøtt anses som risikoprodukter blant matvareproduktene i dagens marked. Kjøttets kjemiske sammensetning av lett tilgjengelige næringsstoffer, høyt vanninnhold og pH-verdi (5,5-6,5) medfører gode vekstbetingelser for oppblomstring av ulike mikroorganismer om disse skulle være tilstede. Mikrobiell vekst av forringelsesflora kan føre til dannelse og nedbrytning av diverse komponenter som igjen endrer produktets sensoriske egenskaper, og gjør kjøttet både uegnet og lite tiltalende for menneskelig konsum. Resultatet fra mikrobenes metabolisme fører spesielt til endring i kjøttets tekstur og farge, samt dannelse av ulike lukt- og smaksstoffer. De mest vanligste stoffene som dannes under lagring av kjøtt er flyktige organiske komponenter som ofte kan være uønsket. Dette inkluderer alkoholer, aldehyder, ketoner, frie fettsyrer, estere og svovelforbindelser (Casaburi et al., 2015; Doulgeraki et al., 2012; Remenant et al., 2015). De organiske komponentene medfører gjerne illeluktende odør samt ødeleggelse av vakuumpakkede produkter ved oppblåste pakninger som følge av gassdannelse. Produksjon av slim eller væskedannelse er også kvalitetsforringelser som kan skje på grunn av mikrobiell aktivitet (Remenant et al., 2015).

Basert på kunnskap rundt noen kjemiske og fysiske parametere er det mulig å forutse hvilke mikroorganismer som vil vokse og dominere under lagring av kjøtt. For at ulike mikroorganismer skal bidra til forringelse av et produkt, er situasjonen avhengig av lagringsbetingelsene og produktets mikrobielle sammensetning. Temperatur og emballasjens gassatmosfære er noen av de viktigste faktorene når det kommer til mikrobiell vekst og seleksjon, siden atmosfære med lav oksygenkonsentrasjon med eller uten tilstedeværelse av antimikrobiell gass vil føre til dominans av fakultativt, eller obligat anaerobe Gram-positive bakterier. Kjøtt lagret aerobt og/eller under høyere oksygentrykk vil gi grobunn for aerobe eller fakultativ anaerobe Gram-negative bakterier, men forhøyet oksygentrykk kan igjen virke veksthemmende. Bakterieslekter som oftest har blitt isolert fra ferskt kjøtt lagret ved lave temperaturer, regnes som psykotrofe og inkluderer *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, samt ulike slekter av familien *Enterobacteriaceae*. Melkesyrebakterier, deriblant inkludert

Carnobacterium, er også en meget vanlig del av kjøttets mikroflora. Arter som spesielt hyppig går igjen blant forringelsesorganismene funnet på kjølelagret kjøtt er *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* og *C. maltaromaticum*, samt flere *Pseudomonas*-arter. *B. thermosphacta*, de forannevnte *Carnobacterium*-artene, pluss *Pseudomonas fragi* er alle bakterier som har blitt isolert fra rått kjøtt lagret enten aerobt, pakket i modifisert atmosfære eller vakuum (Casaburi et al., 2015; Doulgeraki et al., 2012).

Mikroorganismer som ofte forbindes med ferskt kyllingkjøtt er *Acinetobacter*, *Carnobacterium*, *Pseudomonas*, *Brochothrix* og *Weissella*. Disse bakterieslektene vokser relativt raskt ved lave temperaturer, og har i tillegg til flere gjærarter stor innvirkning på holdbarhetstiden til ferske fjørfeprodukter (Davies and Board, 1998). I forbindelse med forringelse av kyllingkjøtt lagret kjølig under aerobe forhold, har det i senere tid vist seg at *Carnobacterium* også er en meget viktig og dominant del av forringelsesfloraen slik som *Pseudomonas*. Den siste bakteriearten som i tillegg er en dominerende forringelsesbakterie på kylling er også her *B. thermosphacta* (Liang et al., 2012).

2.1.1 *Carnobacterium*

Slekten *Carnobacterium* er en gruppe melkesyrebakterier hovedsakelig isolert fra kjølige og vandige omgivelser. Listen med definerte arter innen slekten er stadig under utvikling, men de to viktigste artene som oftest isoleres fra mat og naturlige omgivelser er *C. divergens* og *C. maltaromaticum*. Hyppige kilder for disse to artene er spesielt kjøtt og kjøttprodukter, fjørfe, meieriprodukter, samt fisk og diverse sjømatprodukter (Laursen et al., 2005; Leisner et al., 2007).

Artene innen *Carnobacterium*-slekten er Gram-positive, katalase- og oxidase-negative, samt ikke-sporedannende staver (Jöborn et al., 1999). *Carnobacterium* ble tidligere antatt som en del av slekten *Lactobacillus*, men ble på slutten av 1980-tallet klassifisert som en ny bakterieslekt. Likhetstrekkene med *Lactobacillus* er flere, men carnobakteriene skiller seg ut ved den manglende evnen til å vokse ved pH 4,5 eller på medium inneholdende acetat (Collins et al., 1987; Davies and Board, 1998; Jöborn et al., 1999). Carnobakteriene vokser best ved høyere pH-verdier, spesielt ved pH 7-9 (Davies and Board, 1998).

Carnobacterium vokser godt ved lave temperaturer, tåler fryselagring og opptining, samt er tolerante ovenfor eksponering for høyt trykk. Bakterieartene er aerotolerante og anaerob med evne til å vokse ved forhøyede CO₂-konsentrasjoner (Leisner et al., 2007). *C. divergens* og *C. maltaromaticum* er som nevnt to arter spesielt forbundet med mat, hvor de ofte er en dominerende del av mikrofloraen på kjølelagrede kjøtt- og sjømatprodukter, uavhengig av om produktene er lagret aerobt, pakket i vakuum eller modifisert atmosfære. Bakteriene finnes ofte naturlig på rått storfekjøtt, svin, lam og fjørfekjøtt. For å kunne forårsake forringelse av produktenes sensoriske egenskaper må antallet bakterier være over 10⁶-10⁷ colony-forming units (CFU)/g før bakterieaktiviteten er tilstrekkelig for merkbar påvirkning (Leisner et al., 2007). Selve kunnskapen rundt carnobakterienes forringelsesegenskaper og hvilke ansvarlige metabolitter som produseres er ikke fullstendig kjent (Laursen et al., 2005; Leisner et al., 2007).

2.1.2 *Pseudomonas*

Bakterieslekten *Pseudomonas* tilhører gruppen Gram-negative bakterier og består av rette eller svakt buede staver med polare flageller. *Pseudomonas* er en aerob, ikke-fermentativ bakteriegruppe som bryter ned glukose ved hjelp av respiratorisk metabolisme, under fravær av gassdannelse. Det at bakteriene ikke danner gass, i tillegg til å være oxidase-positiv, er begge karakteristiske egenskaper som gjør det lett å skille *Pseudomonas* fra andre Gram-negative bakterier, som f.eks. *Enterobacteriaceae*. *Pseudomonas* er en ikke-sporedannende organisme bestående av flere arter, deriblant noen opportunistiske og obligate patogener for dyr, mennesker og planter (Madigan et al., 2009).

Optimale vekstforhold for *Pseudomonas* er ved nøytral pH og i det mesofile samt psykrofile temperaturområdet. Området for veksttemperatur varierer noe mellom de ulike artene, f.eks. kan *P. aeruginosa* vokse opp til 43 °C, mens de fleste andre *Pseudomonas*-arter vokser best ved lavere temperaturer. Siden *Pseudomonas* har evnen til å utnytte et stort mangfold av ulike organiske komponenter som energi- og karbonkilde, er den en meget utbredt organisme med evne til vekst og kolonisering i flere ulike miljøer. Som følge av et høyt genetisk mangfold, samt metabolsk allsidighet, overlever bakteriene godt både i jord, vann, luft og mat (Madigan et al., 2009).

I forbindelse med bedervelse og kvalitetsforringelse av mat, deriblant kylling, er *Pseudomonas* en meget aktuell og dominerende mikroorganisme. De viktigste artene er her *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi* samt *P. lundensis*. Spesielt utsatte matvarer er produkter av storfekjøtt og fjørfe, samt sjømat og meierivarer (Casaburi et al., 2015; Davies and Board, 1998; Remenant et al., 2015). Ved bedervelse av kjøtt består ofte mer enn 50 % av forringelsesfloraen, og noen ganger mer enn 90 %, av disse *Pseudomonas*-artene (Davies and Board, 1998).

Mikrobeaktiviteten som starter produktets forringelsesreaksjon skyldes først og fremst bakterienes glukose- og aminosyrenedbrytning. Nedbrytningen fører til dannelse av flere flyktige, organiske komponenter som er med på å endre produktets sensoriske egenskaper (Casaburi et al., 2015; Davies and Board, 1998). Glukose forbrukes først, hvilket resulterer i dannelse av flyktige aromaforbindelser med en fruktig og søtaktig lukt, før aminosyrenedbrytningen starter og produktet får en rått og svovelaktig odør. Denne prosessen skjer når bakterietallet overstiger 10^7 CFU/cm² (Davies and Board, 1998). En annen egenskap hos *Pseudomonas* er evnen til å danne slim og biofilm, noe som ofte forekommer på kyllingkjøtt og kyllingprodukter (Remenant et al., 2015).

2.1.3 *Brochothrix*

Brochothrix er en gruppe Gram-positive, stavformede bakterier, nært beslektet til bakterieslektene *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium* og *Bacillus* (Kilcher et al., 2010). Bakterier klassifisert som *Brochothrix* er ikke-sporedannende, katalase-positive, samt ikke-bevegelige staver som kan vise karakteristiske forandringer i cellemorfologi under vekst. Bakteriene er fakultativt anaerobe med optimumstemperatur mellom 20-25 °C, men vokser fra 0 °C og opp til 30 °C. Vekst over 30 °C forekommer sjeldent (Vos et al., 2011). Favoriserende vekstforhold for utvikling av *Brochothrix* er nøytral pH, høy vannaktivitet, samt høy tilstedeværelse av komponenter med lav molekylærvekt, som frie aminosyrer og nukleotider (Remenant et al., 2015).

Innen slekten *Brochothrix* finnes to ikke-sykdomsfremkallende arter kalt *B. thermosphacta* og *B. campestris*. *B. campestris* har blitt beskrevet fra isolater fra jord og gress, mens *B.*

thermosphacta forbindes med bederelse av kjøtt og kjøttprodukter lagret ved kjøletemperaturer. Identifisering av *B. thermosphacta* har blitt gjort fra isolater fra flere forskjellige dyrearter, deriblant fjørfekjøtt og diverse kjøttprodukter basert på de ulike dyreartene (Vos et al., 2011).

B. thermosphacta er en meget sentral organisme når det kommer til bederelse av kjøtt. I tillegg til at bakteriene har evnen til å vokse ved lave temperaturer, har de egenskaper godt tilpasset for oppblomstring i kjøtt og kjøttprodukter pakket i vakuum. Atmosfæreforholdene i denne type produkt er med på å favorisere veksten av *B. thermosphacta* da bakteriene har evnen til å vokse ved lavt oksygeninnhold og ved høyt CO₂-innhold. Disse egenskapene gjør *B. thermosphacta* til en meget vanlig organisme blant den naturlige mikrofloraen som forårsaker bederelse på rent kjøtt og kjøttprodukt lagret under aerobe og anaerobe forhold (Kilcher et al., 2010; Vos et al., 2011). Veksten av *B. thermosphacta* som den dominerende forringelsesbakterien i vakuumpakkede produkt er avhengig av mengden tilgjengelig oksygen igjen i pakken, da den ellers lett utkonkurreres av *Lactobacillus*. Forringelsespotensialet til *B. thermosphacta* i vakuumpakkede produkt er derfor påvirket av oksygenkontrollerende faktorer, slikt som gasskomposisjon og plastfilmens permeabilitet (Remenant et al., 2015). Bakteriene forringer matprodukt ved at de produserer uønskede, flyktige komponenter som medfører dårlig lukt og smak. Eksempler på slike komponenter er acetoin, diacetyl, melkesyre og etanol, hvor produksjonen av de ulike stoffene er avhengig av om veksten forekommer aerobt eller anaerobt (Kilcher et al., 2010; Vos et al., 2011).

2.2 Antibiotikaresistente bakterier på kylling

Forekomsten av antibiotikaresistens blant bakterier har i nyere tid blitt et stadig økende og bekymringsfullt problem på verdensbasis. I forbindelse med fjørfe har fokuset spesielt blitt rettet mot en bestemt type antibiotikaresistente bakterier kalt ESBL (Extended Spectrum Beta (β)-laktamase)-produserende bakteriestammer. Bakterier hovedsakelig forbundet med ESBL er Gram-negative tarmbakterier, særlig registrert hos bakteriestammer av arten *Escherichia coli* (Folkehelseinstituttet, 2015; Veterinærinstituttet, 2014).

På verdensbasis har ESBL-produserende bakterier allerede fått stor utbredelse blant fjørfe. I Norge ble det i 2012 registrert ESBL-produserende *E. coli* på 32,2 % av de undersøkte kyllingfiletene via Veterinærinstituttets overvåkningsprogram NORM-VET (Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler) (Veterinærinstituttet, 2014). Den påviste frekvensen var overraskende høy, da det brukes svært lite antibiotika i norsk fjørfeproduksjon, men tallene var imidlertid ikke ulik de registrerte tilfellene gjort i Sverige og ellers i Europa. På bakgrunn av dette antas det derfor at opphavet til disse bakteriene sannsynligvis har kommet inn i den norske fjørfepopulasjonen gjennom import av avlsdyr (Hoel, 2012; Veterinærinstituttet, 2014).

2.2.1 ESBL-produserende *Escherichia coli*

E. coli er en koliform bakterieart tilhørende familien *Enterobacteriaceae* og forekommer normalt i tarmsystemet hos mennesker og andre varmblodige dyr. Bakteriene består av Gram-negative, ikke-sporedannende staver med evne til å vokse under både aerobe og anaerobe forhold. *E. coli* er en bakterie med relativt enkle næringsmessige krav, hvor optimal vekst skjer ved 37 °C. Bakteriene er oxidase-positive, samt gassproduserende ved glukosefermentering. De fleste stammene av *E. coli* forårsaker ikke sykdom hos mennesker, men virulente stammer kan blant annet føre til urinveisinfeksjoner, spesielt hos kvinner, samt alvorlig gastroenteritt som følge av toksinproduksjon (Madigan et al., 2009). Humanpatogene stammer spesielt forbundet med *E. coli*-enteritt er shigatoksinproduserende (STEC) stammer kalt enterohemoragisk *E. coli* (EHEC) (Wasteson, 2007).

ESBL-produserende *E. coli* er kolibakterier med resistens ovenfor et vidt spekter av antibiotikatyper inneholdende beta-laktam. Beta-laktam-antibiotika omfatter viktige antibakterielle midler som penicilliner og cefalosporiner som anses essensielle ved behandling av mikrobielle infeksjoner hos mennesker. Betegnelsen ESBL brukes om en gruppe enzymer kalt beta-laktamaser (Folkehelseinstituttet, 2015; Veterinærinstituttet, 2014). Disse enzymene har evnen til å bryte ned den kjemiske β -laktam-strukturen i penicilliner og fører dermed til inaktivering av antibiotikumets antimikrobielle effekt (Hoel, 2012). Genene som koder for antibiotikaresistens hos ESBL-produserende bakterier er ofte lokalisert på mobile gen-elementer, slikt som plasmider og transposoner, som gjennom horisontal genoverføring kan spres videre til andre bakterier (Folkehelseinstituttet, 2015; Hoel, 2012; Veterinærinstituttet, 2014).

Forekomst av ESBL-produserende *E. coli* er i økende grad assosiert med fjørfe. Bakteriene utgjør en naturlig del av fuglenes tarmflora og forårsaker som regel ikke sykdom hos fjørfe, men det er uvisst om, eller i hvilken grad bakteriene forårsaker sykdom hos mennesker (Campos et al., 2014; Veterinærinstituttet, 2014). Smitte av bakteriene skjer normalt gjennom fekal-oral smitte ved kontakt med kontaminerte næringsmidler eller overflater. Under selve slakteprosessen er det risiko for at det kan oppstå kontaminering mellom kjøtt og innvoller, derfor er gode hygienerutiner veldig viktige. Andre forebyggende tiltak for å unngå smitteoverføring av resistente bakterier fra fjørfekjøtt til mennesker er gjennom tilstrekkelig varmebehandling og ellers god kjøkkenhygiene (Veterinærinstituttet, 2014).

2.3 Mikrobiologiske analyser og molekylære metoder

2.3.1 Bioscreen-analyse

Ved gjennomførelse av mikrobiologiske analyser der hensikten er å måle og dokumentere cellevekst, er det effektivt å benytte optiske analyseinstrumenter for digital overvåkning. Bioscreen-C Automated Growth Curve Analysis System (Labsystems) er en analysator designet for slike mikrobiologiske tester. Cellevekst for en eller flere aktuelle mikroorganismer inkubert i vekstmedium måles etter optisk tetthet, OD (optical density), i opp til 200 mikrokulturer samtidig. Resultatene fra analysen kan blant annet vises i form av grafiske vekstkurver. Prøvene kan inkuberes i temperaturområdet 1-60 °C, samt med eller uten risting av inkubasjonsplaten (Appicciafuoco et al., 2015; Stasika-Rózańska et al., 2014).

2.3.2. Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) er en rask og nøyaktig molekylærbiologisk teknikk som har hatt stor betydning for arbeid innen molekylær kloning og genetikk. PCR gjør det mulig å amplifisere et stort antall kopier av et spesielt DNA-fragment, selv fra begrensede kilder genmateriale (Doulgeraki et al., 2012; Law et al., 2015; McPherson et al., 1995). Ved identifisering av bakterier er det ved hjelp av PCR mulig å kunne skille mellom ulike bakterier ned til artsnivå (Doulgeraki et al., 2012).

I en PCR-reaksjon starter en med et DNA-templat, en DNA-prøve inneholdende den aktuelle gensekvensen en ønsker å kopiere. Til templatet tilsettes korte deler av enkeltrådet DNA, kalt primere, som er komplementære til en liten del av DNA-templatet. Videre tilsettes enkle deoxynukleotider og enzymet DNA-polymerase som syntetiserer nye komplementære DNA-tråder fra enden av primeren ved hjelp av de frie deoxynukleotidene (McPherson et al., 1995). I en syklisk tre-trinns prosess oppamplifiseres den spesifikke gensekvensen. Første trinn er denatureringstrinnet der DNA-templatet denatureres i to enkle tråder ved at den doble tråden brytes opp som følge av høy temperatur (94 C°), og all enzymatisk aktivitet stopper. Neste trinn er hybridiseringsprosessen der primerne binder til de enkle DNA-trådene ved hjelp av hydrogenbindinger, som videre fører til gjenskapelse av den doble heliksstrukturen mellom

primer og templat. Hybridiseringstemperaturen under dette trinnet varierer avhengig av den anvendte primeren. Siste trinn i prosessen er et polymeriseringstrinn (72 °C) der de komplementære primerne forlenges. Etter endt PCR-analyse kan amplifiseringsproduktet visualiseres ved gel-elektroforese (Law et al., 2015; McPherson et al., 1995).

2.3.3.16S rDNA-sekvensering

16S rDNA-sekvensering er en meget anvendt og praktisk metode når det kommer til arbeid med bakteriell identifisering gjennom gensekvensering av de høykonserverte genene 16S rDNA (ribosomalt DNA). Disse genene er essensielle i alle bakterier og koder for en av komponentene i den lille subenheten (30S) i ribosomene. Genene er spesielt egnet for bestemmelse av slektsforhold mellom bakteriegrupper og til identifisering av arter siden de ikke lar seg påvirke av tilfeldige sekvensendringer (mutasjoner) som med tiden kan oppstå (Janda and Abbott, 2007). Teknologien rundt 16S rDNA-sekvensering har derfor blitt brukt innen bakteriell taksonomi i flere år for sammenligning av ulike isolater. Sekvenseringen skjer ved hjelp av PCR, og sekvensresultatene sammenlignes med andre tilgjengelige 16S rDNA-sekvenser i blant annet offentlig tilgjengelig databaser, som for eksempel The Ribosomal Database Project (<https://rdp.cme.msu.edu/>) for artsbestemmelse (Tewari et al., 2011). Selv om 16S rDNA-sekvenser er nyttige i arbeidet med å skille og etablere slektskap mellom bakterieslekter og veldefinerte arter, er det likevel ikke alle bakterietypene som lar seg artsbestemme ved hjelp av disse gensekvensene (Doulgeraki et al., 2012; Patel, 2001).

2.4 Ultrafiolett lys som desinfeksjonsmetode

I de senere år har teknologien rundt bruk av ultrafiolett lys og puls UV-lys innen industri og næringsmiddelprosessering blitt møtt med en stadig økende interesse. Bruk av UV-lys innen konservering blir ansett som et lovende og aktuelt alternativ til tradisjonell varmebehandling og andre kjemiske konserveringsmetoder, da UV-belysning er en mer miljøvennlig metode med høy antimikrobiell effekt (Fellows, 2009). Den klassiske UV-belysningen er definert som kontinuerlig belysning ved bruk av UVC-lys, som forekommer av kvikksølvlamper med lavt trykk, designet for å produsere energirike bølgelengder ved 254 nm. Puls UV-lys er en teknikk som benytter intense korttidspulser (million-/tusendels av et sekund) av bredspektrert lys, rikt inneholdende på bølgelengder innen UVC-området (Gómez-López et al., 2007).

UV-lys har lenge vært brukt i forbindelse med desinfeksjon, spesielt av drikkevann, prosess- og avløpsvann, samt ved overflate- og luftdesinfeksjon (Falguera et al., 2011; Luo et al., 2014). Belysning med UV-lys har i forbindelse med matproduksjon blitt brukt for motvirkning av muggvekst på overflaten av diverse brød- og bakervarer, samt for bakteriell reduksjon i flytende drikkevarer, slikt som fruktjuice og cider (Basaran et al., 2004; Fellows, 2009; Keyser et al., 2008). Det har også blitt forsket på bruk av UV-belysning i overflatebehandling av ferske produkt som kylling, fisk, melk og egg (Falguera et al., 2011). Som desinfeksjonsmetode er UV-lys lett å bruke og kan anvendes mot de fleste typer mikroorganismer. Metoden medfører ingen kjemikalierester, samtidig som nødvendig utstyr er mindre kostbart sammenlignet med andre desinfeksjonsmetoder (Luo et al., 2014). Ved belysning av faste næringsmidler gjennomtrenges produktet i begrenset dybde, noe som gjør UV-belysning best egnet for overflatebehandling (Fellows, 2009).

Ultrafiolett lys er energirikt, ikke-ioniserende lys med bølgelengder mellom 100-400 nm. Lyset deles inn i undergrupper avhengig av bølgelengdene: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm), UVC (200-280 nm) og vakuum-UV (100-200 nm). Lys definert som UVC-lys med bølgelengder mellom 240-265 nm er lyset med størst bakteriedrepende egenskaper, da lyset innehar stor fotokjemisk effekt ved disse bølgelengdene. Lyset virker bakteriedrepende ved at energi i form av fotoner absorberes av konjugerte dobbeltbindinger mellom karbonatomer i mikroorganismenes proteiner og nukleinsyrer. Dette medfører kryssbindinger mellom pyrimidin-nukleotidbasene i DNA, og resulterer i irreversible forandringer som igjen

forstyrrer cellemetabolisme, reproduksjonsevne samt reparasjonsmekanismer (Fellows, 2009). UV-lys med bølgelengder 253,7 nm har vist seg spesielt effektiv ved mikrobiell inaktivering grunnet meget høy fotonabsorpsjon ved akkurat denne bølgelengden. Potensiell reaktivering av sykdomsfremkallende bakterier kan likevel forekomme, da bakterier generelt innehar molekylære mekanismer som kompenserer for de påførte DNA- og celledskadene (Yin et al., 2015). Effekten av UV-belysningen på mikroorganismene er i tillegg avhengig av flere faktorer, slikt som art, stamme, kultur og vekstfase. Sammensetningen av produkt og hvilket næringsmiddel som belyses er også av stor betydning (Falguera et al., 2011).

Selv om UV-belysning har vist seg å være en enkel og miljøvennlig konserveringsmetode for næringsmidler, er det fortsatt behov for ytterligere kunnskap rundt denne teknologien som stadig er i utvikling. Det er manglende forståelse av hvordan produktkvalitet og ernæringsmessige egenskaper påvirkes av ulike UV-belysninger. Derfor er det viktig at produktkvalitet blir nøye vurdert når en ny metode introduseres som et trinn i en industriell produksjonsprosess. Mulig uønskede bieffekter som følge av UV-belysning kan være denaturering av vitaminer og proteiner, ødeleggelse av antioksidanter, lipidoksidasjon, fargeforandringer, samt dannelse av bismaker og aromaforbindelser (Koutchma, 2009).

2.5 Produktvurdering

For å lykkes med implementering av enhver metode som potensielt kan endre et produkt, er det viktig med både kunnskap og dokumentasjon om produktets egenskaper. Eventuelle produktforandringer som følge av nye behandlingsmetoder kan ved hjelp av sensoriske og kjemiske analyser detekteres. Profesjonelle dommerpanel trent i produktvurdering ut ifra dets sensoriske egenskaper kan kartlegge hvorvidt endringer utgjør signifikante forskjeller i produktkvaliteten. Panelet utfører beskrivende tester der produkter vurderes etter hvilke egenskaper som er mest fremtredende og beskrivende for produktene (Nofima, 2015). Forbrukertester og undersøkelser med vurdering etter preferanse, er også viktige for å kartlegge produktaksept blant forbrukere. For å oppnå sikreste resultater er det nødvendig med et stort utvalg forbrukere. Ved å spørre 75-150 forbrukere for hvert produkt som vurderes blir sjansene mindre for å overse signifikante forskjeller (Lawless and Heymann, 2010).

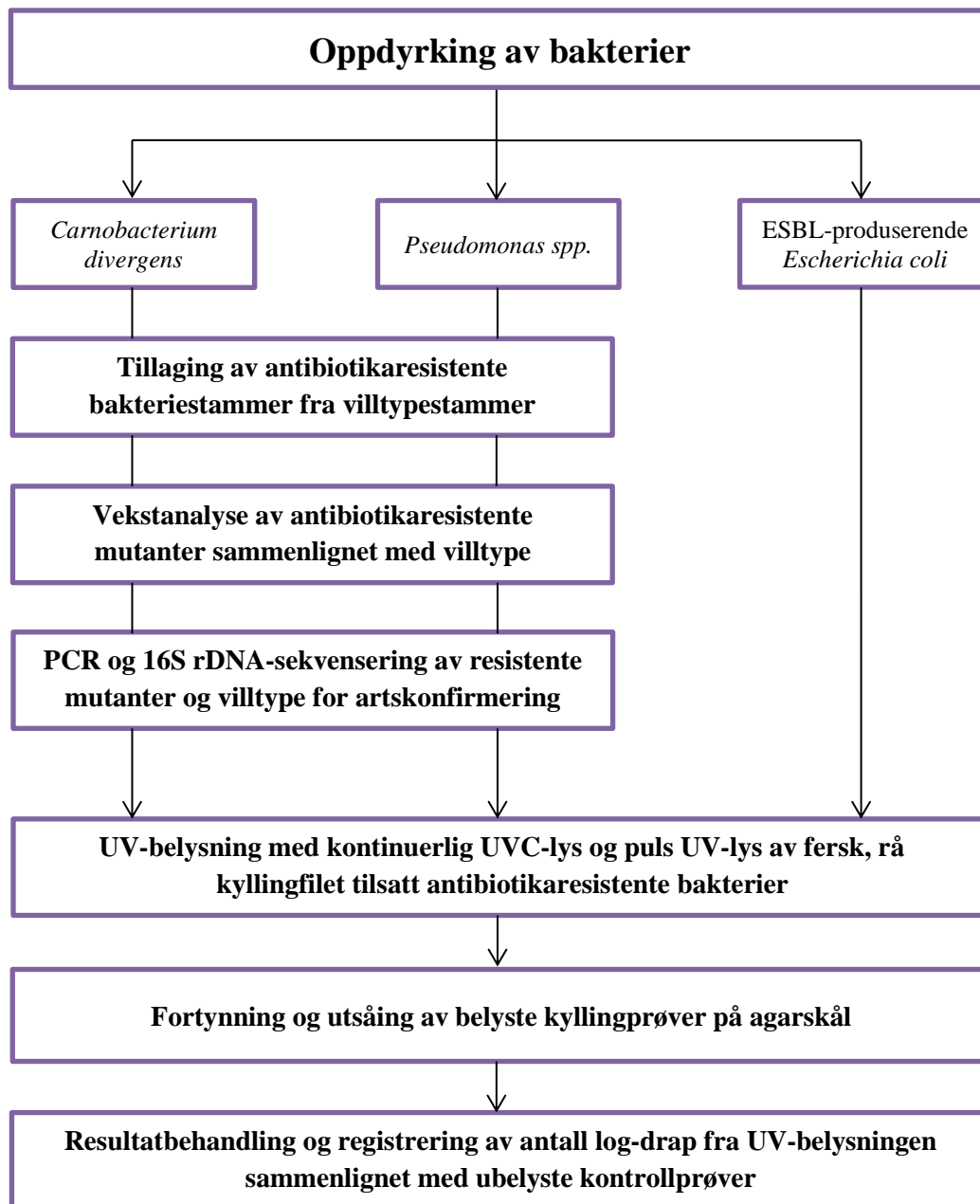
3.0 Materialer og metoder

3.1 Forsøksoversikt

En oversikt over analyser og forsøk foretatt i oppgaven er vist i figur 3.1. Det praktiske arbeidet og analysene ble utført på mikrobiologisk laboratorium og i produksjon- og pakkehall ved Nofima AS, Ås.

Utvalgte bakteriearter tilhører naturlig forringelsesflora på kylling, og for artene som ikke inneholdt naturlig antibiotikaresistens ble det selektert for resistente varianter av disse. Hensikten med dette var å kunne selektere de tilsatte bakteriene fra bakgrunnsfloraen naturlig tilstede på kylling ved å benytte medium tilsatt antibiotikum under forsøkene. Bakterienes evne til å adaptere til antibiotikumet rifampicin skyldes en punktmutasjon i RNA-polymerasegenet *rpoB*. Mutasjonen fører til endringer som gjør rifampicin ute av stand til å binde til RNA-polymerasen, og kan dermed ikke lenger forhindre bakterienes RNA-syntese (Feklistov et al., 2008).

I tillegg til UV-forsøkene gjort med antibiotikaresistente bakterier ble det også foretatt belysning av kylling uten tilsatte bakterier. Disse belysningsforsøkene ble gjort både i luft og i nitrogenatmosfære, hvor kyllingfiletene deretter ble vurdert for eventuelle endringer i sensoriske egenskaper med hovedfokus på luktdannelser.



Figur 3.1 Flytskjema over oppgavens gjennomførte forsøk og analyser.

3.2 Bakterier og stammer

Som vist i Tabell 3.1 ble tre forskjellige bakteriearter benyttet i forsøkene, fem ulike stammer av *C. divergens* og ESBL-*E. coli*, og fire stammer av *Pseudomonas*-arter. Stammene er presentert med MF-nummeret de er registrert med i stammesamlingen hos Nofima. I tillegg til forsøk med disse artene ble det gjennomført forforsøk og bioscreen-analyse med *Brochothrix thermosphacta*, men grunnet dårlig vekst for denne arten ble den ikke tatt med videre i studiet.

Tabell 3.1 Oversikt over bakterier og stammer benyttet i oppgavens forsøk.

Bakterie	Stamme (MF-nr.)	Referanse
<i>Carnobacterium divergens</i>	1976	Typestamme DSM 20623 *
	5709	Kylling, First Price
	5715	Kylling, Solvinge
	5717	Kylling, Prior
	5720	Kylling, Holte Gård
<i>Pseudomonas spp.</i>	5691	Kylling, Prior
	5702	Kylling, Holte Gård
	5704	Kylling, Holte Gård
	5724	Kylling, Solvinge
ESBL-produserende <i>Escherichia coli</i>	5658	Kyllingkjøtt (VI) **
	5660	Kyllingkjøtt (VI)
	5664	Kyllingkjøtt (VI)
	5670	Broiler (VI)
	5674	Broiler (VI)

* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

** VI = Veterinærinstituttet

3.3 Vekstbetingelser og oppdyrking av bakterier

Vekstbetingelsene som ble benyttet ved oppdyrking av de ulike bakteriene er presentert i tabell 3.2. Tabellen viser vekstmedium, inkubasjonstemperatur og -atmosfære, samt hvilket antibiotikum som ble brukt for hver enkelt art ved dyrking og adaptering til resistens. Beskrivelse av tillaging og oppskrift på medier benyttet i oppgaven er presentert i vedlegg 1. Tillagde agarskåler (med og uten tilsatt antibiotika) og vekstbuljong ble oppbevart ved 4 °C.

Tabell 3.2 Oversikt over bakterier med tilhørende vekstbetingelser og for hvilket antibiotikum de har adaptert resistens.

Bakterie	Vekstmedium	Inkubasjon*	Antibiotikum**
<i>C. divergens</i>	cMRS (cystein-de Man, Rogosa and Shape)	30 °C	Rifampicin
<i>Pseudomonas spp.</i>	TSA (Tryptic Soy Agar) TSB (Tryptic Soy Broth)	30 °C	Rifampicin
ESBL- <i>E. coli</i>	BHI (Brain Heart Infusion)	37 °C	Ampicillin

* Alle bakteriene ble dyrket aerobt

** Referanse Sigma-Aldrich, Tyskland

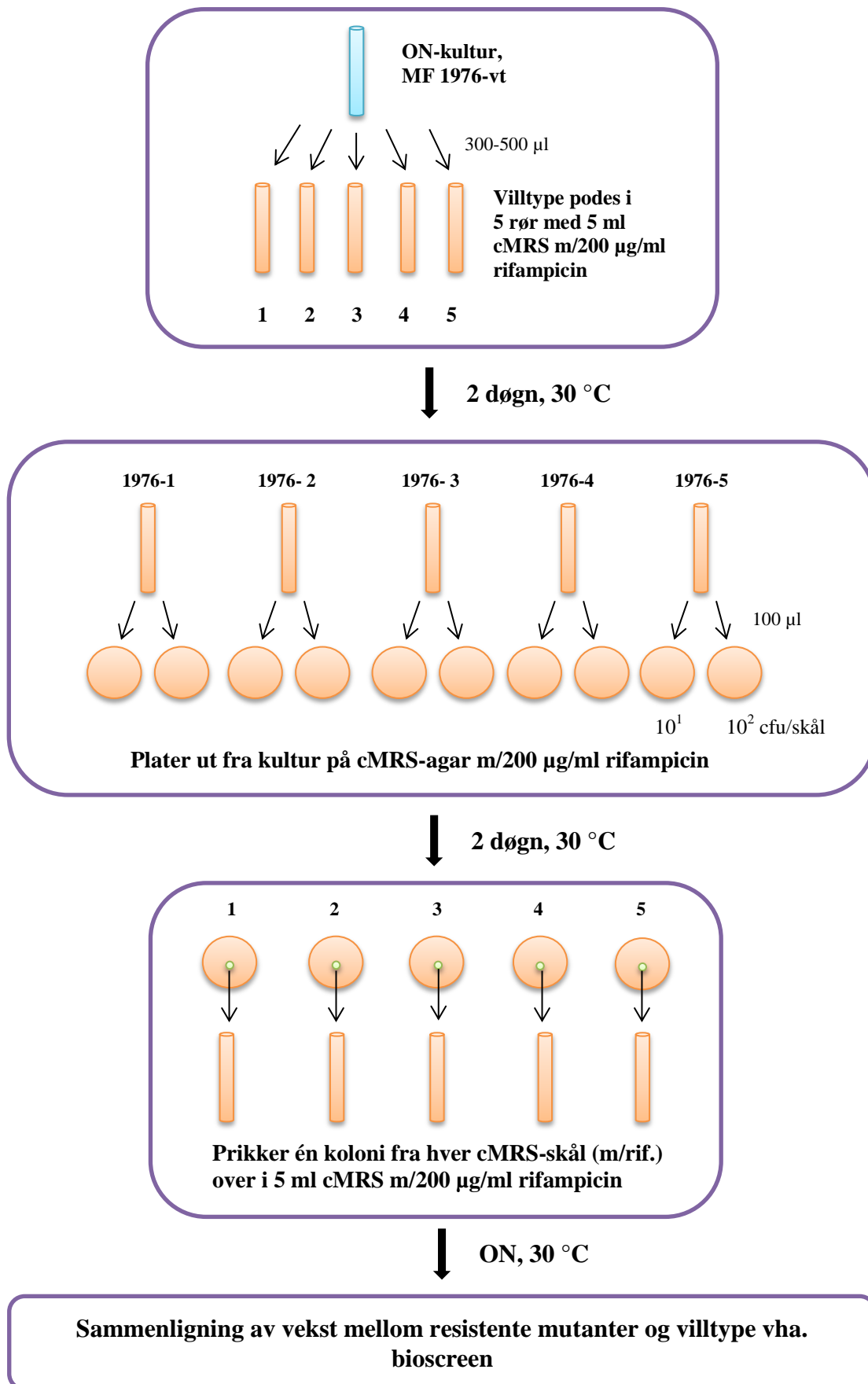
Pseudomonas og ESBL-produserende *E. coli* ble dyrket over natt (ON) både på agarskål og i buljong. *Carnobacterium*-stammene ble dyrket ON i buljong og to døgn på agarskåler. For oppbevaring av samtlige bakteriestammer ble det laget frysekulturer som ble lagret ved -20 °C i vekstmedium tilsatt 15 % steril glyserol.

3.3.1 Tillaging av antibiotikaresistente bakteriestammer

Det ble laget antibiotikaresistente mutanter av villstammene tilhørende *C. divergens* og *Pseudomonas*. Samme metode for seleksjon av resistens ble benyttet for begge artene (fem stammer av *C. divergens* og fire stammer av *Pseudomonas*). Se kapittel 3.3 for vekstbetingelser. Da ESBL-produserende *E. coli* allerede er antibiotikaresistente, var det ikke nødvendig å gjøre ytterligere tilpasninger av disse stammene.

Villstammene ble først dyrket opp på agarskål og i buljong (uten tilsatt antibiotika) over natt (ON), for å sjekke vekst og renhet av kulturene. ON-kulturene ble videre brukt til et forforsøk for å teste hvor godt disse lot seg adaptere til antibiotikumet. Under forforsøket ble det plukket enkeltkolonier fra agarskålene som ble podet over i buljong og på agarskål tilsatt rifampicin i to konsentrasjoner (100 µg/ml og 200 µg/ml) og inkubert ON. Bakteriestammene vokste raskt og med stor celletetthet i buljong og de viste rask adaptasjon i 200 µg/ml rifampicin-konsentrasjon. Ut i fra disse observasjonene ble det besluttet å bruke buljong m/200 µg/ml rifampicin som vekstmedium i tillagingen av de antibiotikaresistente stammene.

Ved tillaging av antibiotikaresistente mutanter ble det podet 300-500 µl ON-kultur av hver villstamme over i reagensrør inneholdende buljong tilsatt 200 µg/ml rifampicin. For hver villstamme ble det totalt laget 5 parallelle rør. Vekst etter inkubasjon indikerte dannelse av rifampicin-resistente mutanter, men det var stor sannsynlighet for størst konsentrasjon av en type mutant i hvert rør, da den sterkeste vil dominere veksten. Hver av de 5 rørene for hver stamme ble strøket ut på agarskåler (m/200 µg/ml rifampicin) for å kunne dyrke opp 5 individuelle mutanter. Fra agarskålene ble det plukket en koloni og inokulert ON i buljong tilsatt 200 µg/ml rifampicin. ON-kulturen ble videre benyttet til bioscreen-analyse. Skjematisk oversikt over hvordan villstammene ble adaptert til antibiotika er fremstilt i figur 3.2, hvor det har blitt tatt utgangspunkt i villtypen (vt) *C. divergens* MF 1976 som eksempel.



Figur 3.2 Skjematisk fremstilling av metode for dannelse av antibiotikaresistente bakteriestammer av *C. divergens* MF 1976.

3.4 Bioscreen-analyse

Av de oppdyrkede rifampicin-resistente stammene ble det for både *C. divergens* og *Pseudomonas spp.* kjørt bioscreen-analyse. Analysene ble gjennomført likt for begge artene, der de antibiotikaresistente mutantene av hver stamme ble analysert opp mot villtypene. Hensikten var å sjekke hvordan mutantene vokste i forhold til villtypene. Se tabell 3.2 for vekstbetingelser.

Før gjennomføring av bioscreen-analyse er det en forutsetning at alle bakteriekulturene som skal benyttes er så ferske som mulig. Dette er for at alle bakteriene fortsatt skal være i vekstfasen og analysen gjennomføres med samme utgangspunkt. Kulturene som ble benyttet var alle podet i vekstbuljong dagen før analysen og inkubert over natt. Til analysen ble det benyttet en steril «honeycomb»-plate (Honeycomb 2 plate, 9502550) med 10x10 brønner, hvor hver brønn ble tilsatt 245 µl flytende medium (uten rifampicin) + 5 µl bakteriekultur. Brønner benyttet som kontrollprøver av vekstmediet ble fylt med 250 µl medium. Grunnen til at det ikke ble benyttet medium tilsatt antibiotika var for å oppnå mest mulig like betingelser for vekstmønstret mellom mutanter og villtype. Under analysen ble det inokulert 2 paralleller av hver mutant og 5 paralleller av den tilhørende villtypen (totalt 5 forskjellige mutanter per villtype). «Honeycomb»-platen ble inkubert i et Bioscreen C- analyseinstrument (Labsystems) med 10 minutter mellom hver OD-måling ved 600 nm. Mikrokulturene ble inkubert ved 30 °C i 2 døgn for *C. divergens* og 1 døgn for *Pseudomonas* under svak risting (Low Intensity 10 moves Instructions before measurements).

3.5 PCR og 16S rDNA-sekvensering

Ved hjelp av standard PCR og 16S rDNA-sekvensering, ble antibiotikaresistente mutanter og tilhørende villtype av *C. divergens* og *Pseudomonas spp.* undersøkt med fokus på renhet og artsidentifisering. Hensikten med analysene var å sikre at antibiotikaresistente stammer fortsatt var av den samme opprinnelige bakteriearten, og at det ikke hadde oppstått forurensninger underveis. To antibiotikaresistente mutanter med tilhørende villtype av hver art ble analysert (totalt 5 villtyper og 10 mutanter for *C. divergens*, og 4 villtyper med 8 mutanter for *Pseudomonas spp.*). Dagen før PCR-analysen ble aktuelle mutanter og villtyper dyrket opp på agarskål med og uten antibiotika (200 µg/ml rifampicin) for å være sikker på at en hadde ferskt genmateriale som templat.

3.5.1 PCR – gjennomførelse og betingelser

DNA-templat ble isolert fra enkeltkolonier og plukket ved hjelp av sterile pipettespisser og plassert i bunnen av brønnene på en PCR-plate (0,2 ml Semi-Skirted 96-well PCR plate, AB-0900 Thermo Scientific). DNA-templatet ble varmebehandlet ved bruk av mikrobølgeovn i 60 sekunder ved 750 W, før 25 µl PCR-miks ble tilsatt hver enkelt brønn inneholdende DNA. Følgende PCR-Kit som ble benyttet var 5 Prime HotMasterMix (5 PRIME GmbH, Tyskland) med tilsatte primere Mangala F (Forward) og Mangala R (Reverse), som er universelle primere for 16S rDNA-sekvensering.

Følgende PCR-miks ble laget og tilsatt hver brønn med templat:

- 13 µl Molecular Biology Grade Water (Sigma-Aldrich, Tyskland)
- 10 µl 5 Prime HotMastermix 2,5x
- 0,5 µl Mangala F primer, 10 µM
- 0,5 µl Mangala R primer, 10 µM

PCR-platen ble sentrifugert et par sekunder for å spinne ned innholdet i brønnene før platen ble plassert i PCR-maskinen (Applied Biosystems, Veriti 96-Well Thermal Cycler). PCR-reaksjonen ble gjennomført under følgende betingelser: 94 °C i 2 min., 30 sykler ved 94 °C i

30 sek., 60 °C i 30 sek. og 72 °C i 30 min., med endelig polymerisering ved 72 °C i 7 min., og avsluttende hold ved 4 °C.

3.5.2 Gel-elektroforese og rensing av PCR-produkt

Etter PCR-reaksjonen ble PCR-produktet kjørt på 0,7 % agarosegel ved 100 V i 30 minutter. Gelen ble støpt med agarose i 0,5x TBE (Tris-Borate-EDTA buffer 10x, Life Technologies) og tilsatt fluorescerende DNA-farge GelRedTM (Nucleic Acid Gel Stain) i forholdet 1 µl GelRed per 10 ml agarose. PCR-produkt (5 µl) og Orange loading buffer (2 µl) ble tilsatt samme brønn på ny PCR-plate, blandet, og applisert på gel. Hensikten med tilsetning av Orange loading buffer er at løsningen med PCR-produktet skal få høyere tetthet og synke ned i gel-brønnene, da bufferen inneholder glyserol. Det ble benyttet 5 µl DNA-Standard VI (DNA Molecular Weight Marker VI, Boehringer Mannheim) som markør i første brønn per rad på agarosegelen. Grad av fortynning av PCR-produkt før rensing ble vurdert ut ifra styrken på gel-båndene, hvor eventuell fortynning ble gjort med vann (Molecular Biology Grade Water) fritt for enzymaktivitet (RNase, DNase, Protease).

Rensing av PCR-produkt ble gjort ved bruk av ExoSapIT (ExoSap-IT for PCR Product Cleanup, 78201 Affymetrix). ExoSapIT fortynnet 1:5 (2 µl) og eventuelt fortynnet PCR-produkt (5 µl) ble tilsatt ny PCR-plate, spunnet ned i sentrifuge og plassert i PCR-maskin på ExoSapIT-program: 37 °C i 30 min. og 80 °C i 15 min. Rensing av PCR-produkt med ExoSapIT skjer ved enzymatisk aktivitet der overskuddet av nukleotider og primere som ikke ble inkorporert under PCR-reaksjonen blir denaturert og fjernet.

3.5.3 Innmerking av PCR-produkt og 16S rDNA-sekvensering

Etter rensing av PCR-produkt ble det benyttet BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (4337450 Life Technologies). BigDye v1.1 ble brukt i henhold til instruksjoner fra produsent sammen med primeren Mangala F for innmerking med fluorescerende farge, nødvendig for sekvenseringen, i det rensede DNA-materialet fra PCR-reaksjonen.

Følgende mastermikks ble benyttet:

- 1,5 µl BigDye Buffer 5x
- 1,0 µl BigDye v1.1
- 1,0 µl Mangala F primer, 3,2 µM
- 5,5 µl Molecular Biology Grade Water

Mastermikks (9 µl) + ExoSapIT-renset PCR-produkt (1 µl) ble tilsatt hver brønn på ny PCR-plate (Optical 96-Well Reaction plate, N8010560 Life Technologies). PCR-platen ble kjørt på sekvenseringsprogram i PCR-maskin: 25 sykler ved 96 °C i 15 sek. og 60 °C i 4 min., med avsluttende hold ved 4 °C.

Etter innmerkingen ble prøvene utfelt og klargjort for 16S rDNA-sekvensering ved bruk av BigDye XTerminator Purification Kit (4376487 Life Technologies). Fellingsløsning ble laget ved blanding av XTerminatorTM Solution (10 µl) + SAMTM Solution (45 µl) og tilsatt hver enkelt brønn i PCR-platen. Platen ble satt til risting i 30 minutter i Vortex-mikser ved 1500 rpm og spunnet ned i sentrifuge ved 2500 rpm i 2 minutter. Hensikten med å tilsette fellingsløsning til PCR-produktet var for utfelling av nukleotider som ikke hadde blitt inkorporert under innmerkingen og for å skille supernatanten fra pelleten. Supernatanten benyttes videre til sekvenseringen. For sekvensering ble det benyttet en genetisk analysator (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems). De analyserte sekvensene ble sammenlignet med sekvenser funnet i den elektroniske databasen RDP (The Ribosomal Database Project, release 11, update 3) (Cole et al., 2009).

3.6 UV-belysning av kyllingfilet og agarskåler

Forsøk med UV-belysning av fersk, rå kyllingfilet og agarskåler tilsatt antibiotikaresistente bakteriestammer ble gjennomført ved bruk av kontinuerlig UVC-lys og puls UV-lys i ulike doser. For hver art ble det utført 3 forsøk med kontinuerlig UVC-lys, med gjentak av forsøkene på 3 forskjellige dager. Tilsvarende for forsøk med puls UV-lys. Hensikten med å belyse agarskåler i tillegg til kyllingbitene var for å sammenligne effekten av UV-belysningen og sammenligne hvor stort bakteriedrap en fikk på en flat, glatt overflate, sammenlignet med overflatestrukturen på kyllingfilet.

I forkant av UV-forsøkene ble det av hver bakterieart podet ON-kulturer i buljong tilsatt antibiotika. *C. divergens* og *Pseudomonas spp.* ble dyrket opp i henholdsvis cMRS og TSB (m/200 µg/ml rifampicin) og inkubert ved 30 °C. ESBL-*E. coli* ble dyrket i BHI (m/50 µg/ml ampicillin) og inkubert ved 37 °C. ON-kulturene ble podet fra frysekulturer ved å bruke en podenål. For å oppnå tettere cellesuspensjon av *C. divergens* ble ON-kulturene podet om i nye buljongrør påfølgende dag og inkubert ON, da kulturene podet direkte fra frysekulturene ga lite vekst.

Kyllingfiletene benyttet under forsøkene ble kjøpt inn fra ulike matvarebutikker, uavhengig av produsent og produktmerke, og pakker med lengst holdbarhetstid ble valgt da forutsetningen for UV-forsøkene var belysning av så fersk kylling som mulig. Kyllingfiletene ble oppbevart i originalemballasjen ved 4 °C til forsøksstart.

3.6.1 Forsøksprosedyre

For hver art ble en 10x oppkonsentrert bakterieblanding laget av de antibiotikaresistente stammene. Dette var for å sikre et høyt nok antall bakterieceller i forhold til senere utplating og tellbart antall kolonier. Blandingen ble videre brukt til inokulering av kyllingbiter og agarskåler tilsatt antibiotika før UV-belysning. Alle prøvene ble laget i 3 paralleller og belyst i luft. I tillegg til kyllingprøver med tilsatte bakterier, ble ubelyste kyllingprøver testet for bakgrunnsflora ved å plate ut på agarskåler med og uten antibiotika. En systematisk temperaturmåling av ubelyste og belyste kyllingprøver ble foretatt ved bruk av infrarødt

termometer, før og etter belysning, for å kunne sammenligne om UV-belysningen ga en eventuell merkbar temperaturøkning.

ON-kulturer ble oppkonsentrert 10x ved at 2 ml kultur ble overført til et Eppendorfrør (2 ml) og sentrifugert i 5 minutter (5500 rpm). Den fraskilte supernatanten ble pipettert over til et nytt Eppendorfrør (2 ml), og 200 µl ble tilbakeført for oppslemming av cellepellet. Etter oppslemming ble de ulike stammesuspensjonene overført til samme rør i like mengder.

Kyllingbiter i ca. størrelse 3x3x0,5 cm (overflateareal = 9 cm²) ble skåret med bruk av steril skalpell og pinsett fra rene overflater på fileter, med minst mulig fett og sener, og plassert på sterile petriskåler. Bakterieblanding (15 µl) ble påført med en pipette og fordelt forsiktig på overflaten med pipettespissen, og satt til tørk i ca. 30 minutter. Ved behov ble kyllingprøvene satt tilbake på kjøll (4 °C) i påvente av UV-belysningen.

Ved inokulering av agarskåler tilsatt antibiotika ble det laget 3 parallelle fortynningsrekker av bakterieblanding. Skåler til UV-belysning ble tilsatt 10⁻²-fortynning og ubelyste kontrollskåler ble tilsatt 10⁻⁶- og 10⁻⁷-fortynning, før tilsatt volum (50 µl) ble strøket ut med vinkelstav. Etter endt inkuberingstid ble koloniantall telt manuelt. For skåler uten synlig bakterievekst ble halvparten av deteksjonsgrensen på 2*10³ bakterier satt som en tilfeldig valgt verdi (1*10³).

Etter belysningsforsøkene ble kyllingbitene fortynnet (1:10) i en homogenisator-pose ved bruk av sterilt peptonvann og automatisk fortynningsautomat (Dilumat 3mk2, Frankrike). Prøvene ble homogenisert (60 sek.) i en Smasher® (Aes Chemunex, Frankrike), og videre fortynnet til 1:100 og 1:1000 i peptonvann. Av belyste kyllingprøver ble fortynning 1:10 og 1:100 sådd ut på agarskål m/antibiotika, mens 1:100- og 1:1000-fortynning ble benyttet for ubelyste kontrollprøver. Ubelyste kyllingprøver for test av bakgrunnsflora ble sådd ut fra 1:10-fortynning på agarskål med og uten tilsatt antibiotika. Utsåing av 50 µl prøve ble gjort med automatisk spiralutplater, WASP (Whitley Automatic Spiral Plater, Don Whitley Scientific, UK). Ved telling av skålenes kolonitall (CFU/ml) ble det benyttet en automatisk tellemaskin (ProtoCOL 2 colony counter, Synbiosis, UK).

3.6.2 Belysningsforsøk med kontinuerlig UVC-lys

Oppsettet for prøveparallellene for kylling og agarskåler benyttet ved forsøk med kontinuerlig UVC-belysning er vist i tabell 3.4. Prøvene ble utsatt for samme lysintensitet (10 mW/cm^2) og bølgelengde (253,7 nm) i ulike tidsintervall. Belysning av prøver foregikk i lukket kammer med kontinuerlig UVC-lys i avstand 6 cm fra lampen (2 x 95 W, BÄRO UV-C compact fixture, 896295008P, Tyskland).

Tabell 3.4 Oversikt over prøveparalleller med tilhørende UV-dose benyttet ved belysning med kontinuerlig UVC-lys.

Prøveparalleller (nr.)	Produkt	Belysning (UV-dose*)
1, 2, 3	Kylling	5 sek.
4, 5, 6		10 sek.
7, 8, 9		30 sek.
10, 11, 12		1 min.
13, 14, 15		5 min.
16, 17, 18		Kontroll, ubelyst
19, 20, 21		Agarskål
22, 23, 24	10 sek.	
25, 26, 27	30 sek.	
28, 29, 30	1 min.	
31, 32, 33	5 min.	
34, 35, 36	Kontroll, ubelyst	

* Lysintensitet = 10 mW/cm^2 , bølgelengde = 253,7 nm

3.6.3 Belysningsforsøk med puls UV-lys

Oppsettet for prøveparallellene for kylling og agarskåler benyttet ved belysningsforsøk med puls UV-lys er vist i tabell 3.5. Prøvene ble belyst i puls UV-lys med ulik dose (lav/høy) og varierende antall pulser (x3/x5). Lav dose tilsvarte 4,7 V ($1,6 \text{ J/cm}^2$ per puls) og høy dose tilsvarte 8,2 V ($3,6 \text{ J/cm}^2$ per puls). Belysningen foregikk i lukket puls UV-apparat (Intense Pulsed UV System, XeMaticA-SA1L, SteriBeam Systems GmbH, Tyskland), se vedlegg 2 for produktspesifikasjoner. Prøvene var plassert i 6,5 cm avstand fra detektorskjerm (10x19,5 cm) hvor UV-pulsene ble reflektert. Belyst areal fra detektorskjerm ga ca. 200 cm^2 , tilsvarende maks 5 J/cm^2 per puls.

Tabell 3.5 Oversikt over prøveparalleller med tilhørende UV-dose benyttet ved belysning med puls UV-lys.

Prøveparalleller (nr.)	Produkt	Belysning (UV-dose*)
1, 2, 3	Kylling	Lav
4, 5, 6		Høy
7, 8, 9		Høy x3
10, 11, 12		Høy x5
13, 14, 15		Kontroll, ubelyst
16, 17, 18	Agarskål	Lav
19, 20, 21		Høy
22, 23, 24		Høy x3
25, 26, 27		Kontroll, ubelyst

* Lav = 4,7 V ($1,6 \text{ J/cm}^2$ /puls), Høy = 8,2 V ($3,6 \text{ J/cm}^2$ /puls), x3/5 = 3/5 ganger

3.7 Belysningsforsøk av kylling til sensorisk produktvurdering og forbrukertest

I tillegg til UV-belysningsforsøk av kyllingfilet ble det også utført tilsvarende forsøk uten tilførte bakterier. Disse filetene ble pakket og lagret en uke før de ble benyttet til enkel sensorisk produktvurdering og en mindre forbrukertest.

Kyllingfiletene ble belyst med kontinuerlig UVC og puls UV-lys under aerobe og anaerobe forhold. Anaerobe kyllingprøver ble plassert i lufttette plastbegre med UV-gjennomtrengelig kvartsglass på toppen som ble festet med silikonfett og klyper. Nitrogengass ble så tilsatt pakken i 3 minutter. Andel restoksygen igjen i pakningen ble målt med gassanalysator (Headspace gas analyser, CheckMate II, PBI Dansensor, Danmark) for å forsikre fullstendig anaerob atmosfære før belysning. Etter belysning ble prøvene overført til nytt beger og pakket i 60 % CO₂ / 40 % N₂. Aerobe kyllingprøver ble direkte belyst i plastbeger uten lokk, deretter pakket på samme måte. Kontrollprøver i luft og nitrogenatmosfære ble pakket uten å ha vært belyst.

Det profesjonelle sensoriske dommerpanelet ved Nofima AS, Ås foretok en enkel sensorisk produktvurdering av både kontrollprøver og UV-belyste kyllingfileter med hensyn på luktdannelser. Prøvene ble vurdert for tilstedeværelse av harsk lukt, bilukt, brent lukt, svovellukt og emmen lukt. Vurderingen ble gjennomført i to blindtestrunder med ulikt dommerpanel, 10 dommere i hver runde. Det ble servert 10 prøver til hver dommer i tilfeldig rekkefølge, hvor prøvene ble servert i nummererte porselensskåler med lokk. Skålene var merket med tilfeldige tresifrede koder. Tabell 3.6 viser oversikt over hvilken belysningsmetode, UV-dose og atmosfære de aktuelle prøvene gjennomgikk før sensorisk produktvurdering.

Tabell 3.6 Oversikt over belyningsmetode, UV-dose og atmosfære aktuelle prøver gjennomgikk før sensorisk produktvurdering.

Prøve	UV-belysning	UV-dose*	Belysningsatmosfære
1	Puls UV	Lav	Aerob (O ₂)
2		Hx3	
3		Lav	Anaerob (N ₂)
4		Hx3	
5	Kontinuerlig UVC	10 sek.	Aerob (O ₂)
6		60 sek.	
7		10 sek.	Anaerob (N ₂)
8		60 sek.	
9	Kontroll	-	Aerob (O ₂)
10		-	Anaerob (N ₂)

* Lav = 4,7 V (1,6 J/cm² /puls), Høy = 8,2 V (3,6 J/cm² /puls), Hx3 = Høy 3 ganger

I tillegg til den profesjonelle sensoriske produktvurderingen gjort av et trent dommerpanel ble det foretatt en mindre forbrukertest blant 20 tilfeldig utvalgte ansatte og studenter på Nofima. Testpersonene fikk spørsmål om de ville spist, eller ikke spist, følgende kyllingprøve til middag. I tillegg bedømte testpersonene kvaliteten på hver filet på en skala fra 1 til 9, hvor 1 poeng var vurdert som veldig dårlig, og 9 poeng vurdert som veldig god kvalitet. Hver testperson ble servert 5 prøver med samme betingelser og presentasjon som ved den profesjonelle produktvurderingen (Tabell 3.7). Hensikten med undersøkelsen var å få en indikasjon på om en nøytral forbruker, ved blindtest, ville hatt mindre preferanse for UV-belyste kyllingprodukter kontra ubelyst.

Tabell 3.7 Oversikt over belyningsmetode, UV-dose og atmosfære aktuelle prøver gjennomgikk før forbrukerundertest.

Prøve	UV-belysning	UV-dose*	Belysningsatmosfære
1	Puls UV	Lav	Aerob (O ₂)
2	Puls UV	Hx3	Aerob (O ₂)
3	Puls UV	Hx3	Anaerob (N ₂)
4	Kontinuerlig UVC	60 sek.	Aerob (O ₂)
5	Kontroll	-	Aerob (O ₂)

* Lav = 4,7 V (1,6 J/cm² /puls), Høy = 8,2 V (3,6 J/cm² /puls), Hx3 = Høy 3 ganger

4.0 Resultater

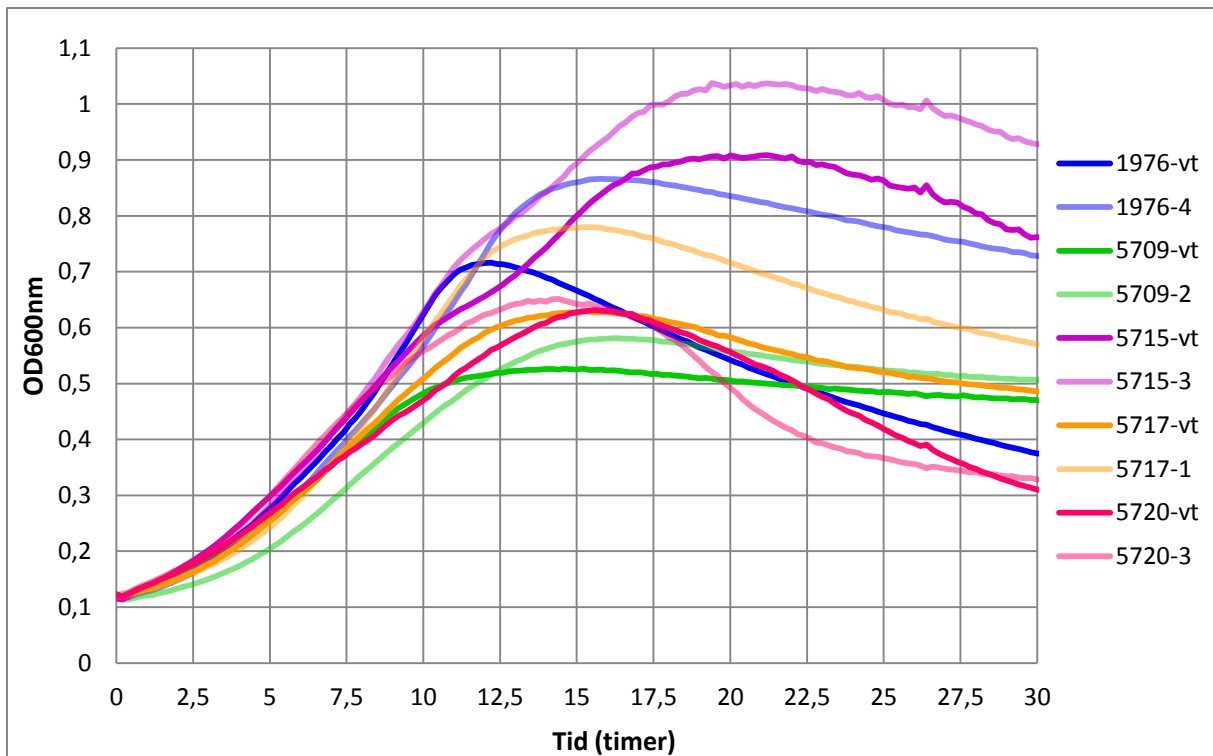
4.1 Kontroll av antibiotikaresistente mutantstammer

Rifampicin-resistente mutantstammer av *C. divergens* og *Pseudomonas spp.* ble laget som beskrevet i materialer og metoder. Ved hjelp av vekstanalyse og 16S rDNA-sekvensering ble oppdyrkede mutanter og opprinnelige villtyper sammenlignet med fokus på vekstmønster og identitet. Vekst ble undersøkt ved bruk av bioscreen-analyse. Ved endt vekstanalyse ble to mutanter fra hver villtype, basert på mest mulig like vekstkurver, valgt ut til sekvensering (se vedlegg 3 og 4 for vekstkurver for alle analyserte villtyper med tilhørende mutanter). Etter 16S rDNA-sekvensering og artskonfirmering ble en mutant fra hver villtype valgt ut og benyttet videre i forsøk med UV-belysning av fersk, rå kyllingfilet og agarskåler. Tabell 4.1 viser en oversikt over de utvalgte mutantene, hvor mutantene er nummerert og navngitt etter hvilken villtype de opprinnelig stammer fra (se tabell 3.1). Vekstkurvene for villtypestammene med tilhørende mutanter er vist i figur 4.1 og 4.2 for henholdsvis *C. divergens* og *Pseudomonas spp.*, hvor gjennomsnittsverdier av målte OD-nivåer ved 600 nm er angitt over et tidsintervall på 30 timer. Villtype med tilhørende mutant er markert med samme farge, hvor mutantenes vekstkurver er markert i lysere fargenyanser. Villtypestammene er markert med betegnelsen «vt» etter stammenummeret.

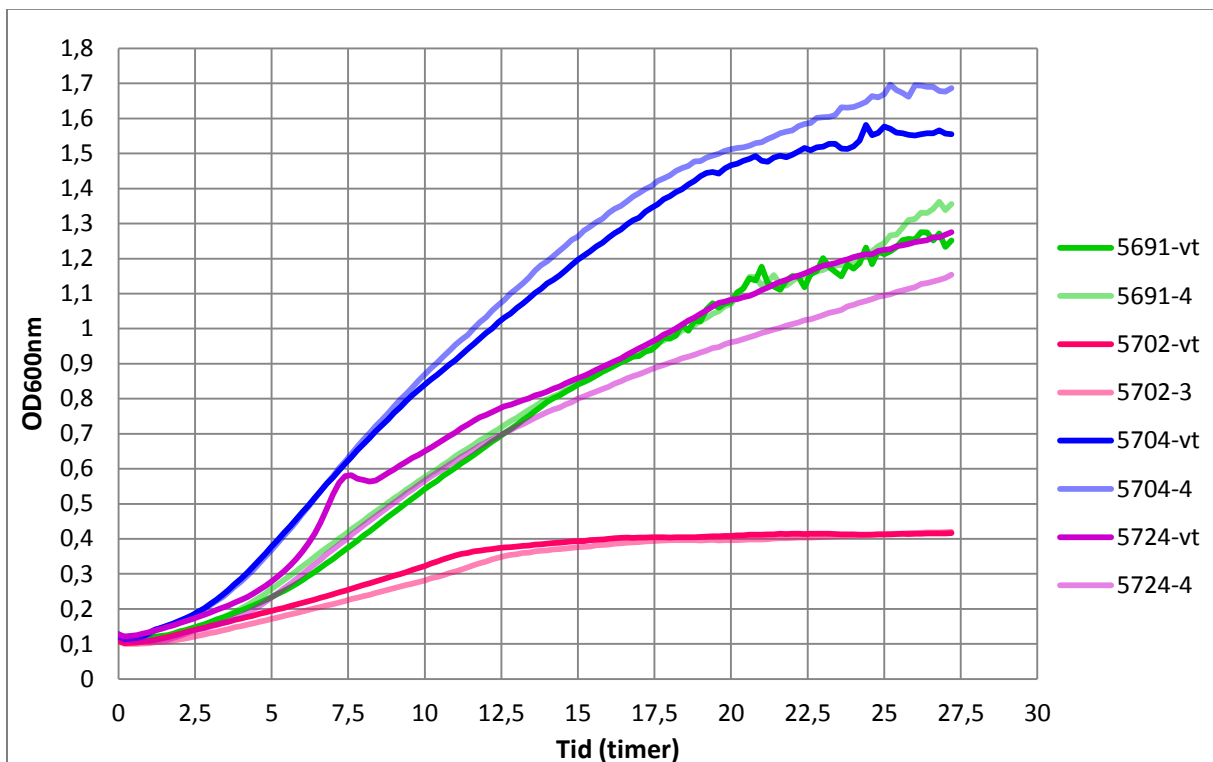
Tabell 4.1 Antibiotikaresistente bakteriestammer fra villtyper* av *C. divergens* og *Pseudomonas spp.* benyttet til UV-belysningsforsøk på kyllingfilet og agarskåler.

Bakterie	Resistent stamme (MF-nr.)
<i>Carnobacterium divergens</i>	1976-4
	5709-2
	5715-3
	5717-1
	5720-3
<i>Pseudomonas spp.</i>	5691-4
	5702-3
	5704-4
	5724-4

* Se tabell 3.1



Figur 4.1 Vekstkurver for villtyper og utvalgte antibiotikaresistente mutanter for *C. divergens*-stammer MF 1976, 5709, 5715, 5717 og 5720 benyttet til UV-belysningsforsøk av kylling og agar. Gjennomsnittsverdier av OD-målinger (600 nm) er vist etter antall timer. Mutantene er vist i lysere fargenyanser enn tilhørende villtype.



Figur 4.2 Vekstkurver for villtyper og utvalgte antibiotikaresistente mutanter for *Pseudomonas*-stammer MF 5691, 5702, 5704 og 5724 benyttet til UV-belysningsforsøk av kylling og agar. Gjennomsnittsverdier av OD-målinger (600 nm) er vist etter antall timer. Mutantene er vist i lysere fargenyanser enn tilhørende villtype.

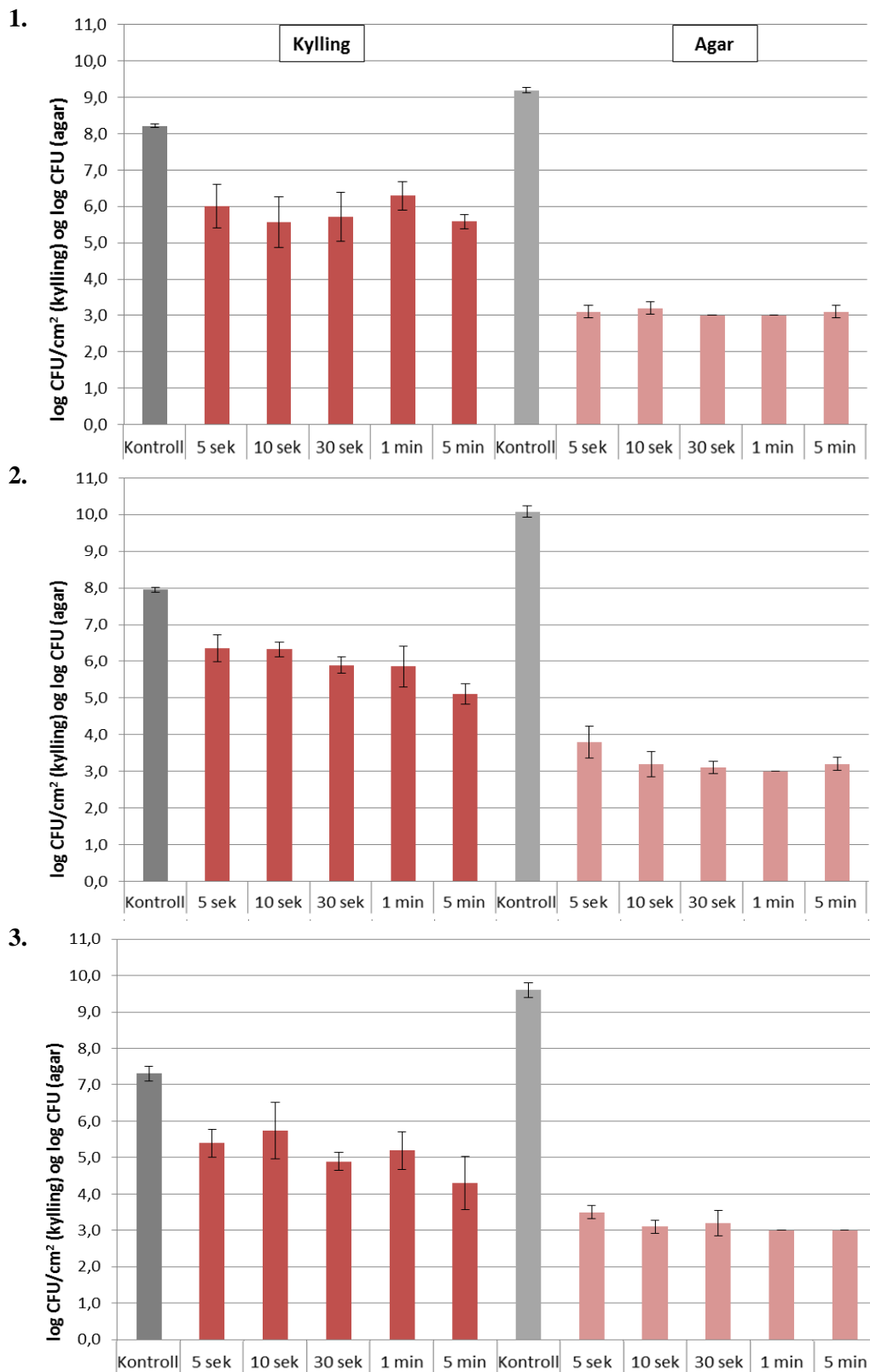
Av figur 4.1 og 4.2 kan det leses hvordan de utvalgte mutantene vokste i forhold til villtypestammene. Mutantene av *C. divergens* hadde relativt likt vekstmønster som opprinnelig villtype i starten og gjennom vekstfasen, hvor mutanten 5709-2 hadde en noe flatere vekstkurve enn 5709-vt fram til ca. 12 timer etter analysestart. Samtlige mutanter av *Pseudomonas spp.* hadde meget likt vekstmønster som opprinnelig villtype. Mutant 5724-4 hadde noe avvikende kurve fra 5724-vt etter 7,5 timer, men kurvene viste jevn vekst gjennom resten av analysetiden.

I tillegg til *C. divergens* og *Pseudomonas spp.* ble bioscreen-analyse også utført for bakteriearten *B. thermosphacta*, men grunnet dårlig vekst og adaptasjon til antibiotika ble denne arten ikke tatt med videre i studiet (resultater ikke vist).

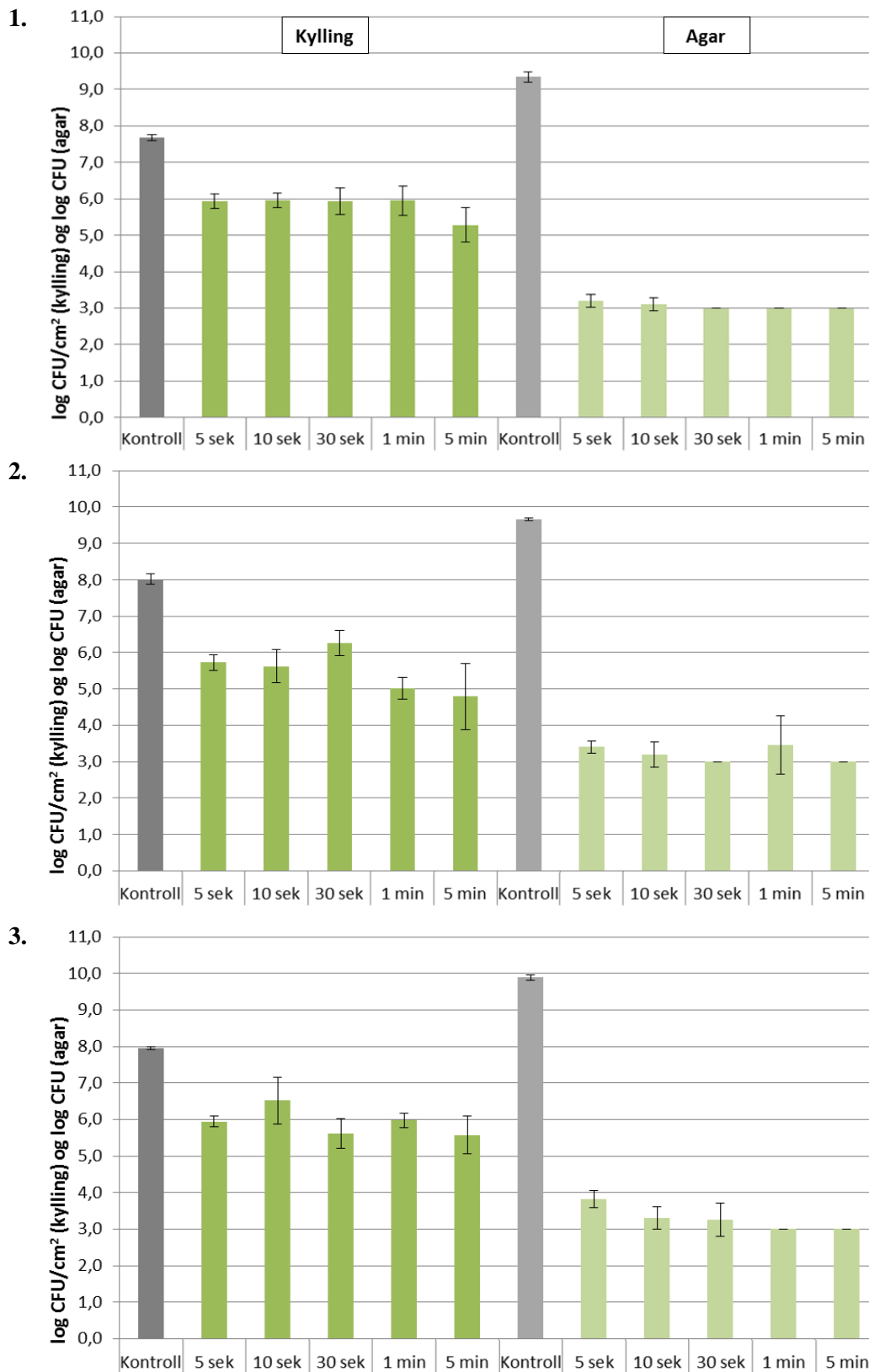
4.2 UV-belysning av kyllingfilet og agarskåler

4.2.1 Belysningsforsøk med kontinuerlig UVC-lys

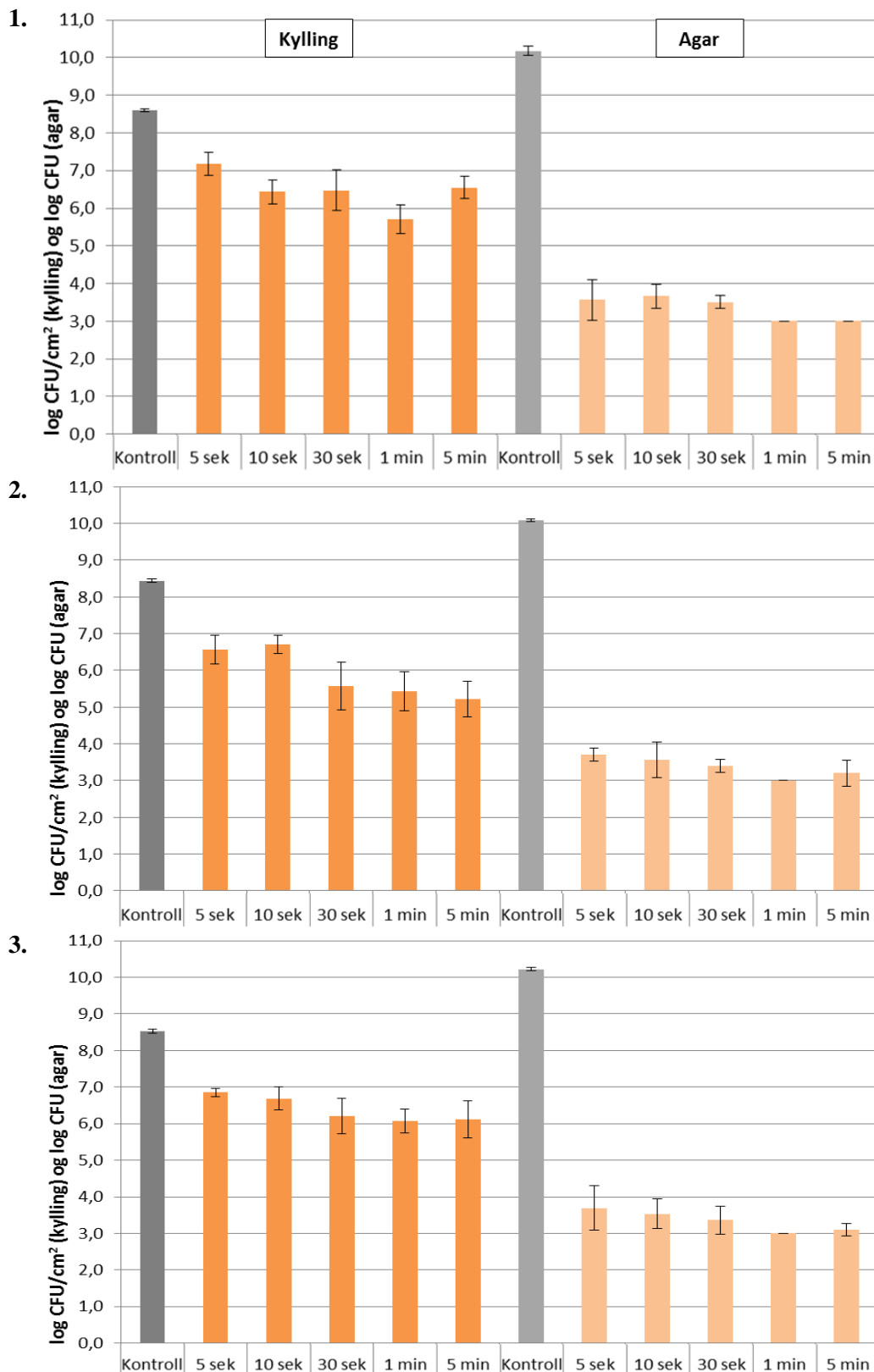
Resultatene fra individuelle belysningsforsøk med kontinuerlig UVC-lys gjort på kyllingfilet og agarskåler tilsatt antibiotikaresistente bakteriestammer av *C. divergens*, *Pseudomonas spp.* og ESBL-produserende *E. coli*, er presentert henholdsvis i figurene 4.3, 4.4 og 4.5. Figurene viser reduksjon i bakterietall på belyste kyllingprøver ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) og agarskåler ($\log \text{CFU}$) sammenlignet med ubelyste kontrollprøver. Prøvene ble belyst i 5, 10 og 30 sekunder, samt 1 og 5 minutter. Ved resultatbehandling ble kun skåler med 30-300 kolonier benyttet, og for skåler uten synlige kolonier ble halvparten av deteksjonsgrensen på $2 \cdot 10^3$ for agarprøver satt som en tilfeldig valgt verdi. Resultatene for agarskålene er markert med lysere fargenyanse enn tilsvarende farge for kyllingprøver, og kontrollprøver er vist i grått.



Figur 4.3 Reduksjon av *C. divergens* påført kylling (log CFU/cm²) og agar (log CFU). Kyllingprøver, vist som røde søyler, og agar, lyserøde søyler, ble behandlet med kontinuerlig UVC-lys i 5, 10 og 30 sekunder (sek), 1 og 5 minutter (min). Ubelyste kontrollprøver er vist i grått. Tre forsøk (1-3) ble utført på forskjellige dager med 3 paralleller for hver prøve.



Figur 4.4 Reduksjon av *Pseudomonas spp.* påført kylling (log CFU/cm²) og agar (log CFU). Kyllingprøver, vist som grønne søyler, og agar, lysegrønne søyler, ble behandlet med kontinuerlig UVC-lys i 5, 10 og 30 sekunder (sek), 1 og 5 minutter (min). Ubelyste kontrollprøver er vist i grått. Tre forsøk (1-3) ble utført på forskjellige dager med 3 paralleller for hver prøve.

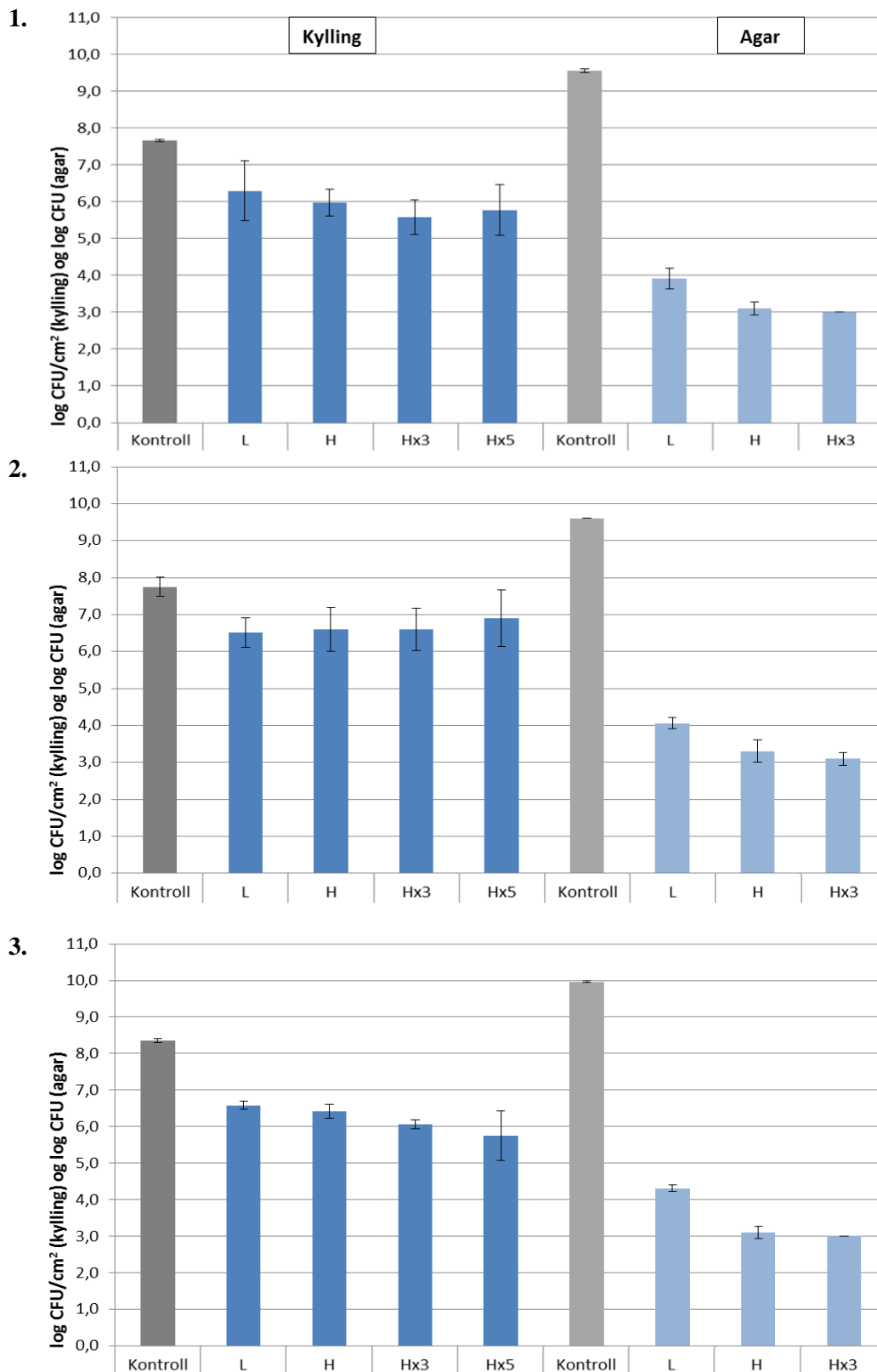


Figur 4.5 Reduksjon av ESBL-produserende *E. coli* påført kylling (log CFU/cm²) og agar (log CFU). Kyllingprøver, vist som oransje søyler, og agar, lyseoransje søyler, ble behandlet med kontinuerlig UVC-lys i 5, 10 og 30 sekunder (sek), 1 og 5 minutter (min). Ubelyste kontrollprøver er vist i grått. Tre forsøk (1-3) ble utført på forskjellige dager med 3 paralleller for hver prøve.

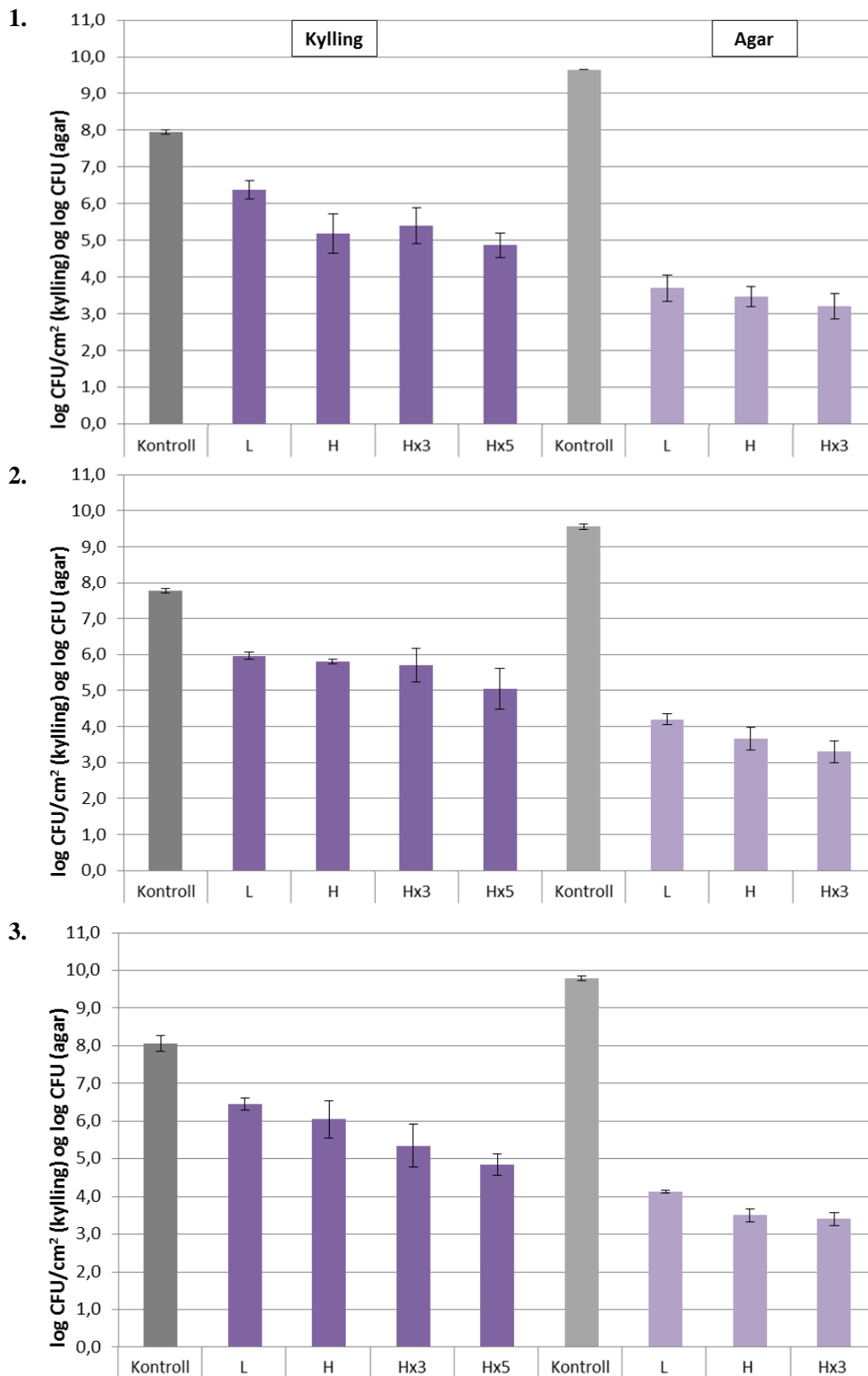
Resultatene fra belsningsforsøkene med kontinuerlig UVC-lys viste reduksjon i bakterietall for alle tre bakterieartene sammenlignet med ubelyste kontrollprøver. Resultatene mellom de ulike belsningstidene var noe varierende, men for de fleste forsøkene ble det indikert størst reduksjon ved 1 min. og 5 minutters belsningstid på kylling. Økningen i log-drap ved økende belsningsdose var likevel relativt liten, sammenlignet med prøvene belyst i 5 sekunder. Resultatfiguren for *C. divergens* indikerte reduksjon i antall log mellom 2,0-2,5 og >2,5 ved belsning i henholdsvis 1 og 5 minutter. Tilsvarende for *Pseudomonas spp.* var mellom 1,5-3,0 og 2,0-3,0 log. For ESBL-produserende *E. coli* indikerte resultatene reduksjon mellom 2,5-3,0 log ved både 1 og 5 minutter. Sammenlagt reduksjon på kylling for samtlige bakteriearter ved alle belsningstidene viste mellom 1,5-3,0 log. Reduksjon i log CFU på belyste agarskåler viste over 6,5 log for alle bakterieartene.

4.2.2 Belsningsforsøk med puls UV-lys

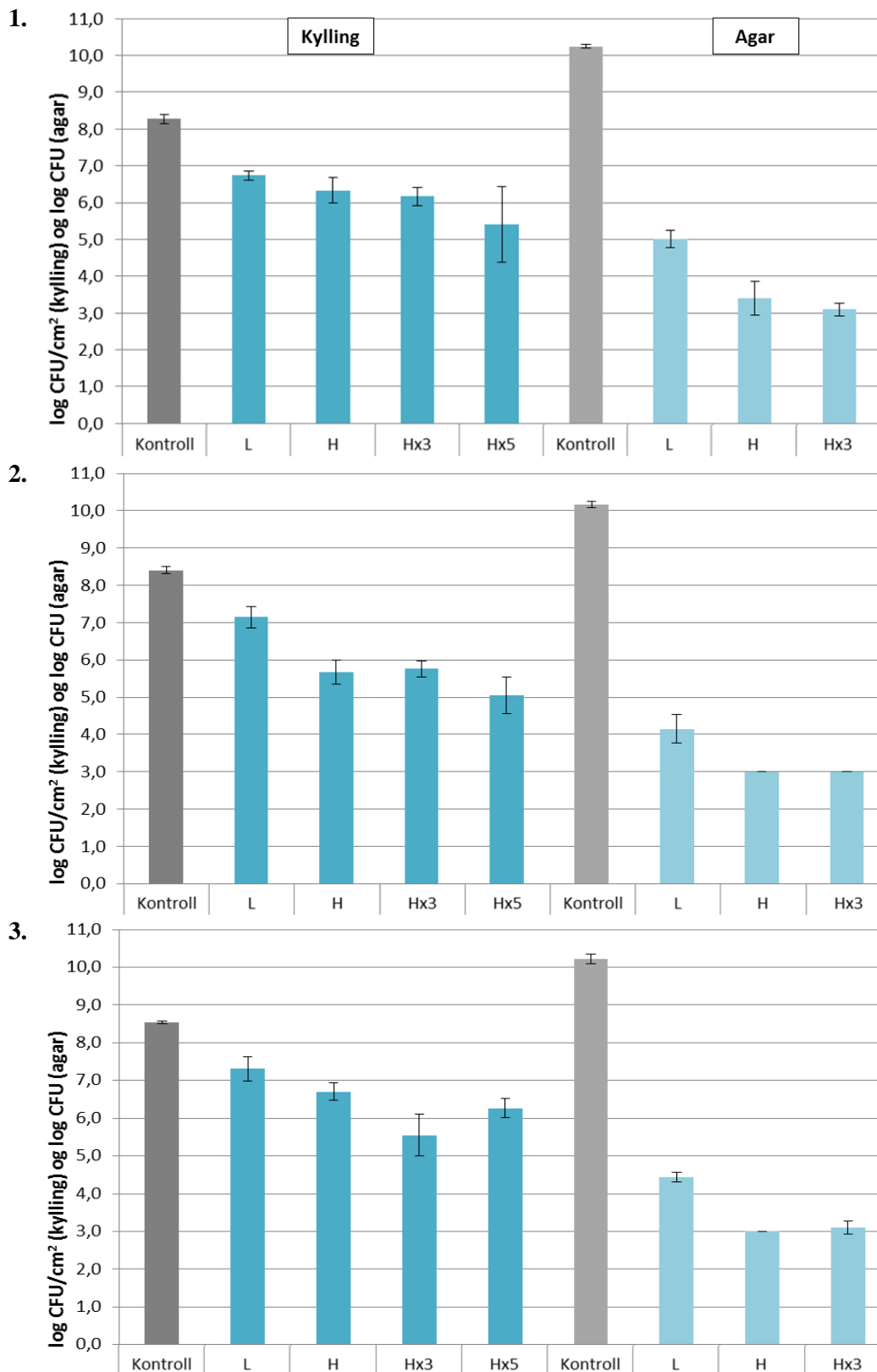
Resultater fra individuelle belsningsforsøk med puls UV-lys gjort på kyllingfilet og agarskåler tilsatt antibiotikaresistente bakteriestammer av *C. divergens*, *Pseudomonas spp.* og ESBL-produserende *E. coli*, er presentert henholdsvis i figurene 4.6, 4.7 og 4.8. Figurene viser reduksjon i bakterietall på belyste kyllingprøver (log CFU/cm²) og agarskåler (log CFU) sammenlignet med ubelyste kontrollprøver. Prøvene ble behandlet med lav (L) eller høy (H) dose, med 1, 3 eller 5 UV-pulser (se kapittel 3.6.3 for eksakte doseverdier). Kun kyllingprøver ble behandlet med 5 ganger høy dose. På samme måte som for belsningsforsøk med kontinuerlig UVC-lys, ble kun skåler med kolonitall mellom 30-300 benyttet for avlesning, og for skåler uten synlige kolonier ble halvparten av deteksjonsgrensen for agarprøver satt som en tilfeldig valgt verdi. Resultatene for agarskålene er markert med lysere fargenyans enn tilsvarende farge for kyllingprøver og kontrollprøver er vist i grått.



Figur 4.6 Reduksjon av *C. divergens* påført kylling (log CFU/cm²) og agar (log CFU). Kyllingprøver, vist som blå søyler, og agar, lyseblå søyler, ble behandlet med puls UV-lys i lav (L), høy (H), høy x3 (Hx3) eller høy x5 (Hx5) dose. Ubelyste kontrollprøver er vist i grått. Tre forsøk (1-3) ble utført på forskjellige dager med 3 paralleller for hver prøve.



Figur 4.7 Reduksjon av *Pseudomonas* spp. påført kylling (log CFU/cm²) og agar (log CFU). Kyllingprøver, vist som lilla søyler, og agar, lyselilla søyler, ble behandlet med puls UV-lys i lav (L), høy (H), høy x3 (Hx3) eller høy x5 (Hx5) dose. Ubelyste kontrollprøver er vist i grått. Tre forsøk (1-3) ble utført på forskjellige dager med 3 paralleller for hver prøve.



Figur 4.8 Reduksjon av ESBL-produserende *E. coli* påført kylling (log CFU/cm²) og agar (log CFU). Kyllingprøver, vist som turkise søyler, og agar, lyseturkise søyler, ble behandlet med puls UV-lys i lav (L), høy (H), høy x3 (Hx3) eller høy x5 (Hx5) dose. Ubelyste kontrollprøver er vist i grått. Tre forsøk (1-3) ble utført på forskjellige dager med 3 paralleller for hver prøve.

Resultater fra belyningsforsøk med puls UV-lys viste reduksjon i log CFU i samtlige forsøk for alle tre bakterieartene sammenlignet med ubelyste kontrollprøver. De ulike belysningene ga noe varierende reduksjon. I flere tilfeller var det enkeltparalleller som skilte seg fra de andre parallellene for en prøve, og bidro til stort standardavvik for den aktuelle prøven. Figurene indikerte likevel en svak gjennomgående trend med større log-reduksjon jo høyere dose og antall UV-pulser prøvene ble utsatt for. På kylling indikerte reduksjonen av *C. divergens* 1,0-1,5 log ved lav dose, 1,0-2,0 log ved høy, og 1,0-2,5 log ved høy x3 og høy x5. Kyllingprøver med *Pseudomonas spp.* indikerte reduksjon på 1,7-2,0 log ved lav dose, 2,0-2,5 log ved høy, 2,0-2,7 log ved høy x3, og >3,0 log ved høy x5. Reduksjon av ESBL-produserende *E. coli* indikerte 1,0-1,5 log ved lav, 2,0-2,5 log ved høy, og 2,0-3,0 log for prøver belyst med 3 og 5 ganger høy dose. Reduksjon i log CFU på belyste agarskåler viste for samtlige bakteriearter 6,5-7,0 log ved høy og høy x3 dose.

4.2.3 Temperaturendringer under UV-belysning

Det ble foretatt temperaturmålinger av kyllingprøver før og etter UV-belysning med infrarødt termometer. Temperatur ble målt på prøvens overflate. Prøver belyst med kontinuerlig UVC-lys i 1 og 5 min. viste en temperaturøkning på $\pm 2,5-4,0$ °C og $\pm 4,0-6,5$ °C etter belysning, hvor temperaturen deretter falt raskt tilbake til temperatur før belysning. Kyllingprøver belyst med høy x3 og høy x5 puls UV-lys viste en temperaturøkning på henholdsvis $\pm 0,5-2,5$ °C og $\pm 2,5-3,5$ °C.

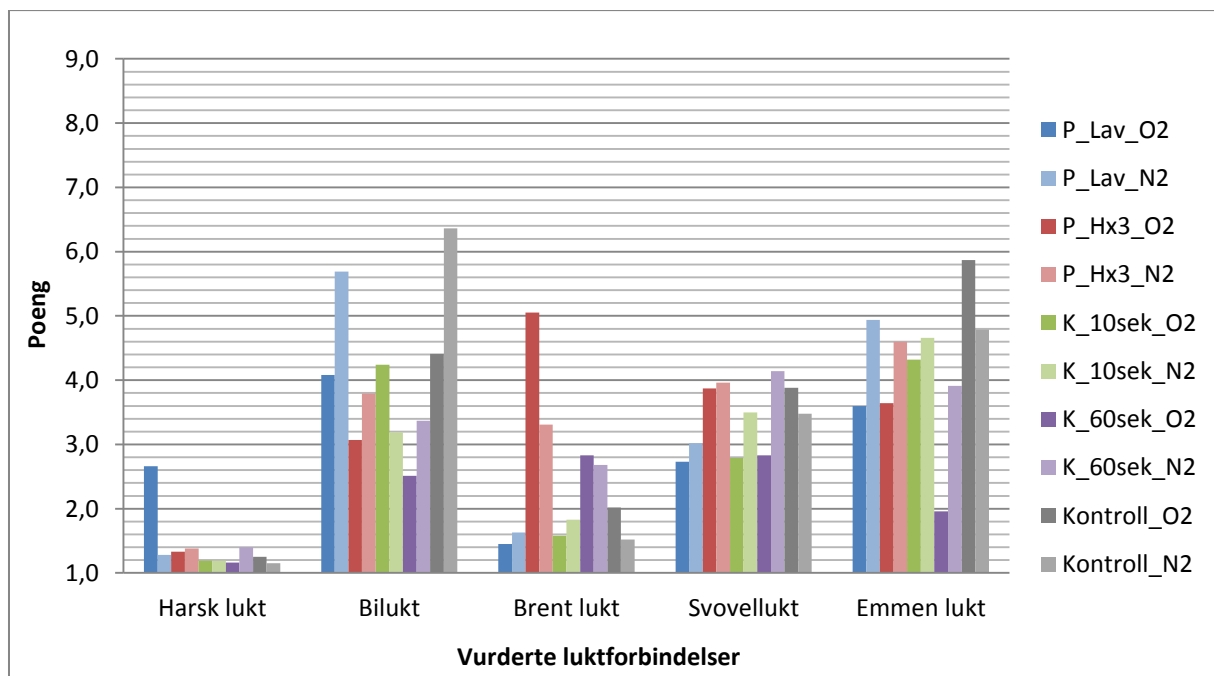
4.2.4 Bakgrunnsflora på kylling

For å teste andel bakgrunnsflora tilstede på kyllingfiletene, ble det under forsøkene platet ut prøver av ubelyste kyllingprøver på vekstmedier med og uten tilsatt antibiotika. Medier tilsatt antibiotika hadde ingen vekst ved utplating av 1:10-fortynning, mens samme utplating på medier uten antibiotika viste vekst. Kolonitallene var derimot under 30, noe som gir usikkerhet i beregnet bakterietall, men dette ga en indikasjon på bakterietall mellom 3,0-4,8 log CFU/cm² kyllingfilet.

4.3 Profesjonell sensorisk produktvurdering og forbrukervurdering av belyst og ubelyst kyllingfilet

En sensorisk produktvurdering ble gjennomført med et profesjonelt sensorisk panel bestående av 10 godt trente smaksdommere i sensorisk laboratorium. I tillegg ble det gjennomført en mindre forbrukerundersøkelse med et utrent panel på 20 personer.

Resultatene fra den profesjonelle produktvurderingen er basert på gjennomsnittsverdier beregnet fra to testrunder med 10 dommere i hver runde, og gir en indikasjon på luktene som ble oppfattet av panelet. Som vist i Figur 4.9 rangerte dommerne på en skala fra 1-9 poeng de ulike luktene som harsk lukt, bilukt, brent lukt, svovellukt og emmen lukt. Kommentarer gitt fra flere dommere var blant annet assosiasjoner til metallukt, egg og eggedosis, samt sur og fermentert lukt. Prøvene som ble servert var belyst i luft (O_2) eller nitrogenatmosfære (N_2) med kontinuerlig (K) UVC-lys i 10 og 60 sekunder, og puls (P) UV-lys ved lav og høy ganger 3 (Hx3) dose. Ubelyste kontrollprøver, hvor den ene hadde vært utsatt for nitrogen, ble også vurdert. Prøvene ble tildelt økende antall poeng etter økende grad av lukt.



Figur 4.9 Profesjonell sensorisk produktvurdering med hensyn på lukt. Vurderte prøver ble belyst i luft (O_2) eller nitrogenatmosfære (N_2) med kontinuerlig (K) UVC-lys i 10 og 60 sek., og puls (P) UV-lys ved lav og høy x3 (Hx3) dose. Prøver belyst i N_2 er merket med lysere fargenyans og ubelyste kontrollprøver er vist i grått.

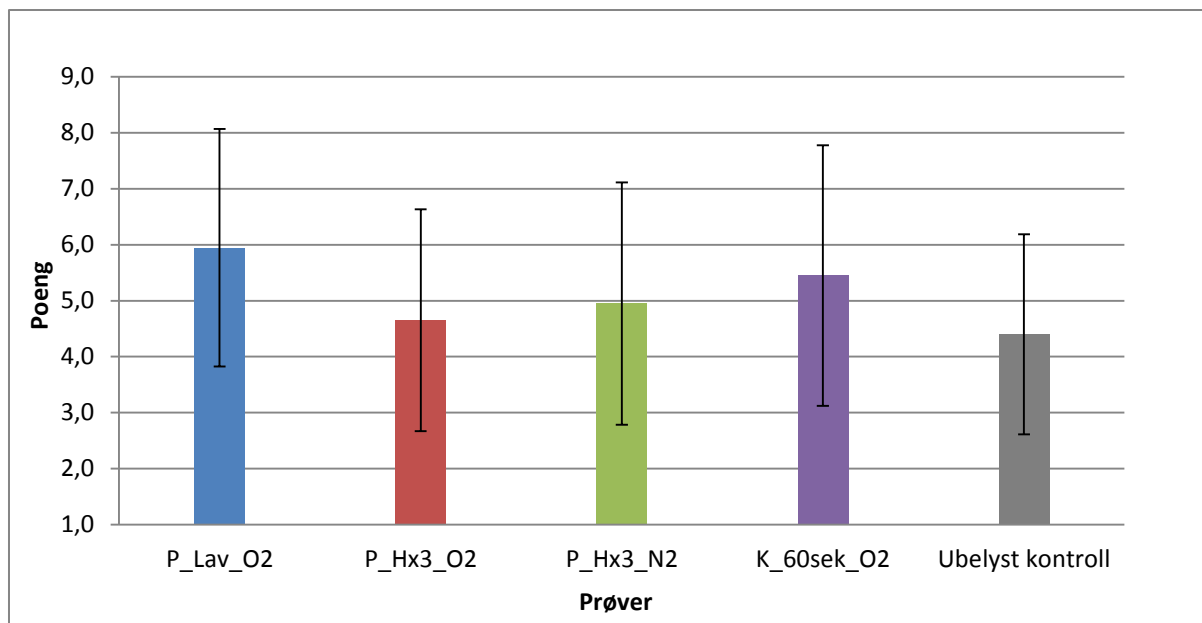
Av figur 4.9 kan det leses at luktene som ble sterkest oppfattet blant dommere i det trente panelet var bilukt, brent lukt og emmen lukt. Bilukt ble oppfattet sterkest på prøven belyst med puls UV-lys ved lav dose, samt ubelyst kontrollprøve, hvor begge prøvene var belyst i nitrogenatmosfære. Prøvene som ble vurdert til å ha mest brent lukt var de belyst med puls UV-lys ved 3 ganger høy dose, mens prøvene belyst med lav pulsdose ble vurdert til nesten ikke å ha noe brent lukt. Emmen lukt ble mest oppfattet fra de ubelyste kontrollprøvene i luft og nitrogenatmosfære. Ingen av de presenterte kyllingprøvene ble rangert med ekstremt høye poengsummer for de ulike luktforbindelsene. Selv om resultatene ga indikasjon på forskjeller mellom prøvene i forhold til emmen lukt og bilukt, var det ingen av prøvene som ble vurdert som statistisk signifikant forskjellige. Kyllingprøver vurdert til å ha brent lukt var de eneste prøvene dommerne oppfattet signifikante forskjeller mellom ($p < 0,001$).

Resultatene fra den gjennomførte forbrukertesten med et utrent panel på 20 tilfeldig valgte personer er vist i tabell 4.1 og figur 4.10. Tabellen viser oversikt over svarene som ble gitt ved spørsmålet hvorvidt testpersonene ville spist følgende kyllingprøve til middag eller ikke. Svar registrert som blank var svarskjema med manglende svar. Prøvene som ble servert var belyst i luft eller nitrogenatmosfære med puls UV-lys ved lav og høy x3 dose, samt kontinuerlig UVC-lys i 60 sekunder, belyst i luft. Figur 4.10 viser en grafisk oversikt over gjennomsnittssummen de ulike prøvene oppnådde da testpersonene fikk spørsmål om å rangere kyllingprøvene etter kvalitet på en skala fra 1-9 poeng. På kvalitetsskalaen var 1 poeng veldig dårlig, 5 poeng indikerte hverken liker eller misliker, og 9 poeng indikerte veldig god kvalitet.

Tabell 4.1 Bedømming av UV-belyst og ubelyst kyllingfilet av 20 tilfeldige valgte forbrukere*.

Belysning:	Puls UV Lav O₂	Puls UV Hx3 O₂	Puls UV Hx3 N₂	Kontinuerlig UVC, 60 sek O₂	Ubelyst kontroll
Svar:					
Ja	14 (70 %)	13 (65 %)	12 (60 %)	14 (70 %)	10 (50 %)
Nei	5 (25 %)	6 (30 %)	5 (25 %)	4 (20 %)	9 (45 %)
Blank	1 (5 %)	1 (5 %)	3 (15 %)	2 (10 %)	1 (5 %)
Sum	20 (100 %)	20 (100 %)	20 (100 %)	20 (100 %)	20 (100 %)

* Angitte svar ved spørsmål om hvorvidt forbrukeren ville spist/ikke spist følgende kyllingprøver belyst i luft (O₂) eller nitrogen (N₂) med puls UV-lys, ved lav eller 3 ganger høy (Hx3) dose, kontinuerlig UVC-lys, 60 sek. i luft, eller ubelyst kontrollprøve. Svar er gitt i antall og %.



Figur 4.10 Kvalitetsrangering av UV-belyst kyllingfilet på en skala fra 1-9 poeng utført av 20 tilfeldige forbrukere (1 = veldig dårlig, 5 = verken liker eller misliker, 9 = veldig god). UV-belysning av prøver er beskrevet i fotnote til tabell 4.1.

Det utrente panelet på 20 tilfeldig valgte personer representerte en mindre forbrukertest, og som vist i tabell 4.1 svarte flestparten at de ville brukt filetene til dagens middag. Prøven som ble minst preferert var den ubelyste kontrollprøven. Resultatene fra kvalitetsrangeringen vist i figur 4.10 indikerte at testpersonene ikke kunne skille mellom belyste kyllingprøver og ubelyst kontrollprøve, hvor store standardavvik viser at deltakerne oppfattet kyllingfiletene ulikt. Statistiske beregninger gjort med ANOVA (analysis of variance) bekreftet at det ikke var signifikant forskjell på prøvene behandlet med ulike belysningsmetoder og kontrollprøven.

5.0 Diskusjon

Mattrygghet og kvalitetssikring av ferske fjørfeprodukter byr i dag på flere utfordringer innen fjørfeindustrien. Potensiell forekomst av patogene og forringende mikroorganismer fører til et stadig større behov for utvikling av nye metoder for forbedret produktkvalitet. Bruken av ultrafiolett belysning som dekontamineringsmetode har de senere år blitt møtt med en økende interesse. I det gjennomførte studiet har det blitt brukt kontinuerlig UVC-lys og puls UV-lys ved belysning av fersk kyllingfilet og agarskåler tilsatt bakterier, for å se reduksjonseffekten på forringelsesartene *C. divergens* og *Pseudomonas spp.*, samt ESBL-produserende *E. coli*. Gjennom studiet kom det fram at UV-belysningen med begge metodene var effektiv i reduksjon av alle tre bakterieartene.

5.1 Antibiotikaresistente stammer

I UV-belysningsforsøkene ble det i tillegg til antibiotikaresistente *E. coli*-stammer også benyttet resistente mutanter oppdyrket fra villtypestammer av *C. divergens* og *Pseudomonas*. Hensikten med å lage antibiotikaresistente mutanter var å unngå støy fra bakgrunnsflora naturlig tilstede på kyllingfiletene, og ved å benytte vekstmedium tilsatt antibiotika ved utplating av kyllingprøvene ble dette unngått. Mutantstammene benyttet til belysningsforsøkene ble analysert ved 16S rDNA-sekvensering for å bekrefte riktig identitet og ren kultur. Vekstegenskaper i forhold til opprinnelige villtyper ble undersøkt ved bioscreen-analyse, hvor resultatene viste relativt likt vekstmønster mellom villtype og utvalgt mutant. Dette var en grunnleggende forutsetning for at forsøkene skulle være så autentiske som mulig, siden formålet var å undersøke hvordan UV-belysningen ville påvirket stammer som normalt forekommer på kylling.

Adapsjon til rifampicin og vekstanalyse ble også utført for bakteriearten *B. thermosphacta*. Samme vekst- og inkubasjonsbetingelser som ved oppdyrking av *Pseudomonas spp.* ble benyttet (se tabell 3.2), men grunnet dårlig adapsjon og vekst ble ikke denne arten tatt med i UV-belysningsforsøkene. Hadde det vært mer tid til rådighet og adapsjonsprosessen til rifampicin kunne foregått lengre, ville en muligens ha oppnådd flere mutasjoner. Siden *B.*

thermosphacta utgjør en meget sentral del av den naturlige forringelsesfloraen på kylling vil dette være interessant for videre arbeid.

5.2 UV-belysning reduserte bakterietall på fersk kyllingfilet

Belysningsforsøk på fersk, skinnfri kyllingfilet og agarskåler tilsatt antibiotikaresistente bakteriestammer ble gjennomført ved bruk av kontinuerlig UVC-lys og puls UV-lys. Hensikten med å belyse agarskåler i tillegg til kyllingbiter var for å kunne sammenligne effekten av UV-belysningene og eventuelle forskjeller i reduksjon av bakterietall på kylling ($\log \text{ CFU/cm}^2$) og agar ($\log \text{ CFU}$). Resultatene fra forsøkene ble valgt framstilt i oversiktsfigurer med diagrammer for hvert enkelt av de tre belysningsforsøkene i en figur. Dette gjorde det lettere å kunne sammenligne og synliggjøre variasjoner innen og mellom forsøkene, noe som ikke kom frem ved å vise figurer der en benyttet et gjennomsnitt mellom de tre forsøkene.

Resultatene fra belysningene på agarskålene viste generelt for alle bakterieartene god reduksjon for begge belysningsmetodene. Bruk av kontinuerlig UVC-lys og puls UV-lys viste drap på over 6,5 log ved kontinuerlig belysning, og mellom 6,5-7,0 log med UV-pulser, noe som støtter effektiviteten ved bruk av UV-belysning som desinfeksjonsmetode på flate, glatte overflater. Selv ved 5 sekunders belysningstid og ved lav pulsdose indikerte resultatene høyt bakteriedrap i forhold til de ubelyste kontrollprøvene. Dette viser at UV-lyset dreper bakteriene når lyset treffer, og at økt UV-dose ikke nødvendigvis gir økt drapeseffekt. Resultatene fra de belyste kyllingprøvene med både kontinuerlig- og puls UV-lys viste noe varierende reduksjoner mellom de ulike belysningsdosene for alle bakterieartene. Prøver belyst med kontinuerlig UVC-lys indikerte en liten økning i antall reduksjoner ved de lengste belysningstidene på 1 og 5 minutter, men forskjellene fra prøver belyst i 5 sekunder var ikke større enn 0,5-1,0 log. Dette forteller at UV-belysning i 5 sekunder ga en reduksjon der økende UV-dose ga liten økning i drap, og at gevinsten ved å øke UV-dosen 60 ganger fra 5 sekunder til 5 minutter er minimal. Overraskende indikerte resultatene fra pulsforsøkene en svak gjennomgående trend der økt UV-belysningsdose ga litt økende reduksjon.

Grunnen til hvorfor de ulike UV-dosene gitt i belyningsmetodene ga varierende resultater mellom tilsvarende prøver i de forskjellige forsøksparallellene, skyldtes mest sannsynlig at bakteriecellene som overlevde lå skjermet for UV-lyset. Ujevnheter i overflatestrukturen eller eventuelle forurensinger i form av diverse partikler er potensielle gjemmesteder som hindrer UV-lyset fra å treffe bakteriene. Når lyset skjermes motvirkes drapeseffekten. Ujevnheter i overflatestrukturen er en utfordring i forhold UV-belysning av kyllingfilet. Dette gjenspeiles i forsøksresultatene fra de belyste kyllingprøvene sammenlignet med log-reduksjonen på de belyste agarskålene. Reduksjon i antall log CFU/cm² kyllingfilet viste sammenlagt for begge metodene og alle gitte UV-doser, rundt 1,0-3,0 log, mens reduksjonen på agar var på >6,5 log CFU. Selv om kolonitallet av de belyste kylling- og agarprøvene tilsa reduksjon i bakterietall, må det tas forbehold om hvorvidt bakteriene faktisk ble drept under belyningsforsøkene. Cellene ble mest sannsynlig ødelagt, men muligheten for at de kan regenerere ved hjelp av reparasjonsmekanismer over tilstrekkelig med tid er tilstede og burde testes.

De gjennomførte belyningsforsøkene viste en sterk indikasjon på at UV-belysning, uavhengig om det er kontinuerlig eller puls UV-lys, er en effektiv behandlingsmetode for reduksjon av bakterielt starttall på fersk, skinnfri kyllingfilet. Forsøkene har fokusert på kvalitetsforringende bakterier naturlig forbundet med kylling, men andre studier har vist at bruk av UV-lys også har stor desinfiserende effekt på patogene mikroorganismer ofte assosiert med kyllingkjøtt. Dette inkluderer spesielt *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* og *Listeria monocytogenes* (Haughton et al., 2011; Keklik et al., 2009; Keklik et al., 2010; Keklik et al., 2012; Paskeviciute et al., 2011).

Belysningsdosene i oppgavens UV-pulsforsøk var definert som lav (1,6 J/cm²) og høy (3,6 J/cm²), hvor 1, 3 eller 5 pulser ved høy dose ble benyttet. Sistnevnte UV-doser tilsvarte belyningsdoser på 10,8 og 18,0 J/cm². Grensen for høyst tillatt UV-dose i belysning av mat er av Food and Drug Administration (FDA) i USA fastsatt til 12,0 J/cm² belyst produktoverflate. Bortsett fra for 5 ganger høy dose var de benyttede UV-dosene innenfor den nevnte grensen, med 3 ganger høy dose rett under grenseverdien. Ved å benytte disse belyningsdosene var det mulig å se hvilke forskjeller dosene eventuelt utgjorde i bakteriereduksjonene, og om økt dose ga noe tilleggseffekt eller merkbare forskjeller i andre egenskaper hos det belyste produktet. Belysningsforsøkene gjort med puls UV-lys indikerte noe høyere reduksjon i bakterietall ved økende antall pulser, men forskjellene fra høy dose 1, 3 eller 5 ganger, varierte og var i noen tilfeller ikke merkbare. For kontinuerlig UVC-

belysning er det i følge Mattilsynet i Norge ingen fastsatte regelverk innen EU (European Union) for bruk på næringsmidler, så lenge kravet om forsvarlig produktsikkerhet er opprettholdt.

Et studium utført av Keklik et al. (2010) med bruk av UV-pulser på benfri kyllingfilet, viste omtrent 2,0 log i reduksjon av bakterietallet av *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311). De aktuelle prøvene var utsatt for puls UV-lys i 15 sekunder med 3 pulser/sekund (1,27 J/cm² per puls), hvor det ved belysningstider lengre enn 15 sekunder ble registrert synlige fargeendringer på produktene. Belysningsdosen disse prøvene ble utsatt for tilsvarte en UV-dose på over 57 J/cm², noe som var betraktelig høyere enn den største dosen benyttet i oppgavens forsøk, og langt over grenseverdien fastsatt av FDA. Selv om den høye belysningsdosen ikke vil være aktuell i industriell produksjonssammenheng, viser studiet hvor effektiv UV-belysning kan være ved bakteriell bekjempelse. Paskeviciute et al. (2011), utførte også belysningsforsøk med fokus på reduksjon av patogener på skinnfri kyllingfilet. I dette studiet ble det benyttet lignende UV-pulsdoser som i denne oppgaven, og 2,0-2,4 log-reduksjon av *S. typhimurium* og *L. monocytogenes* ble oppnådd ved belysning med 5.4 J/cm² per puls. Disse resultatene er rimelig i samsvar med egne resultater, der bakteriereduksjonen for prøver behandlet med høy dose (3,6 J/cm²) eller 3x høy (10,8 J/cm²) henholdsvis lå mellom 1,0-2,5 og 1,0-3,0 log, sammenlagt for både *C. divergens*, *Pseudomonas spp.* og *ESBL-E.coli*. I tillegg til forsøk gjort på kyllingfilet har UV-belysning også blitt brukt på andre produkter som diverse fruktjuicer og cider bestående av eple, appelsin og ananas, samt av jordbær- og mangonektar med god effekt (Keyser et al., 2008; Sauer and Moraru, 2009; Yin et al., 2015). Overflatedekontaminering av kokte spiseklare kjøttprodukt, slikt som kokt skinke og bologna-skinke har også vist gode resultater (Hierro et al., 2011).

Under belysningsforsøkene ble det før og etter belysning foretatt temperaturmålinger av kyllingprøvenes overflate. Hensikten var å undersøke om tilførte UV-doser førte til eventuelle temperaturøkninger i produktoverflaten. Den lille økningen som ble registrert varte bare i noen få sekunder før temperaturen falt raskt ned igjen. Sett fra et industrielt perspektiv er ikke temperaturendringer som følge av UV-belysning et potensielt problem, da kyllingkjøtt har et naturlig kuldereservoar inni kjøttet som vil kjøle overflaten raskt ned igjen etter UV-belysningen. Eventuell bruk av UV-belysning i produksjonssammenheng vil være avhengig av effektivitet, med lett tilgjengelighet og rask belysningstid. Den mest praktiske metoden til bruk i produksjon av ferske kyllingprodukter vil derfor mest sannsynlig være puls UV-lys.

Kort belysningstid i form av intense UV-pulser kan implementeres langs produksjonslinjer med høy hastighet og liten plass, og belysningen kan bidra til økt holdbarhet og produktkvalitet. Opprettholdelse av matsikkerhet i form av inaktivering av eventuelle patogener eller antibiotikaresistente bakterier er også et sentralt fokus. Ved bruk av UV-lys i næringsmiddelproduksjon bør UV-belysningstrinnet være siste hygienebarriere før emballering, eventuelt belysning av allerede emballerte pakker, for å unngå ytterligere kontaminering av produktene. På den måten oppnås det lavere starttall av naturlig forekommen forringelsesflora eller patogener.

I tillegg til å undersøke hvordan starttallet av naturlige forringelsesbakterier på fersk kyllingfilet kunne reduseres, var det interessant å få en indikasjon på hvor mye bakterier som i utgangspunktet befant seg på kyllingfiletene. Under belysningsforsøkene ble det derfor foretatt prøvetaking av ubelyste kyllingfileter for testing av bakgrunnsflora på agarskåler med og uten tilsatt antibiotika. For hver testing ble det benyttet ferske kyllingfileter, innkjøpt for hvert enkelt belysningsforsøk, slik at antall undersøkte fileter ble størst mulig. Skåler tilsatt antibiotikaene rifampicin og ampicillin viste ingen vekst for noen av de undersøkte kyllingfiletene. Dette indikerer at hvis det er penicillinresistente bakterier på de analyserte prøvene, foreligger disse i lavere nivåer enn benyttet deteksjonsgrense på 100 CFU/cm². Disse observasjonene er betryggende med tanke på mattryggheten og den økte forekomsten av antibiotikaresistente bakterier i forbindelse med fjørfe globalt. Norsk kylling er generelt av høy kvalitet, og Norge er et av landene i Europa med minst forekomst av antibiotikaresistente *E. coli*-stammer på fjørfe, noe de observerte resultatene også samsvarer med (Animalia, 2014). Skålene uten tilsatt antibiotika hadde derimot vekst, og viste en indikasjon på bakterietall mellom 3,0-4,8 log CFU/cm² kyllingfilet. Disse tallene tyder på et generelt lavt bakterietall blant undersøkte, ferske kyllingfileter kjøpt i butikk. Utplatingen av bakgrunnsflora ble derimot foretatt på et lite utvalg vekstmedier med inkubasjon på 30 eller 37 °C. Uplating på flere typer medier og bruk av andre inkubasjonstemperaturer som favoriserer typisk forringelsesflora på kylling bør også testes. Bruk av lavere temperaturer kunne blant annet gi større og raskere vekst av eventuelle psykotrofe bakterier. Tilfeller med forhøyet bakterietall på fersk kylling med fortsatt lang holdbarhetstid, trenger nødvendigvis ikke skyldes lavere produktkvalitet fra produsent. Fremskyndelse av kvalitetsforringelse kan forårsakes av flere faktorer, som for eksempel brudd på kjølekjeden av produktene enten ved transport, i butikk eller hos forbruker.

5.3 Produktvurderinger av UV-belyste kyllingfileter

En sensorisk produktvurdering av UV-belyste kyllingfileter behandlet med ulike doser ble foretatt ved hjelp av et profesjonelt sensorisk panel, samt ved en mindre forbrukertest med 20 tilfeldige testpersoner. Produktvurderingen var interessant for å få en indikasjon på om UV-belysningen påvirket de sensoriske egenskapene til belyste kyllingfileter, og hensikten med å bruke et profesjonelt trent smaksdommerpanel var å undersøke om eventuelle signifikante forskjeller mellom prøvene kunne kartlegges og dokumenteres. Den mindre forbrukertesten var interessant for å se om belysningen medførte merkbare kvalitetsendringer som kunne innebære mindre produktaksept blant vanlige forbrukere.

Det trente smaksdommerpanelet kunne skille mellom noen UV-belyste prøver og ubelyste kontrollprøver i forhold til kvalitet. Noen prøver ble av panelet oppfattet som signifikant forskjellige fra de andre prøvene med hensyn på brent lukt, hvilket vil si at flere dommere oppfattet den samme lukten fra de samme prøvene. Likevel var det ingen av kyllingfiletene som ble tildelt ekstremt høye poengsummer for noen av de vurderte luktene. Vurderingsskalaen gikk fra 1-9, hvor prøvene med størst poengsum lå mellom 5-6,4. Dette indikerte at produktkvaliteten generelt ikke var stort påvirket av UV-belysningene. Sammenlignet med de ubelyste kontrollprøvene, som flere dommere oppfattet som prøvene med mest fremtredende lukt for flere av de vurderte luktene, indikerte dette at sensoriske egenskaper ikke forverres som følge av UV-belysning. For en produsent er det først og fremst forbrukernes vurdering og oppfatning av et produkt som er mest interessant. De 20 testpersonene kunne ikke statistisk skille mellom kyllingprøvene, og flesteparten ville spist de vurderte filetene til dagens middag. Kvalitetsrangeringen viste at den ubelyste kontrollprøven fikk noe lavere poengsum enn de belyste prøvene, selv om dette ikke var statistisk signifikant. I likhet med resultatene fra den profesjonelle produktvurderingen indikerer dette at de belyste kyllingfiletene hadde samme sensoriske kvalitet som de ubelyste filetene. Kvalitetsvurderinger er et resultat av forbrukernes personlige oppfatninger. Store standardavvik for de vurderte prøvene viste at hver testdeltaker hadde sin egen subjektive mening om kvaliteten på kyllingfiletene, og kvaliteten ble oppfattet ulikt blant de forskjellige deltakerne. Siden forbrukertesten ble gjennomført med kun 20 personer viser resultatene bare en indikasjon på hvordan UV-belyst kyllingfilet oppfattes blant vanlige forbrukere. Det er mulig at med en større forbrukerundersøkelse med langt flere deltakere (100-150 personer

eller flere) vil en kunne oppdage eventuelle små signifikante forskjeller. Det kan også være nyttig å definere bestemte målgrupper, som for eksempel kjønn og alder.

Resultatene gitt fra de sensoriske produktvurderingene ga generelt en indikasjon på at de UV-belyste kyllingfiletene ikke bar preg av store merkbare endringer i kvalitet. Forskning rundt bruk av UV-belysning som alternativ til termiske konserveringsmetoder er fortsatt et område under stadig utforskning. Flere studier har vist positive effekter ved bruk av UV-lys der sensoriske produktforandringer har vært mindre enn ved termiske behandlinger uten å gå på bekostning av mattryggheten (Falguera et al., 2011). Ytterligere kunnskap rundt temaet er likevel fortsatt en nødvendighet. Forsøkene gjort i denne oppgaven har vist at det er grunnlag for utførelse av flere analyser og videre testing av eventuelle produktforandringer som kan oppstå som følge av UV-belysning. Ved å gjennomføre flere lagringsforsøk der en ser på kylling belyst i aerob kontra anaerob atmosfære, kan en undersøke om det oppstår blant annet flere luktdannelser, synlige fargeendringer, raskere harskningsforbindelser eller andre kjemiske reaksjoner under lagringstiden. Eventuelle forskjeller i produktkvaliteten som følge av belysningsatmosfæren vil da kunne sammenlignes. Slike analyser og forsøk er blant annet interessante å gjennomføre på kyllingfileter behandlet med puls UV-lys 3 og 5 ganger høy dose. Analysene gjør det mulig å se hvordan UV-dosen større enn grensen fastsatt av FDA påvirker produktkvaliteten, og om den utgjør forskjeller i forhold til produkt behandlet med UV-doser innenfor grensen. Lagringsforsøk og analyser av sensoriske og kjemiske egenskaper på produkt belyst i modifisert atmosfære er også nyttig i industrielt sammenheng. UV-belysning av allerede emballerte produkt kan være ønskelig siden sjansen for rekontaminering av produktene er mindre ved belysning direkte i emballasjen. Tilstrekkelig kunnskap om hvordan pakkegassen eventuelt påvirker produktkvaliteten vil dermed være nødvendig.

5.4 Konklusjon og videre arbeid

Utførte forsøk viste at kontinuerlig UVC-belysning og puls UV-lys var to raske, enkle og effektive metoder for god reduksjon i bakterietall av *C. divergens*, *Pseudomonas spp.* og ESBL-produserende *E. coli*. Belyste kyllingfileter viste liten endring i sensoriske egenskaper og produktkvalitet. Ingen store forskjeller mellom de benyttede belysningsmetodene ble observert i forhold til antall bakteriedrap, hvor generell reduksjon lå mellom 1,0-3,0 log for alle bakterieartene. Resultatene indikerte god drapeseffekt uavhengig av UV-dose, hvor økt dose ga lite økning i log-reduksjonen.

Ved videre arbeid basert på dette studiet kan det være interessant å utføre tilsvarende forsøk og analyser med bakteriearten *B. thermosphacta*, da arten utgjør en meget sentral del av forringelsesflora på kylling. Utførelse av flere og mer omfattende lagringsforsøk med kyllingfileter belyst i ulik atmosfære kan også være aktuelt for videre kjemiske og sensoriske analyser. Det mikrobiologiske nivået på belyste prøver i etterkant av forsøkene er også noe som er verdt å undersøke nærmere. For å oppnå sikrere data i forhold til sensoriske produktvurderinger er det viktig å gjennomføre større forbrukerundersøkelser, med et stort utvalg forbrukere, og eventuelt definerte målgrupper. Tilsvarende belysningsforsøk utført i studiet kan også være interessante å teste ut i næringsmiddelbedrifter. Gjennomføring av UV-belysninger på selve produksjonslinjen, med etterfølgende mikrobiologiske tester, gir innblikk i hvordan belysningsmetodene fungerer i praksis. Dette gir mulighet til å finne praktiske løsninger på hvordan UV-belysning best kan implementeres som dekontamineringsmetode i en bedrift.

6.0 Referanser

- Animalia. 2014. *Kjøttets tilstand 2014 – status i norsk kjøtt- og eggproduksjon*.
[<http://www.animalia.no/Kjottets-tilstand/Kjottets-tilstand-2014/>]
- Appicciafuoco, B., Dragone, R., Frazzoli, C., Bolzoni, G., Mantovani, A. & Ferrini, A.M. 2015. *Microbial screening for quinolones residues in cow milk by bio-optical method*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **106** (2015) s. 179-185
- Basaran, N., Quintero-Ramos, A., Moake, M.M, Churey, J.J. & Worobo, R.W. 2004. *Influence of apple cultivars on inactivation of different strains of Escherichia coli O157:H7 in apple cider by UV irradiation*. Applied and Environmental Microbiology **70** (2004) s. 6061-6065
- Campos, C.B., Fenner, I., Wiese, N., Lensing, C., Christner, M., Rohde H., Aepfelbacher M., Fenner, T. & Hentschke M. 2014. *Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany*. International Journal of Medical Microbiology **304** (2014) s. 678-684
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, J.G., Villani, F. & Ercolini, D. 2015. *Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage*. Food Microbiology **45** (2015) s. 83-102
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. & Tiedje, J.M. 2009. *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis*. Nucleic Acids Research **37** (2009) s. D141-D145
- Collins, M.D., Farrow, A.E., Phillips, B.A., Fesusu, S. & Jones, D. 1987. *Classification of Lactobacillus divergens, Lactobacillus piscicola, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, Carnobacterium*. International Journal of Systematic Bacteriology **37** (1987) s. 310-316
- Davies, A. and Board, R. 1998. *The Microbiology of Meat and Poultry*. 1. utg. Blackie Academic & Professional, ISBN 0-7514-0398-9
- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani F. & Nychas J.G. 2012. *Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions*. International Journal of Food Microbiology **157** (2012) s. 130-141

- Falguera, V., Pagà, J., Garza, S., Garvìn, A. & Ibarz, A. 2011. *Ultraviolet processing of liquid food: A review: Part 2: Effects on microorganisms and on food components and properties*. Food Research International **44** (2011) s. 1580-1588
- Feklistov, A., Mekler, V., Jiang, Q., Westblade, L.F., Irschik H., Jansen, R., Mustaev, A., Darst, S.A. & Ebricht, R.H. 2008. *Rifamycins do not function by allosteric modulation of binding of Mg²⁺ to the RNA polymerase active center*. PNAS – The National Academy of Sciences of the USA **105** (2008) s. 14820-14825
- Fellows, P.J. 2009. *Food processing technology – Principles and practice*. 3. utg. Woodhead Publishing Limited, ISBN 978-1-84569-216-2
- Folkehelseinstituttet. 2015. *ESBL og annen utvidet resistens mot beta-laktam-antibiotika hos gramnegative staver – veileder for helsepersonell*. Smittevernveilederen. [<http://www.fhi.no/artikler/?id=100610>]
- Gòmez-Lòpez, V.M, Ragaert, P., Debevere, J. & Devlieghere, F. 2007. *Pulsed light for food decontamination: a review*. Trends in Food Science and Technology **18** (2007) s. 464-473
- Haughton, P.N., Lyng, J.G., Cronin, D.A., Morgan, D.J., Fanning, S. & Whyte, P. 2011. *Efficacy of UV light treatment for the microbiological decontamination of chicken, associated packaging, and contact surfaces*. Journal of Food Protection **74** (2011) s. 281-288
- Hierro, E., Barroso, E., Lorenzo H., Ordóñez, J.A., Manzano, S. & Fernández, M. 2011. *Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of Listeria monocytogenes on ready-to-eat cooked meat products*. Innovative Food Science and Emerging Technologies **12** (2011) s. 275-281
- Hoel, K. 2012. *Overførbar antibiotikaresistens i tarmbakterier: ESBL/AmpC*. Mattrygghet – Kjøttets tilstand 2012. Animalia. [<http://www.animalia.no/Kjottets-tilstand/Kjottets-tilstand-2012/>]
- Janda J.M. and Abbott, S.L. 2007. *16S rRNA Gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls*. Journal of Clinical Microbiology **45** (2007) s. 2761-2764
- Jöborn, A., Dorsch, M., Olsson C.J., Westerdahl, A. & Kjellberg S. 1999. *Carnobacterium inhibens sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (Salmo salar)*. International Journal of Systematic Bacteriology **49** (1999) s. 1891-1898

- Keklik, N.M., Demirci, A. & Puri, V.M. 2009. *Inactivation of Listeria monocytogenes on unpackaged and vacuum-packaged chicken frankfurters using pulsed UV-light*. Journal of Food Science **74** (2009) s. 431-439
- Keklik, N.M., Demirci, A. & Puri, V.M. 2010. *Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light*. Poultry Science **89** (2010) s. 570-581
- Keklik, N.M., Demirci, A., Puri, V.M. & Heinemann, P.H. 2012. *Modeling the inactivation of Salmonella typhimurium, Listeria monocytogenes, and Salmonella enteritidis on poultry products exposed to pulsed UV light*. Journal of Food Protection **75** (2012) s. 281-288
- Keyser, M., Müller, I.A., Cilliers, F.P., Nel, W. & Gouws P.A. 2008. *Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice*. Innovative Food Science & Emerging Technologies **9** (2008) s. 348-354
- Kilcher, S., Loessner, M.J. & Klumpp, J. 2010. *Brochothrix thermosphacta bacteriophages feature heterogeneous and highly mosaic genomes and utilize unique prophage insertion sites*. Journal of Bacteriology **192** (2010) s. 5441-5453
- Koutchma, T. 2009. *Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods*. Food and Bioprocess Technology **2** (2009) s. 138-155
- Krishnan, K.R., Babuskin, S., Babu, P.A.S, Sasikala, M., Sanbina, K., Archana, G., Sivarajan, M. & Sukumar, M. 2014. *Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat*. International Journal of Food Microbiology **171** (2014) s. 32-40
- Laursen, B.G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P. & Leisner, J.J. 2005. *Carnobacterium divergens and Carnobacterium maltaromaticum as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization*. Systematic and Applied Microbiology **28** (2005) s. 151-164
- Law, J.W.F., Mutalib, N.S.A., Chan, K.G. & Lee, L.H. 2015. *Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations*. Frontiers in Microbiology **5** (2015) s. 1-19
- Lawless, H.T. and Heymann, H. 2010. *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. 2. utg. Springer Science & Business Media New York, ISBN 978-1-4419-6487-8
- Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prévost, H., Drider, D. & Dalgaard, P. 2007. *Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods*. FEMS Microbiology Reviews **31** (2007) s. 592-613

- Liang, R., Yu, X., Wang, R., Luo, X., Mao, Y., Zhu, L. & Zhang, Y. 2012. *Bacterial diversity and spoilage-related microbiota associated with freshly prepared chicken products under aerobic conditions at 4 °C*. Journal of Food Protection **75** (2012) s. 1057-1062
- Luo, W., Chen, M., Dong, W. & Hou, X. 2014. *Comparison of sterilization efficiency of pulsed and continuous UV light using tunable frequency UV system*. Innovative Food Science & Emerging Technologies **26** (2014) s. 220-225
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. & Clark, D.P. 2009. *Brock – Biology of Microorganisms*. 12. utg. Pearson Benjamin Cummings, ISBN 978-0-321-53615-0
- McPherson, M.J., Hames, B.D. & Taylor G.R. 1995. *PCR 2 – a practical approach*. 1. utg. Oxford University Press, ISBN 0-19-963425-4
- Nofima. 2015. *Sensorikk*
[<http://nofima.no/forskningsomrade/sensorikk-forbruker-og-innovasjon/sensorikk/>]
- Paskeviciute, E., Buchovec, I. & Luksiene, Z. 2010. *High-power pulsed light for decontamination of chicken from food pathogens: A study on antimicrobial efficiency and organoleptic properties*. Journal of Food Safety **31** (2011) s. 61-68
- Patel, J.B. 2001. *16S rRNA Gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory*. Molecular Diagnosis **6** (2001) s. 313-321
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M.F., & Zagorec, M. 2015. *Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties*. Food Microbiology **45** (2015) s. 45-53
- Sauer, A. and Moraru, C.I. 2009. *Inactivation of Escherichia coli ATCC 25922 and Escherichia coli O157:H7 in apple juice and apple cider, using pulsed light treatment*. Journal of Food Protection **5** (2009) s. 937-944
- Stasika-Róžańska, L., Blażejczak, S. & Gientka, I. 2014. *Effect of glycerol and dihydroxyacetone concentrations in the growth of acetic acid bacteria Gluconobacter oxydans ATCC 621*. European Food Research and Technology **239** (2014) s. 453-461
- Tewari, D., Cieply, S. & Livengood, J. 2011. *Identification of bacteria recovered from animals using the 16S ribosomal RNA gene with pyrosequencing and Sanger sequencing*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **23** (2011) s. 1104-1108
- Veterinærinstituttet. 2014. *Fakta om ESBL/AmpC-produserende E.coli*.
[<http://www.vetinst.no/index.php/nor/Faktabank/ESBL>]

- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. & Whitman, W. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. 2. utg. Springer Science & Business Media New York, ISBN 978-0-387-68489-5
- Wasteson, Y. 2007. *Escherichia coli* I: P.E. Granum (red.) *Matforgiftning: Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*. 3. utg. Høyskoleforlaget as, ISBN 10 82-7634-625-1
- Yin, F., Zhu, Y., Koutchma, T. & Gong, J. 2015. *Inactivation and potential reactivation of pathogenic Escherichia coli O157:H7 in apple juice following ultraviolet light exposure at three monochromatic wavelengths*. *Food Microbiology* **46** (2015) s. 329-335

Oppskrift og tillaging av vekstmedier

Alle vekstmedier ble tillaget med destillert vann og sterilisert ved certoklaving (Certoclav Sterilizer GmbH, A-4050 Østerrike).

Vekstmedium	Ant. gram/liter destillert vann
BHI-agar (Oxoid, England)	47
BHI-buljong (Oxoid, England)	37
TSA (Oxoid, England)	40
TSB (Oxoid, England)	30

Mediene i den overstående tabellen ble certoklavert ved 121 °C i 15 minutter.

cMRS-medium

Kjemikalie	Produsent	Ant. gram/liter
Ammonium citrat (tribasic)	Sigma-Aldrich, Tyskland	2,125
K ₂ HPO ₄	Merck, Tyskland	2
MgSO ₄	Merck, Tyskland	0,02
MnSO ₄ * 1 H ₂ O	Merck, Tyskland	0,02
Pepton Proteose Nr. 3	DIFCO, USA	10
Sucrose (D(+)-Saccharose)	VWR, Belgia	20
Yeast extract	Oxoid, England	5

Medium for agarskåler ble tilsatt 15 g Agar Bacteriological (Agar no.1, Oxoid, UK) pr liter destillert vann. pH i mediet ble justert til 8,5 ved hjelp av NaOH før certoklaving ved 115 °C i 20 minutter.

Vekstmedium tilsatt antibiotika

Tilsats av antibiotika til vekstmedier ble gjort etter minimum 30 minutters avkjøling i vannbad (48-50 °C), før fordeling i petriskåler i passende mengde. Tilstrekkelig avkjøling av vekstgaren er essensielt for å unngå inaktivering av det tilsatte antibiotikumet.



INTENSE PULSED UV SYSTEM XeMaticA-1L-SA

semi-automatic 1 lamp R&D system

for evaluation tests in food, bio-medical and pharmaceutical applications:

- pulse energies from 100 J to 1000 J,
- front DC Voltmeter calibrated in Joules,
- 180° to 360° product exposure with side and bottom reflectors,
- Ozone and Mercury free.

El connection: #1: EU-standard: 235 VAC, one phase, 50-60 Hz, 200 w ave.

#2: USA: 208 VAC, 1 phase, 50-60 Hz,

Size, weight:

60 cm wide x 58 cm high x 48 cm deep, food-grade stainless-steel, weight ca. 40 kg.

UV chamber:

- 24 cm wide x 24 cm high x 24 cm deep,
- all lined with Aluminum 99.8% reflectors,
- uniform UV flux under the sample shelf.

Flash lamp type and spectra:

- Xe gas filled (no Mercury!) flash-lamp
- Flash lamp is water-cooled, removing Ozone and IR (heat) from reaching samples,
- NO HEAT WAVE no Ozone on samples!
- included 3 types of Reflectors,
- 19 cm active length, or up to **50 J/cm** length,
- UVC, UVB and UVA outputs increase with increase of a pulse energy,
- UVC or UVB water filled filters to remove visible light) - as paid options,
- **The Max UVC flux** on a product: **2J/cm²/pulse.**

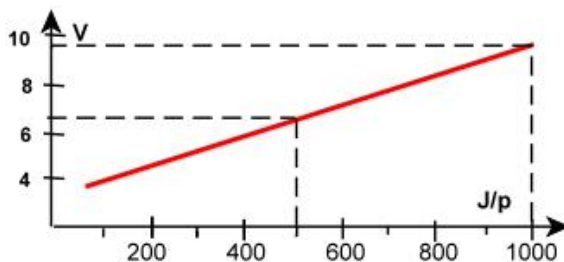
Max Sterilization Efficiency:

bacteria- 4-6 logs / pulse, spores: 2-3 logs / pulse.

- **distance** between lamp module and a sample shelf is adjustable with a step of 2cm,
- **Reflectors** can be easily changed.

Safety: during the system operational cycle the chamber door is automatically locked, no UV or EM fields leak out.

Analogue voltmeter 10 V to select pulse energies:



Our PUV systems are in use worldwide and

© 2014 SteriBeam Systems GmbH,
Gottlieb-Fecht Str. 32,
D-77694 Kehl-Kork am Rhein



Water filled UVB or UVC filter between the water cooled flash lamp module and the sample shelf.



Three easy changeable reflectors with footprints 5x20 cm, 10x20 cm and 20x20 cm to vary UV fluxes to fit variety of products.

Paid Option 1: UV control:

- a free positioned UV sensor, and a PC Scope, also to measure a UV transparency of plastic foils.



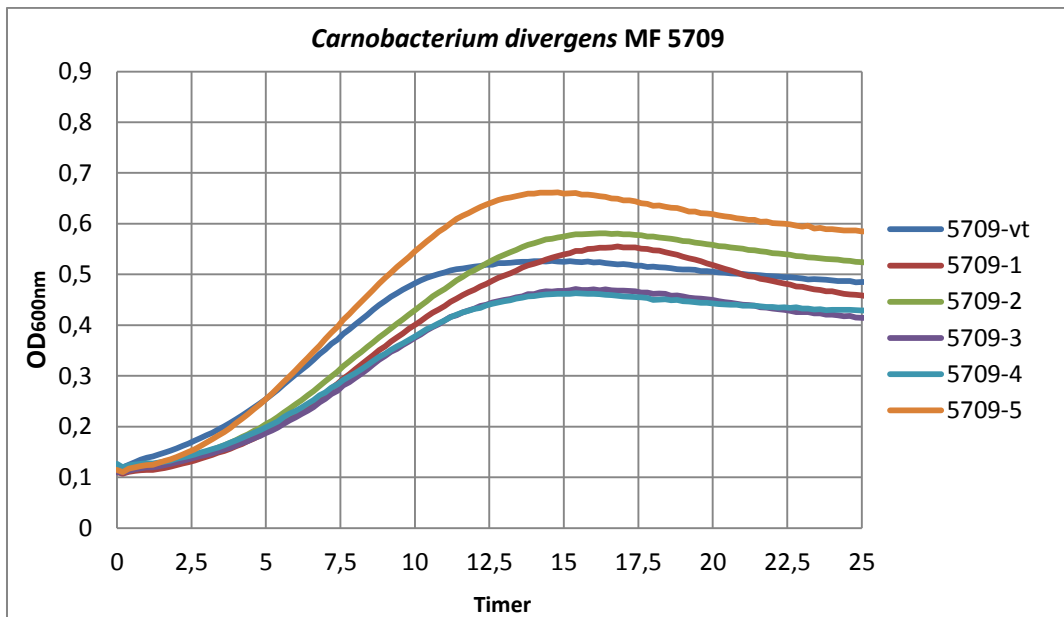
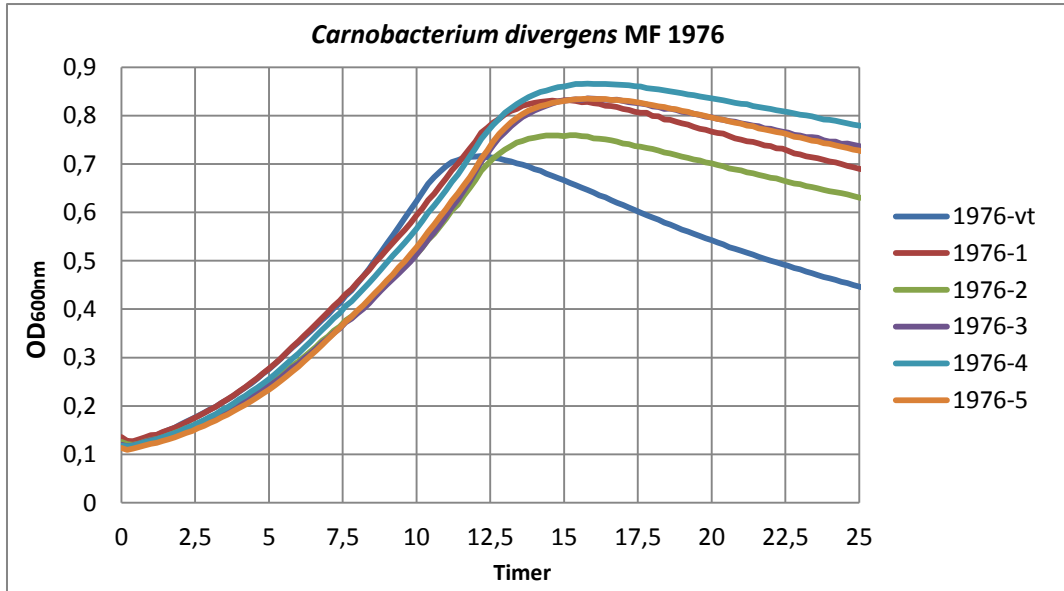
Paid Option 2: UVC, UVB filters to block visible and IR light:

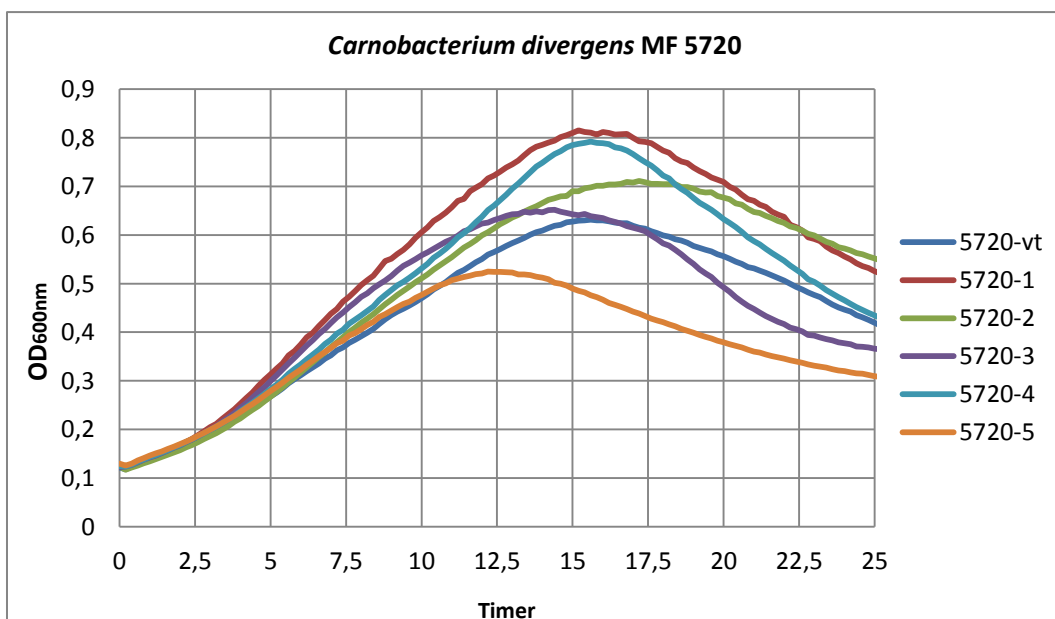
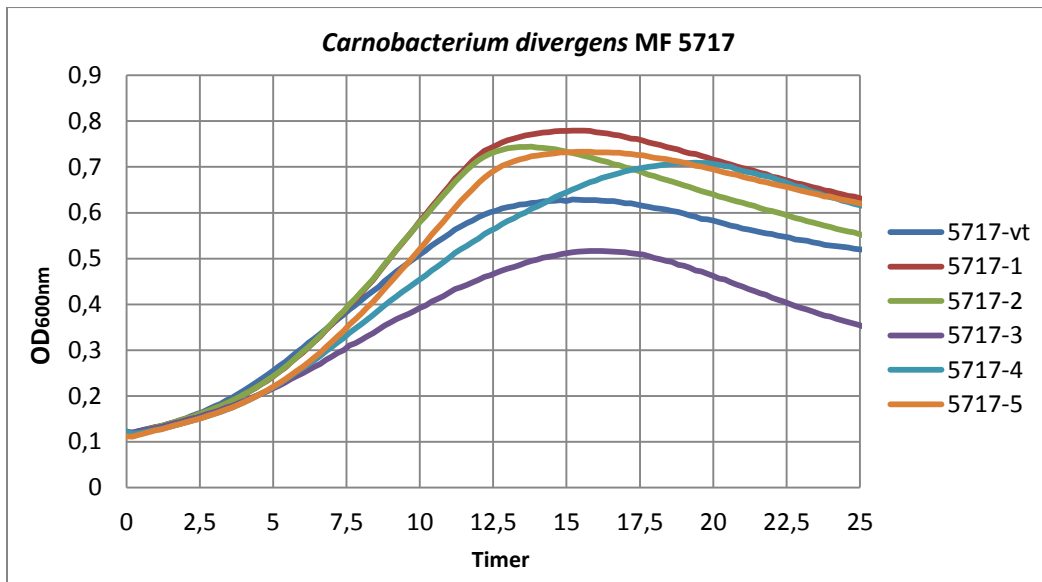
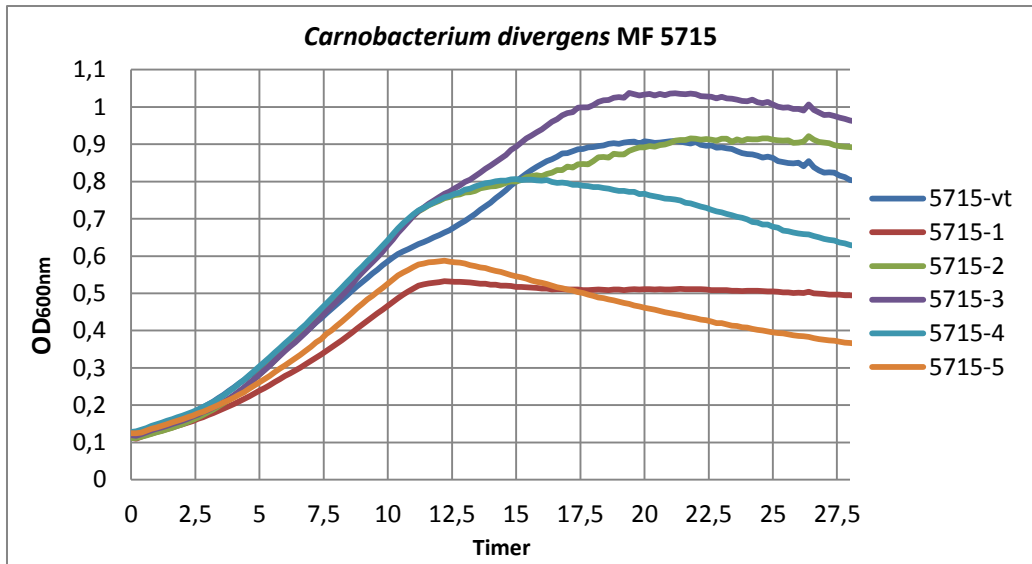


were successfully tested in leading EU labs.

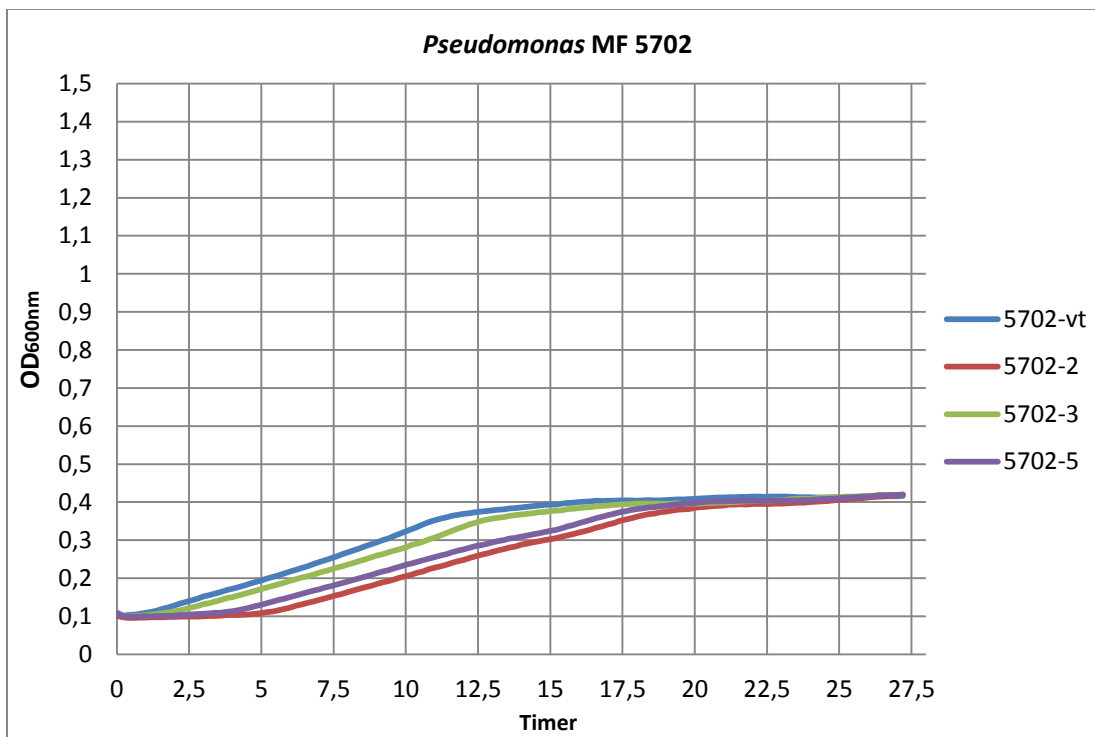
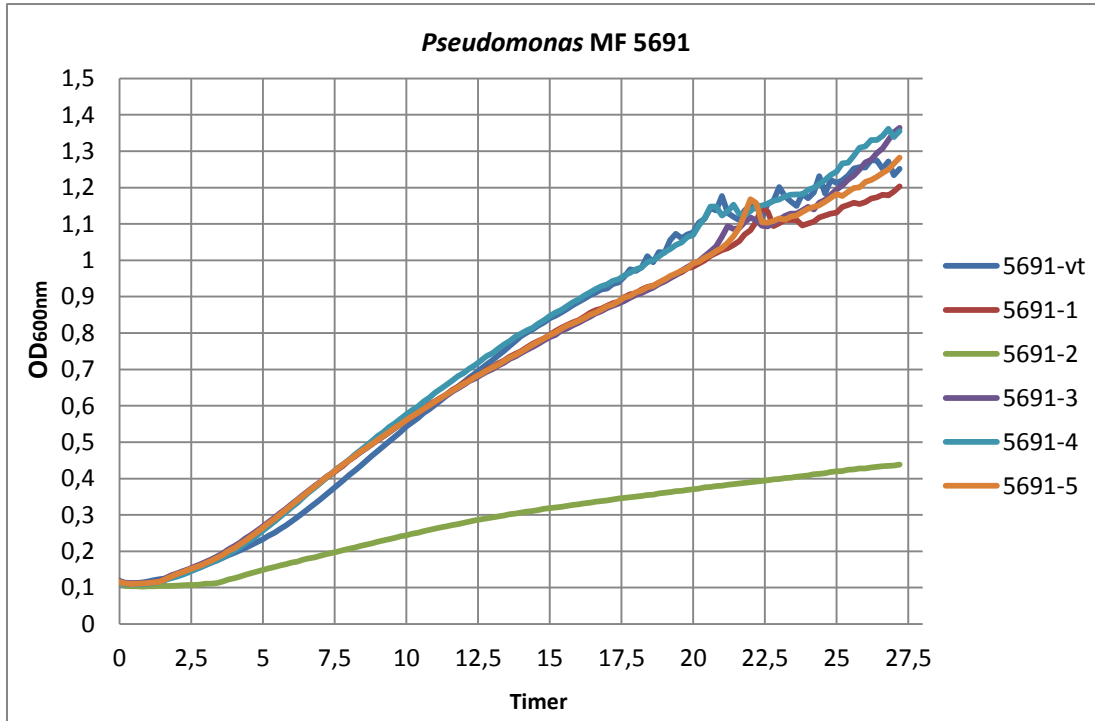
Tel. (+49) 07851 - 99 47 68 13; Fax - 899 331
info@steribeam.com www.steribeam.com

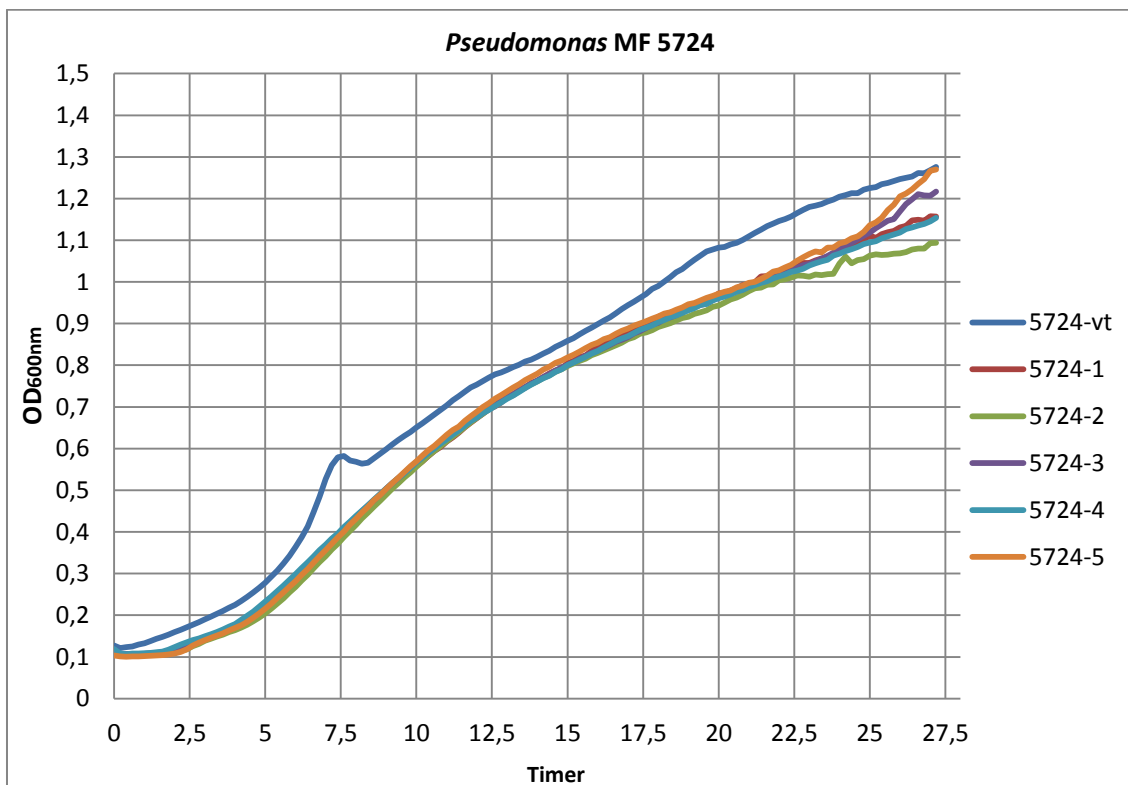
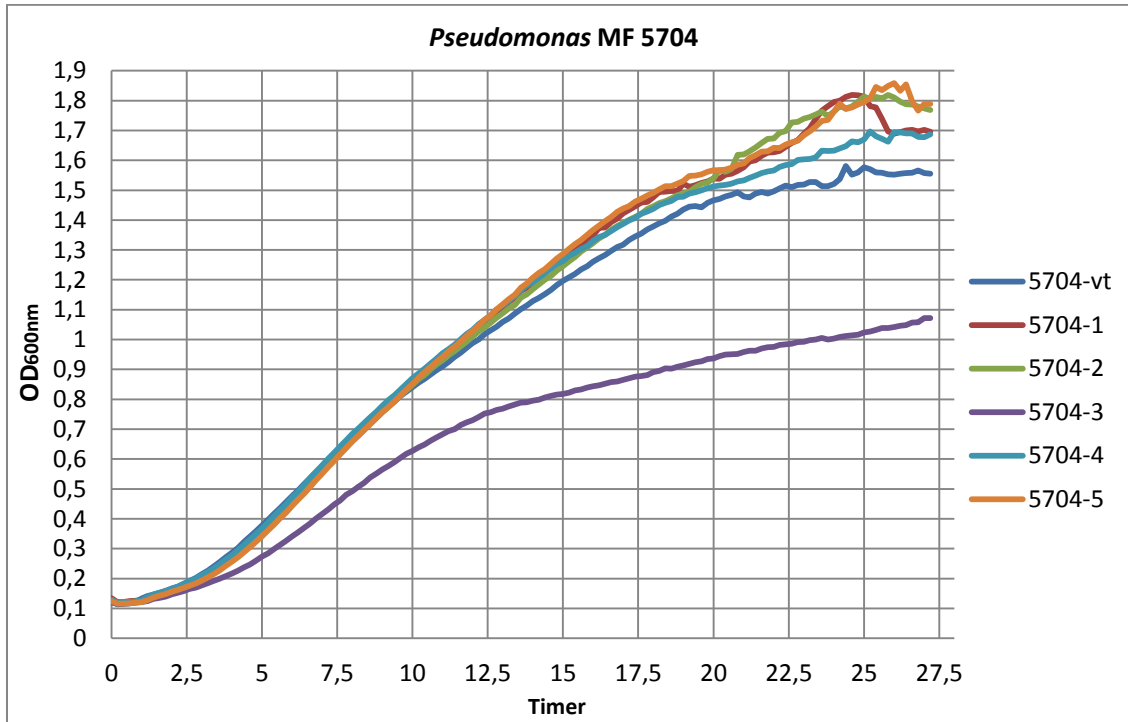
Vekstkurver fra bioscreen-analyse av *Carnobacterium divergens*-stammer (villtype og tilhørende antibiotikaresistente mutanter)





Vekstkurver fra bioscreen-analyse av *Pseudomonas*-stammer (villtype og tilhørende antibiotikaresistente mutanter)







Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no