

Afslutningsrapport

Vækst og overlevelse af patogene bakterier i ost

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1998-20

Oktober 1998



mejeriforeningen

danish dairy board

Mejeriforeningen

Afslutningsrapport over FØTEK samarbejdsprojektet

Vækst og overlevelse af patogene bakterier i ost

Projektleder:

Lektor Susanne Knøchel, Ph.D. (i projektperioden aflønnet af FØTEK basis-midler)

Mejeri-og Levnedsmiddelinstituttet

KVL

Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg

Tel. 35 28 32 58. Fax 35 28 32 31. E-mail skn@kvl.dk

Medarbejdere:

Christine Little, Ph.D. (fra 1/10-92 til 1/10-93)

Søren Bo Madsen, cand. brom. (fra 1/8-92 til 18/3-94)

Karina Jensen, cand. lact. (fra 1/1-94 til 1/3-95)

Anette Granly Larsen, cand. brom., Ph.D. (fra 17/1-94 til 1/5-95)

Anette Kamuk Kristiansen, cand. brom. (fra 6/3-95 til 6/10-95)

AnneMarie Mikkelsen, laboratorietekniker (til 1/3-95)

Pernille Ildved, laboratorietekniker (fra 1/3-95 til 25/9-95)

Medarbejderne på projektet ønsker at takke Mejeribrugets Forskningsfond, Strukturdirektoratet, Erhvervsfremmestyrelsen og Undervisningsministeriet for økonomisk støtte.

Resumé

Projektet har bidraget til at øge forståelsen af de kemisk-fysiske og mikrobielle faktorer, der påvirker vækst og overlevelse af patogene bakterier i ost. Der har internationalt været en del større udbrud i de senere år med enkelte dødsfald til følge. Størstedelen af de større udbrud skyldes brug af råmælk eller utilstrækkelig varmebehandlet mælk, hvor bakterierne efterfølgende har haft lejlighed til at vokse under fremstillingsprocessen og/eller lagring. Den mest varmeresistente vegetative patogene bakterie associeret med mælk er *Listeria monocytogenes*. Projektet har vist at der kan være >20-fold forskel i D-værdi afhængig af cellekulturens forhistorie og hvilket vækst- og opvarmningsmedium, der anvendes. Ved behandlinger i det lave termiseringsområde (15-17 sekunder v.60°C) kan der ikke forventes noget drab.

Syrningen er den anden vigtige barriere. Med udgangspunkt i *Salmonella sp.*, *Yersinia enterocolitica* og *Bacillus cereus* er det vist, at cellekulturens forhistorie også her har betydning for overlevelsen ved lavt pH, idet celler der er eksponeret for suboptimalt pH (pH 5.5 i 1 time) har en markant bedre overlevelse ved letalt lavt pH end ikke-eksponerede celler. Forskellen er størst for voksende kulturer og mindst for stationære kulturer, der også har højere syrerensistens. Lav temperatur bevirker også at syrerensistensen stiger. Propionsyre, eddikkesyre og mælkesyre har meget større drabseffekt end citronsyre eller uorganisk syre ved samme pH. Rækkefølgen blandt de organiske syrer mht. drabseffekt ændres dog, hvis de sammenlignes på ekvimolær basis. Det er vigtigt at optimere genfindelsen af stressede/beskadigede celler for at bestemme overlevelsespotentialer. Med syrestress/beskadigelse som eksempel er det vist, at de undersøgte overlay-teknikker, hvor agaren med det selektive princip først tilsættes efter en resuscitationsperiode, gav en langt bedre genfindelse og forskellen blev mere markant jo længere cellerne havde været eksponeret for lavt pH. Samtidig blev den selekterende virkning bibeholdt. Disse resultater har både betydning i en risikovurdering og når der skal gennemføres challenge-forsøg.

Foruden de mere kendte interaktioner med mælkesyrebakterier, er der også mulighed for at skimmelstarterkulturer kan influere væksten af de patogene bakterier. Selvom der normalt er tale om en stimulering på grund af øget pH, er der i laborieforsøg i nogle tilfælde påvist hæmmende effekt forårsaget af flygtige forbindelser dannet af nogle *Penicillium camemberti*.

Forsøg med podning af overfladen af syv typer færdigmodnede danske oste med *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* og psykrotrofe *Bacillus cereus* viste, at der generelt ikke observeredes vækst på oste med pH<5.9 og salt-i-vand%>5 v. 15°C. Ved 5°C sås kun vækst i en blå- og hvidskimmelost med højt pH og lavt saltindhold. Tilgængelige prædiktioner af mikrobiel vækst (FoodMicroModel, Pathogen Modelling Program) baseret på bakteriernes vækst i flydende medier med temperatur, pH og salt% som parametre forudsagde vækst under langt flere forhold end observeret inkl. forhold, hvor der var tale om en betydelig reduktion. En undersøgelse af vækstkinetikken på Brie viste, at der generelt blev prædikeret for høj væksthastighed, mens nølefaserne godt kunne være kortere end forudsagt via modeller.

De mest sårbare oste er overflademodnede oste med højt pH og lavt saltindhold som Brie. Hvis der sker en kontaminering efter pasteuriseringen, kan mange patogene bakterier vokse selvom syrningen fungerer normalt. Der kan være en begrænset drabseffekt, primært i centrum af Brien, men væksten begynder så snart pH begynder at stige. Der sås dog ikke tydelig vækst af *Bacillus cereus*, hvis sporer hyppigt forekommer i mælk, ved 15°C og derunder.

Projektformål

Det overordnede formål med projektet er at opnå en øget forståelse af de faktorer, der påvirker vækst og overlevelse af sygdomsfremkaldende bakterier i ost for derigennem at kunne sikre den sikkerhedsmæssige kvalitet.

Mere specifikt er det projektets formål er at undersøge patogene bakteriers overlevelse og vækst i ost og mulighederne for at prædiktere dette forløb. Dette undersøges ved at se på følgende spørgsmål:

- Hvilke patogene bakterier er eller kan blive relevante ?
- Hvilke oste og hvilke ostningsprocesser er mest kritiske ?
- Hvordan vokser disse patogener under produktion og lagring ?
- Kan dette modelleres i bouillon-forsøg og bruges til at prædiktere vækst/overlevelse ?
- Hvilke faktorer har størst betydning for væksten ?
- Kan en gradvis adaptation til stress påvirke bakteriernes overlevelsessevne ?
- Hvilke mikrobielle interaktioner kan påvirke vækst og overlevelse ?

Bemærkning: I den oprindelige ansøgning var nævnt, at ændringer i varmetolerancen som følge af stress også ville blive undersøgt. Dette er primært sket via et projekt finansieret af basis-midler (Frieda Jørgensen: Survival of stressed foodborne bacteria: factors affecting thermotolerance in Listeria monocytogenes. Ph.D.thesis). Nogle relevante resultater herfra er derfor medtaget.

Projektets aktiviteter:

- Litteraturstudier
- Udvalgelse og karakterisering af relevante patogene isolater, ostetyper og -processer
- Etablering af metoder til genfindelse af stressede celler
- Effekt af pH og syrerest på overlevelse af syrestressede og ikke-syre stressede patogener samt undersøgelse af *B. cereus* overlevelsessevne ved lavt pH
- Interaktionseksperimenter med starterkulturer og patogener
- Vækst og overlevelse under produktion og lagring samt udvikling/afprøvning af modeller til beskrivelse af vækst og overlevelse af patogener

Resultater

Litteraturstudier har vist at en lang række patogener kan isoleres fra mælk, mens færre er isoleret fra ost og kun få er indtil nu sat i forbindelse med ostebårne udbrud (tabel 1).

Tabel 1. Mælke-/osteassocierede patogene bakterier

Patogene bakterier isoleret fra mælk	Oprindelse h, b, m*	Isoleret fra ost	Verificeret som årsag til oste udbrud
Gram negative			
<i>Salmonella</i> sp.	h, b, m	+	+
<i>E. coli</i> (patogene)	h, b	+	+
<i>Shigella</i>	h		+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	?, b, m	+	
Andre enterobakterier	b, m	+	
<i>Campylobacter</i> sp.	h, b, m,		
<i>Aeromonas</i> sp.	m		
<i>Vibrio</i> sp.	m		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	b, m		
<i>Brucella</i> sp.	b	+	+
Gram positive			
<i>Bacillus cereus</i>	b, m	+	(+)**
<i>Bacillus anthracis</i>	b		
<i>Clostridium perfringens</i>	h, b, m		
<i>Clostridium botulinum</i>	m	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	h, b	+	+
Patogene <i>Streptococcus</i> sp.	b	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	b, m	+	+
<i>Actinomyces ulcerans</i> (tidl. <i>Corynebacterium</i> u.)	b		
<i>Mycobacterium bovis</i>	b	+	+

*h=human, b=bovin (dvs. fra koen), m=miljø

** *Bacillus cereus* fundet i oste involveret i dansk udbrud, men oplysningerne vedrørende sygdomsassociation er mangelfulde

Inden for årene 92-97 har der i Europa været 10 publicerede ostebårne udbrud, hvoraf der har været dødsfald i de 6 af udbruddene. De implicerede organismer har været *Listeria monocytogenes*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella dublin*, *Salmonella gold-coast*, verotoxinproducerende *E.coli*, *Brucella melitensis* og *Clostridium botulinum*. Herudover har der været en del tilfælde, hvor oste, typisk som ingrediens i burgere, sandwiches eller salater, har været under mistanke, men hvor sagen ikke er blevet fuldt belyst samt en lang række tilbagekaldelser p.gr.a. fund af patogene bakterier.

Det samlede billede er, at bløde og halvbløde oste, specielt de overflademodnede, er hyppigst associerede med udbrud. Flertallet af udbruddene skyldes oste lavet på råmælk eller fejlpasteuriseret mælk og de patogene bakterier, der oftest er involverede er *Salmonella*. spp., *Listeria monocytogenes* og verotoxinproducerende *E.coli*. Globalt set har der dog også været en række tilfælde fra oste lavet på pasteuriseret mælk, hyppigt forårsaget af *Salmonella* – infektioner eller intoksikationer p.gr.a. *Staphylococcus aureus* toxin (ofte dannet før pasteurisering).

Ud fra den danske situation blev det besluttet at arbejde med termostabiliseret Brie (dvs høj pH Brie) produceret på pasteuriseret mælk som osteeksempel. Som organismer blev *Salmonella* valgt samt *Bacillus cereus* og *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella* blev valgt fordi den hyppigst er involveret i udbrud. *Bacillus cereus* blev valgt, fordi den optræder hyppigt i dansk mælk, ikke inaktiveres af pasteurisering og fordi den, teoretisk set, skulle kunne vokse i flere oste. Nogle isolater er psykrotrofe. Normalt undersøges der dog ikke for denne organisme og det kunne derfor tænkes, at den var overset. *Yersinia enterocolitica* er blevet isoleret fra både mælk, ost og det generelle mejerimiljø, kan vokse ved kølerumstemperatur og kunne derfor også være et hidtil upåagtet problem.

Med hensyn til *Listeria monocytogenes* og verotoxinproducerende *E.coli* var der igangværende eller allerede afsluttede projekter på disse bakteriers overlevelse i bløde oste i flere lande (Back et al. 1993; Ryser & Marth 1987; Frank et al. 1977) og disse bakterier indgik derfor ikke i Brie-forsøgene. *Listeria monocytogenes* blev dog inddraget i undersøgelsen af vækst på overfladen af danske ostetyper samt i undersøgelser af varmeresistens, da det er den mest varmeresistente af de ikke-sporedannende patogene bakterier.

Pasteurisering: Adaptation og overlevelse

Pasteuriseringen er et kardinalpunkt sikkerhedsmæssigt. Hvis mælken termiseres ved lav temperatur eller pasteuriseringsprocessen ikke er styret, er varmedrab, specielt for *Listeria monocytogenes*, meget begrænset (tabel 2).

Tabel 2. Varmedrab ved termisering af mælk

Patogen bakterie (ikke-sporedannere)	Log ₁₀ reduktioner efter 16.2 sek v. 60 C	Log ₁₀ reduktioner efter 16.2 sek v. 65 C
<i>Salmonella</i>	< 1	> 5
<i>E.coli</i> O157:H7	1-2	> 6
<i>L. monocytogenes</i>	< 1	< 1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4-5	

(mod.e. Jørgensen, 1996; D'Aoust et al. 1987, 1988)

Der har været megen diskussion af varmedrabets størrelse ved pasteurisering, idet det har vist sig at mange tidligere undersøgelser ikke havde taget højde for at inaktiveringen afhænger af bakteriernes fysiologiske status, opvarmningsmediet m.m. Ved undersøgelse af *L. monocytogenes*, der er den mest varmeresistente af de ikke-sporedannende patogene bakterier, har vi fået et overblik over en række forskellige faktorer, der influerer på varmeresistensen (tabel 3). Af tabellen fremgår tydeligt, at forsøg, der skal afklare sikkerhedsmæssige aspekter ved varmeinaktivering, bør være nøje tilrettelagte, således at man tager højde for disse faktorer. Hvis det er muligt bør der bruges en cocktail af stammer eller stammer, der er forholdsvis varmeresistente og disse stammer bør være i deres mest resistente tilstand, dvs. i form af stationær fase kulturer. Hvis der er mulighed for at de under realistiske forhold er opformeret under osmotisk stress eller svagt varme- eller syrestress bør dette tages med i betragtningen. I de mest eklatante tilfælde har vi fundet, at D-værdien (dvs. tid til én log₁₀ reduktion) for osmotisk stressede kulturer opvarmede i levnedsmidler med nedsat vandaktivitet (9% salt-i-vandfasen), er 22 gange højere end hvis forsøget udføres med eksponentielt voksende kulturer af samme bakterie i almindelig vækstmedium (Jørgensen et al, 1995). Det ses ligeledes af tabellen, at den bedste genfinding af varmebeskadigede *Listeria*-celler synes at være på non-selektive medier v. 20⁰C. Den skadelige effekt af oxygen/oxygenradikaler på de varmebeskadigede celler kan imødegås ved udelukkelse af oxygen under hele prøvetagnings- og inkuberingsforløbet eller ved brug af rige medier med f.eks. pyruvat til opslemning og udpladning. Selv med de mest forsigtige estimater af varmedrab synes det dog sikkert, at 15 sekunder v. 72 vil sikre over 3 log enheders varmedrab (og i nogle undersøgelser helt op til 12) af *L. monocytogenes* i almindelig mælk. Sporer af *B. cereus* eller *Clostridium botulinum* bliver derimod ikke inaktiverede ved pasteurisering.

I forbindelse med varmeinaktiveringsforsøgene har vi fået bygget et "submerged coil" -apparat, der er særdeles velegnet til at undersøge varmeinaktiveringskinetik i pasteuriseringstemperaturområdet.

Tabel 3. Faktorer af betydning for *L. monocytogenes* varmeresistens

Parameter	Vækstfase/ Betingelser	Opvarmnings Medium	Temperatur °C	Max.for -skel D- value
Stamme (27 isolater)	Stationær	TSB	57	4
Vækst-betingelser				
<i>Temperatur</i>	Senlog <u>4⁰C vs.30⁰C</u>	TPB	58	2
<i>Salt</i>	Senlog <u>TPB vs.TPB+</u> <u>9%NaCl</u>	TPB + 9% NaCl	60	2 - 3
Vækst Fase	<u>Log vs.</u> <u>Stationær</u>	TPB	60	5 - 7
Opvarmnings- medium				
<i>Sukrose</i>	Stat ?	Sukrose opl. <u>a_w 0.90 vs</u> <u>a_w 0.98</u>	60	4 - 5
<i>Salt</i>	Senlog	<u>TPB vs</u> <u>TPB + 9% NaCl</u>	60	7 - 8
<i>Bouillon vs. Kød m.samme pH</i>	log+ stationær	<u>TPB + 9000 ppm Lakt. vs</u> <u>Kød, pH 5.4-6.2</u>	60	4 - 5
Opvarmning				
<i>Varmechok</i>	Log	TPB+9000 ppm Lakt. pH 7.0	<u>46⁰C, 30 min, 60⁰C vs</u> <u>Instant., 60⁰ C</u>	5 - 6
	Stat.?	Fermenteret pølse (% NaCl ?)	<u>48⁰ C,30-120 min,64⁰ C</u> <u>vs instant., 64⁰ C</u>	2
<i>Stigende Temperatur</i>	Senlog	TPB	<u>0.7⁰ C min⁻¹, 60⁰C vs</u> <u>Instant., 60⁰ C</u>	2
Genfinding				
<i>Agar (selektiv vs non-selektiv)</i>	Log	Kød, pH 5.4	60	1 - 2
<i>Inkubations Temperatur (20⁰C vs 40⁰C)</i>	Stationær	TSB	60	2 - 3
<i>Inkubations- atmosfære (forlænget anaerob vs.standard aerob)</i>	Stationær	Sødmælk	62.8	4 - 5
	Log	TSB + 0.6% YE	55	1 - 2

TSB: tryptic soya broth / tryptone soya broth; YE: yeast extract; TPB: tryptic phosphate broth; Py: Natrium pyruvat; Lac: Natrium laktat. De undersøgt parametre er understregede

Syrning

Produktionen af mælkesyre og andre organiske syrer har også stor betydning som barriere mod vækst af uønskede bakterier. Da syrningen foregår ved en temperatur, der tillader vækst af de fleste patogene bakterier er hastigheden, hvormed syren dannes afgørende. Selv ved en velfungerende syrning (i dette tilfælde med en kommerciel starter med *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus acidophilus*) er der dog mulighed for vækst af organismer som *Salmonella* (fig.1). Dette er en væsentlig forskel fra f.eks. *Staphylococcus aureus*, der normalt kun udgør et problem ved for langsom syrning.

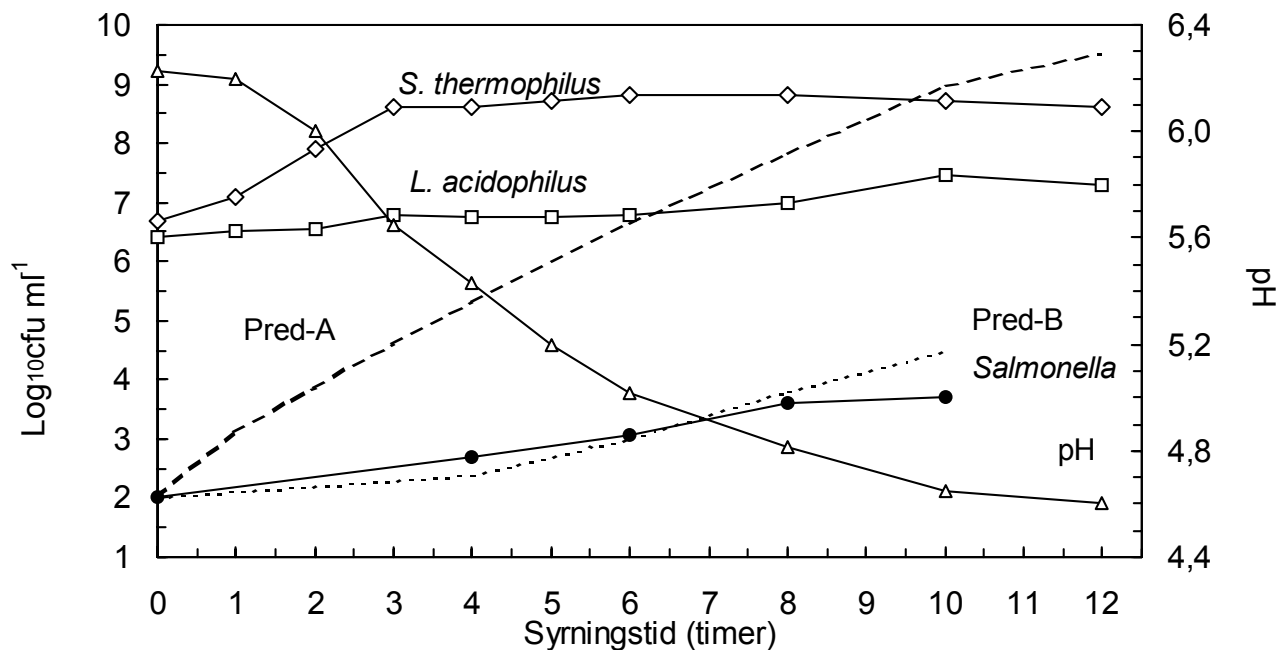


Fig.1. Observeret og prædikeret vækst af *Salmonella typhimurium* i mælk under syrning med *S. thermophilus* og *L. acidophilus* v. 32°C. Den pågældende *S. typhimurium* er isoleret fra et mælkefilter.

Prædiktionerne af vækst i fig. 1 er baseret på den engelske, kommercielt tilgængelige FoodMicroModel, der er et computer program til beregning af skadevoldende mikroorganismers vækst under forskellige betingelser. FoodMicroModel's prædiktioner er blevet valideret for en del patogener og fødevarers vedkommende og de har i mange tilfælde vist sig at fungere udmærket. Det ses imidlertid, at prædiktionere forudsiger meget hurtigere vækst end de observerede værdier i det tilfælde (Prediction A), hvor væksthastighederne er udregnede i de observerede tids-/pH-intervaller, dvs. uden indregnede nølefaser. Der er bedre overensstemmelse i den - måske mindre logiske - prædiktion, Prediction B, hvor væksten i hvert punkt prædikteres, som om pH havde haft konstant værdi fra start (dvs. at vækst efter f.eks. 6 timer prædikteres som om pH var 5 fra start).

Genfinding af syrestressede celler

Det er iagttaget at stressede celler af *E. coli* og *Salmonella* sp. ofte giver nedsat genfindelsesprocent på stærkt selektive agarer (Strantz and Zottola, 1989) men genfindingen kan øges v.h.j.a. en teknik, hvor der først udplades på et non-selektivt rigt medium, der derefter overhældes med selektiv agar (overlay technique). I projektet blev det undersøgt, om denne teknik også ville øge genfindingen af *Yersinia enterocolitica* og *Bacillus cereus* fra renkulturer i hhv. ustresset og syre-stresset tilstand samt fra inokuleret Brie-ost, hvor der isoleres fra en blandingskultur. Trypton Soya agar blev benyttet som non-selektiv agar med to timers præ-inkubation og hhv. *Yersinia* selektiv medium (CIN) og *Bacillus cereus* selektiv agar (BCSA) som selektive media. For ustressede celler gav overlay-metoden kimalt svarende til den non-selektive agar, mens genfinding på de selektive agarer var op til 50% lavere. For *Yersinia enterocolitica*'s vedkommende faldt genfindingen drastisk på

den selektive agar i takt med syrebeskadigelsen, mens dette fald var langt mindre, hvis overlay teknikken blev benyttet som angivet i tabel 4.

Tabel 4. Genfindning af *Yersinia enterocolitica* i Trypton soya bouillon sænket til pH 3.5 m. mælkesyre v. 30°C v.h.j.a. selektiv agar og overlay teknik

Yersinia enterocolitica Serotype	Time (mins)	% Recovery compared to TSA ^a	
		TSA/CIN ^b	CIN ^c
0:3	0	100.0	98.2
	10	90.5	
	20	90.2	
	30	85.4	
0:9	0	100.7	98.8
	10	92.8	
	20	91.2	
	30	84.9	

Samme tendens, men langt mindre udpræget sås for *Bacillus*' vedkommende. Ved undersøgelse af inokulerede Brioste sås, at de selektive og differentierende egenskaber ved de selektive agarer blev bibeholdt ved overlay-metoden samtidig med at genfindingen lå op til 50% over den selektive agar. Overlay-teknikken er derfor klart at foretrække til kvantitative undersøgelser af levnedsmidler.

Inaktivering og adaptation

I syrnede produkter kan der udover den inhiberende effekt være en drabseffekt, hvis størrelse naturligvis afhænger af pH og bakterieisolat, men tildels også af en række mere upågtede faktorer. Der blev derfor udført særskilte forsøg til belysning af syreinaktiveringen som funktion af forskellige organiske syrer (de primære metabolitter fra starterkulturene), syrens dissociationsgrad og total koncentration samt bakteriernes evt. adaptation til sure miljøer.

Inaktivering af *Salmonella* sp. og *Yersinia enterocolitica* v. pH-sænkning af skummetmælk med forskellige syrer (dvs. tildrypning af syre til pH 3.5 var opnået) var mest effektiv i rækkefølgen propionsyre > eddikesyre > mælkesyre >> citronsyre > saltsyre. Da syrerne har forskellige pK_a-værdier indebærer denne form for sammenligning, at man sammenligner forskellige koncentrationer (i dette tilfælde tilsættes således f.eks. 670mM propionsyre mod 140 mM mælkesyre for at opnå pH 3.5). Hvis syrerne i stedet blev sammenlignet på ækvimolær basis (total og udissocieret) ændredes rækkefølgen til mælkesyre>eddikesyre≥propionsyre.

Bakteriekulturene blev markant mere syretolerante efter svagt syrestress (i form af eksponering til pH 5.5 i en time), stigende alder eller lav temperatur. Sidstnævnte (fig. 2 og 3) kan også have betydning i rengøringsituationer, hvor der ønskes et syredrab.

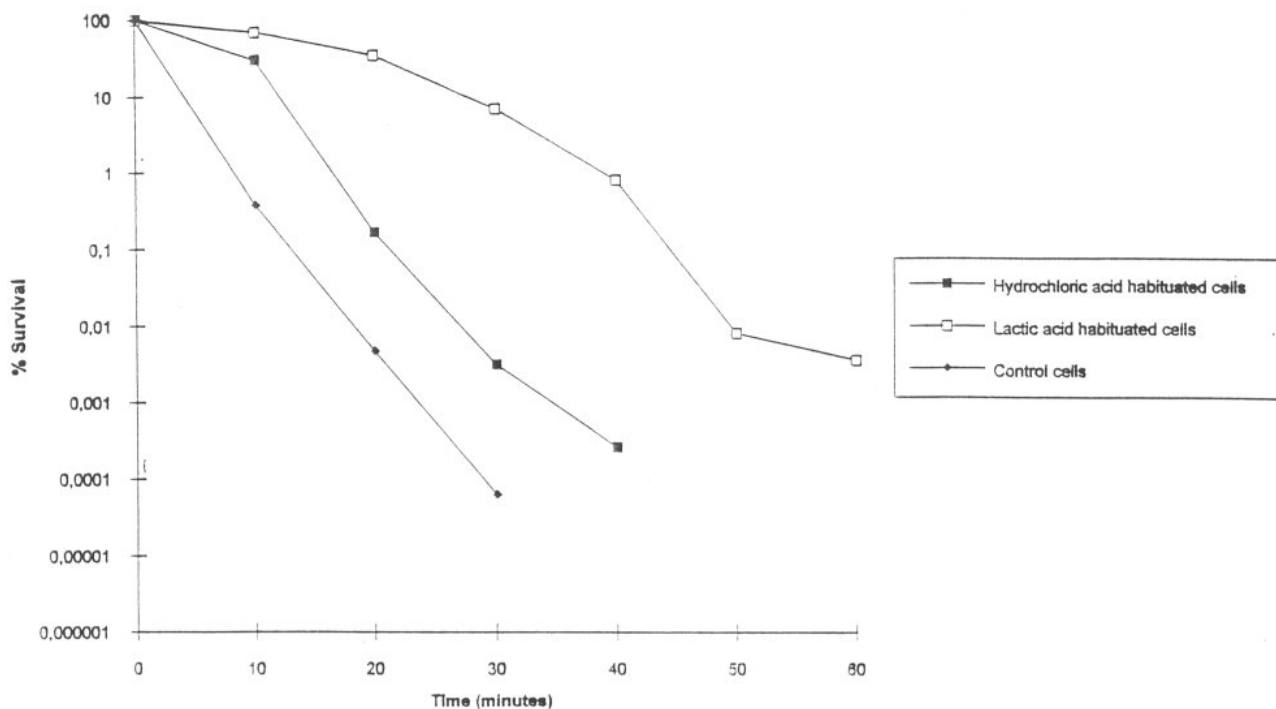


Fig 2 Overlevelse af *Salmonella typhimurium* i rekonstitueret skummetmælk m. 140 mM mælkesyre justeret til pH 3.5

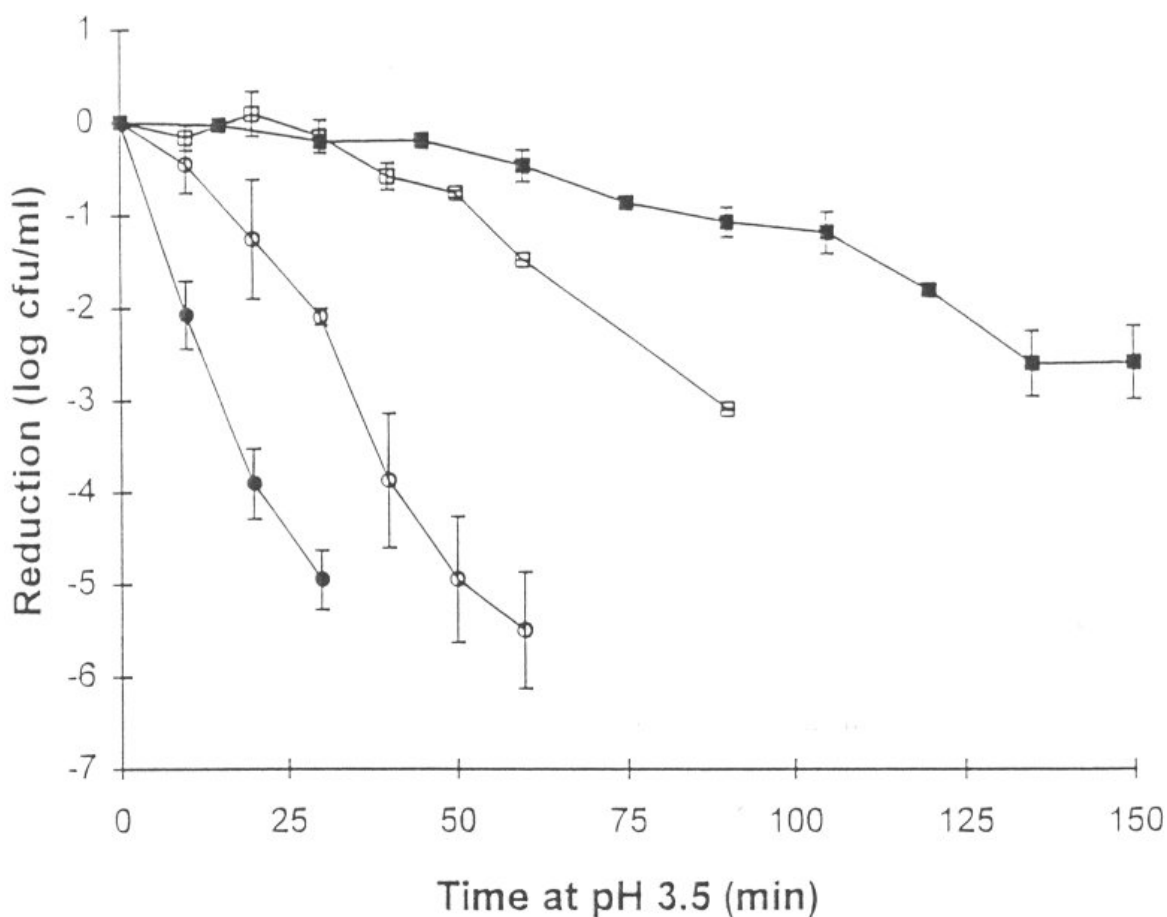


Fig 3 Temperaturen indflydelse på mælkesyre-medieret (140mM, pH 3.5) drab af *Salmonella typhimurium*. ■ 15°C; □ 20°C; ○ 25°C; ● 30°C

Vækst og overlevelse af patogene bakterier på snitfladen af danske oste: observerede og predikterede data

Kontaminering af oste kan også finde sted efter lagring f.eks. i detail- eller forbrugerleddet. For at belyse, hvorledes forskellige danske oste understøtter vækst blev snit/overflade af syv danske oste (Danbo, Svenbo, Esrum, Dansk Mozzarella, Danablu, Blå Castello og Rygeost) podet med ca. 10^4 cfu/g af hhv. *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* og psykrotrofe *Bacillus cereus* og inkuberet ved 5E og 15EC i hhv 21 og 14 dage ved høj luftfugtighed. Vækst og overlevelse af de inokulerede bakterier blev opgjort som maksimal vækst eller reduktion (Tabel 5). I de faste oste, Danbo og Svenbo, blev alle bakterier, med undtagelse af *L. monocytogenes*, signifikant reduceret ved de to lagrings-temperaturer. På de halvfaste oste Esrum, Mozzarella og Danablu var udviklingen meget forskellig. På Danablu blev alle bakterier signifikant reduceret, mens *L. monocytogenes* og *Y. enterocolitica* overlevede eller voksede langsomt på Esrum og Mozzarella. Ved 15EC lagring af Blå Castello observeredes vækst af alle bakterier (stigning fra 0.7 til 3.9 \log_{10} cfu/g), mens der ved 5EC kun blev iagttaget vækst af *L. monocytogenes* og *Y. enterocolitica*. I Rygeost, der havde det laveste pH, blev alle bakterier signifikant reduceret (reduktion $> 2.5 \log_{10}$ cfu/g).

Generelt observeredes ingen vækst på oste med pH < 5.9 . På oste med pH > 5.9 var vækst og overlevelse afhængig af den øvrige kemiske sammensætning. Specielt den bløde, overflademodnede ost, Blå Castello, udgjorde et godt vækstmedium for de inokulerede bakterier. Den psykrotrofe *B. cereus* blev i alle oste, med undtagelse af Blå Castello, reduceret til under detektionsgrænsen (reduktion > 2.1 cfu/g).

De opnåede data for vækst/reduktion, temperatur, pH og salt-i-vand fase blev sammenholdt med prediktioner af vækst baseret på FoodMicroModel. Det var karakteristisk, at modellen predikterede vækst i et langt mere omfattende område end det faktisk observerede inkl. områder, hvor der rent faktisk fandt en inaktivering sted. Det må således understreges, at det er meget vanskeligt at overføre modelberegninger opnået i statiske bouillon-systemer (som det er tilfældet med FoodMicroModel og det amerikanske Pathogen Modelling Program (se under <http://www.arserrc.gov/internet/mfs/>)) til komplekse, faste systemer som ost, der varierer i tid, kemisk-fysiske gradienter og ydermere kan indeholde andre mikrobielle metabolitter.

Vækstkinetik af *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* og *Bacillus cereus* på overfladen af Brie: observerede og predikterede data

Der blev foretaget en specifik undersøgelse af to serotyper af *Y. enterocolitica*, 3 *Salmonella* serotyper samt 3 psykrotrofe *Bacillus cereus* stammer og deres vækst på overfladen af Brie for at undersøge vækstkinetik ved forskellige temperaturer, variation mellem stammer, effekt af inokulum og sammenhæng mellem predikterede og observerede vækstkaraktistika. Der var begrænset effekt af stammevariation og væksthastighederne var i samme størrelsesorden for lavt og højt inokulum. Kun *Y. enterocolitica* var istand til at vokse ved køletemperaturer (4-8°C), men ved stuetemperatur understøttede Brie vækst af alle tre patogene bakterier. Der blev ikke i dette tilfælde fundet nogen signifikant forskel mellem de forskellige stammer eller serotyper af hver patogen ($p \gg 0,1$). Som det fremgår af tabellerne 4, 5 og 6 var prediktionerne af væksthastigheder generelt "fail-safe", dvs. at prædiktionerne fra både "Pathogen Modelling Program" og 'Food Micromodel Database' med brug af følgende forudsætninger: gennemsnitligt pH 6,8, temperatur 4, 8 og 20 °C og 3, 8% salt i vandfasen, forudsagde højere væksthastighed end den observerede. Der var dog god overensstemmelse for *B. cereus* v. 20°C. Det skal bemærkes at nølefasen i enkelte tilfælde var "fail-dangerously", dvs. blev forudsagt som længere end den observerede (Little & Knöchel, 1994).

Table 5: Comparison of observed and predicted growth values of *Salmonella* in Brie at 20°C

Growth Parameter	Inoculum level	<i>Salmonella</i> strain			Predicted response	
		<i>S.thompson</i>	<i>S.dublin</i>	<i>S.typhimurium</i>	MFS ¹	FMM ²
Lag phase (h)	High ³	12.0	12.0	12.0	12.6	12.8
	Low ⁴	12.0	6.0	0.0	12.6	12.8
Exponential Growth rate (h ⁻¹)	High	0.153	0.115	0.119	0.175	NP
	Low	0.134	0.126	0.109	0.175	NP
Generation time (h)	High	4.5	6.0	5.9	1.7	1.5
	Low	5.1	5.5	6.3	1.7	1.5
Max. population density (log cfu/g)	High	8.7	8.6	8.8	9.2	NP
	Low	7.6	7.4	7.9	9.2	NP

¹ Pathogen Modeling Program Version 3.1 (Microbial Food Safety Unit, USDA/ARS Eastern Regional Research Center, Philadelphia, USA);

² Food MicroModel database (MAFF, UK); ³ High inoculum level of ~10⁴ cfu/ml;

⁴ Low inoculum level of ~10² cfu/ml; NP, no prediction available

Table 6: Comparison of observed and predicted values of *Yersinia enterocolitica* in Brie at 4, 8 & 20°C

Temperature (°C)	Growth parameter	Inoculum level	<i>Y.enterocolitica</i> serotype		Food MicroModel ¹ prediction
			0:3	0:9	
20	Lag phase (h)	High ²	0.0	0.0	11.3
		Low ³	6.0	6.0	11.3
	Generation Time (h)	High	5.0	4.6	1.7
		Low	5.0	6.2	1.7
8	Lag phase (h)	High	12.0	12.0	47.9
		Low	24.0	24.0	47.9
	Generation Time (h)	High	16.9	18.6	7.7
		Low	22.3	16.6	7.7
4	Lag phase (h)	High	72.0	48.0	95.3
		Low	96.0	96.0	95.3
	Generation time (h)	High	28.6	45.2	15.9
		Low	42.2	19.0	15.9

¹ Food MicroModel database, MAFF, UK;

² High inoculum level of ~10⁴ cfu/ml;

³ Low inoculum level of ~10² cfu/ml

Table 7 Comparison of observed and predicted values of *Bacillus cereus* in Brie at 20°C

Growth parameter	Inoculum level	<i>Bacillus cereus</i> strains			Food MicroModel ¹ prediction
		O-216	A3-131	B3-142	
Lag phase (h)	High ²	0.0	0.0	0.0	0.0
	Low ³	6.0	6.0	6.0	0.0
Generation time (h)	High	3.4	3.5	3.5	3.6
	Low	2.6	5.1	2.7	3.6

¹ Food MicroModel database (MAFF, UK);

² High inoculum level of ~10⁴ cfu/ml;

³ Low inoculum level of ~10² cfu/ml

Vækst og overlevelse af patogene bakterier under produktion, lagring og modning af termostabiliseret Brie

Overlevelse og vækst af *Salmonella typhimurium* og *Yersinia enterocolitica* samt den psykrotrofe *Bacillus cereus* blev også undersøgt under fremstilling, modning og lagring af termostabiliseret brieost, der er karakteriseret ved at have et forholdsvist højt start pH (4.8-5.0). De anvendte patogener blev tilsat ostemælken i et niveau på ca. 10^5 /ml samtidig med starter-kulturen for at efterprøve, hvordan de pågældende patogener vil opføre sig, hvis mælken kontamineres efter pasteurisering eller hvis der anvendes forurenede råmælk. Ostene blev lagret v. hhv. 7 og 15°C. Der blev udtaget prøver fra både centrum og overflade af pH, mælkesyre, patogener, laktobaciller og streptokokker. Overfladens pH steg meget hurtigere end pH i centrum, således at der efter 4 ugers lagring var en forskel på op til 2 log enheder. Dette påvirkede ikke væksten af starterkulturene, men gav markante forskelle i patogenernes vækst og overlevelse.

Salmonella typhimurium var i stand til at vokse under ostningen, idet opkoncentrering plus vækst gav en stigning på ca. 2 logenheder. Under presningen observeredes ingen vækst. Under den efterfølgende modning faldt antallet i centrum ca. 2 logenheder, mens antallet på overfladen var konstant. Hvis ostene blev lagret ved 15EC steg antallet både i centrum og på overfladen under de 4 ugers lagring. I oste lagret ved 7EC faldt antallet i centrum yderligere 0,8 logenhed, hvorefter antallet begyndte at stige i takt med at pH steg. Antallet på overfladen var ret konstant under de 6 ugers lagring ved 7EC. Det observeredes, at vækst af *Salmonella typhimurium* blev hæmmet, når pH var mindre end 5, men så snart pH oversteg 5,1 begyndte de at vokse. *Salmonella typhimurium* overlever og vokser glimrende under fremstilling, modning og lagring af brie (ialt 2-3 log enheder).

Yersinia enterocolitica: Under selve ostningsprocessen sås ingen vækst, men under presningen og indtil saltning steg antallet 1 logenhed, delvis som følge af opkoncentrering. Under den efterfølgende modning ved 15 EC i 7 dage faldt antallet i centrum mere end 4 logenheder (under detektionsgrænsen 10^2 cfu /ml) og på overfladen ca. 2 logenheder. Under lagringen ved hhv. 15EC og 7EC begyndte væksten, når pH oversteg 6. *Yersinia enterocolitica* overlever og vokser under fremstilling, modning og lagring af brie, men der er et markant fald under modningen i forbindelse med pH-faldet, hvilket kan have betydning ved en lav infektionsgrad.

Bacillus cereus: Under ostningsprocessen samt under presning og modning steg antallet svagt (< 1 logenhed). Under lagringen ved 15EC og 7EC var der en meget svag stigning i centrum på ca. 0,1-0,2 logenhed, hvorimod antallet på overfladen var konstant. Den psykrotrofe *Bacillus cereus* var således kun i stand til at opkoncentreres og vokse med i alt knap 1 logenhed under fremstilling og modning og lagring af brie.

Interaktioner mellem starterkulturer og patogener

Interaktioner mellem mælkesyrebakterier og patogene bakterier har været genstand for megen forskning. Derimod er der yderst begrænset viden om interaktioner mellem skimmelstarterkulturer og patogene bakterier. I projektet blev 45 skimmelstarterkulturer (34 *Penicillium* species og 11 *Geotrichum candidum*) undersøgt over for en række starterkulturer og patogene bakterier i såvel laboratoriesubstrat som en specialudviklet Brie-agar v. 15°C (Larsen & Knøchel, 1997). Kun *P. camembertii* stammer udviste inhibitorisk aktivitet under disse forhold. Det var karakteristisk at inhiberingen fandt sted tidligt i svampenes vækst (2 dage), mens ældre kulturer (10 dage) ikke hæmmede. To *Penicillium camemberti* blev udvalgt til videre undersøgelser. Effekten af de(t) hæmmende princip(per) viste sig at afhænge af pH, mængden af omsætteligt sukker i mediet og temperatur, men der kunne ikke eftervises mykotoksiner eller betydelige mængder organiske syrer i de inhiberende prøver. HSGC-MS analyser efterfulgt af Principal Component Analysis viste, at de største forskelle mellem et inhiberende og et non-inhiberende isolat bestod i en større produktion hos førstnævnte af flygtige stoffer som acetaldehyd, benzaldehyd, 3-methylbutanal og 1-octen-3-ol,

specielt efter 2-4 dage og flere af disse stoffer har en inhiberende effekt i laboratorieforsøg. Det non-inhiberende isolat havde større produktion af ethanol og 3-methylbutanol. Gram-negative og *B. cereus* blev hæmmet mest, efterfulgt af *L. monocytogenes* og *Lactococcus* sp., mens *Lactobacillus* sp. og *Staph. aureus* var insensitive. I Brie-agar var hæmningen i størrelsesordenen 3-4 log-enheder efter 3-6 dage for *Salmonella*, men kun 1-2 logenheder for *L. monocytogenes'* vedkommende. For begge patogener var graden af reduktion i celletal/hæmning påvirket af podeniveauet af den patogene stamme (jo højere podeniveau jo mindre reduktion)

Undersøgelse af *B. cereus* overlevelsessevne ved lavt pH samt muligheder for at adaptere sig

Da *B. cereus* viste sig at være regelmæssigt forekommende i mælk og dermed den hyppigst forekommende patogene bakterie i ost blev det undersøgt om den hurtige reduktion ved lavt pH, der var observeret i flere af forsøgene, var repræsentativ for *B. cereus* stammer som helhed.

Med henblik på at vurdere variationsbredden blandt *B. cereus* stammers syretolerance blev variationen i pH-minimum for vækst ved 25EC af tyve stammer undersøgt i bouillonmedium (BHI) tilsat 112mM mælkesyre ved pH 5.3; 5.6; 5.9 og 6.2. Det generelle minimum pH for vækst (defineret som $OD_{600} > 0.1$) var 5.6. Dog var én stamme (isoleret fra mælk) mere syretolerant, idet pH minimum for vækst var 5.3, mens en anden stamme (isoleret fra rygeost) var mindre syretolerant, idet minimum pH for vækst var 5.9. Det blev desuden for fem stammer undersøgt, om der var større forskelle i inaktiveringskinetikken ved pH 4.5, 5.0 og 5.5. For de 5 undersøgte *B. cereus* stammer viste inaktiveringsforsøgene, at når der blev podet med 10^5 - 10^6 CFU/ml reduceredes antallet af celler med ca. 3 log-enheder i løbet af 2-5 timer ved pH 4.5. Ud af de 5 stammer var én stamme særlig følsom, idet der var tale om total inaktivering (ca. 6 log-enheder) ved pH 4.5 allerede efter 4 timers syreeksponeering. For de andre stammers vedkommende var der ved samme pH tale om en reduktion på ca. 4 log-enheder efter 1 døgn. For alle stammer var inaktiveringen ved pH 5.0 langsommere end ved pH 4.5 og ved pH 5.5 var der kun tale om en meget svag (eller ingen) inaktivering.

Referencer

Back, J. P., Langfort, S. A. & Kroll, R.G. 1993. Growth of *Listeria monocytogenes* in camembert and other soft cheeses at refrigeration temperatures. *Journal of Dairy Research* **60** 421-429.

D'aoust, J.Y., Park, C.E., Szabo, R.A., Todd, E.C.D., Emmons, D.B. & McKellar R.C. 1988 Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. *Journal of Dairy Science* **71**, 3230-3236

D'aoust, J.Y., Emmons, D.B., McKellar R.C., Timbers, G.E., Todd, E.C.D. Sewell, A.M. & Warburton, D.W., 1987 Thermal inactivation of *Salmonella* species in fluid milk. *Journal of Food Protection* **50**, 494-501.

Frank, J.F., Marth, E.H. & Olson, N.F. 1977. Survival of enteropathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* during manufacture of camembert cheese. *Journal of Food Protection* **40** (12) 835-842.

Jensen, N.E., Aarestrup, F., Jensen, J. & Wegener, H.C. 1996 *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis *International Journal of Food Microbiology* **32**, 209-216

Johnson, E.A., Nelson, J.H. & Johnson, M. 1990b. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, part II. Microbiology. *Journal of Food Protection* **53** (5) 441-452

Jørgensen, F. 1996 Survival of stressed foodborne bacteria: factors affecting thermotolerance in *Listeria monocytogenes*. Ph.D. afhandling

Jørgensen, F.J., Stephens, P.J. & Knøchel, S. (1995) The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 274-281.

Ryser, E. T. & Marth, E. H. 1987. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese. *Journal of Food Protection* **50** (5) 372-378

Strantz, A.A. and Zottola, E.A. 1989 A modified plating technique for the recovery and enumeration of stressed *Salmonella typhimurium* Hf. *Journal of Food Protection* **52** , 712-714

Publikationer i forbindelse med projektet

Larsen, A.G. and Knøchel, S. (1997) Antimicrobial activity of food related *Penicillium* spp. against pathogenic bacteria in laboratory media and a cheese model system. *J. Appl. Bacteriol.*, **82**, 111-119.

Jørgensen, F.J., Panaretou, B., Stephens, P.J. and Knøchel, S. (1996) Effect of pre- and post heat shock temperature on the persistence of thermotolerance and heat shock induced proteins in *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**, 216-224.

Knøchel, S. & Gould, G. (1995) Preservation microbiology and safety: Quo vadis ? *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 127-131.

Jørgensen, F.J., Stephens, P.J. & Knøchel, S. (1995) The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 274-281.

Little, C. & Knøchel, S. (1994) Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* in Brie stored at 4, 8 and 20 C. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 137-145

Knøchel, S. (1998) Vækst og overlevelse af patogene bakterier i ost. Mælkeritidende (indsendt)

Konferenceindlæg og posters

Knøchel, S.: Interactions between pathogens and starter cultures in cheese. Workshop on "Modelling Microbial Interactions in Foods", Wageningen, Holland, Dec.1996 (foredrag)

Knøchel, S. and T. B. Hansen: Factors affecting the thermoresistance of *Listeria monocytogenes* before, during and after heat treatment. Poster. Food Associated Pathogens. Uppsala, May 1996.

Knøchel, S.: Konserveringsmikrobiologi - hvor står vi nu ? Food Microbiology - recent Danish research and international trends. SAS Globetrotter Hotel. November 1995 (foredrag)

Hansen, T.B. and S. Knøchel: Resuscitation and growth of *Listeria monocytogenes* 13-249 in a food system as affected by degree of heat injury, growth phase, pH and storage temperature. AAIR concerted action meeting, Beaune, France, October 1995

Kamuk Kristiansen, A. og Knøchel, S. Poster. Overlevelse og vækst af patogene bakterier i ost. Mejeriforskningsdag, KVL, 5.oktober 1995.

Knøchel, S., K. B. Jensen and T. B. Hansen: The potential of Danish market cheeses to support growth of four pathogens. Poster. IAMFES meeting. Pittsburgh, USA, July 1995.

Hansen, T.B., F. Jørgensen and S. Knøchel: Heat-shock Induced Thermotolerance in *Listeria monocytogenes*: The Effect of pH and Growth Phase. Poster. New Shelf Life technologies and Safety Assessments. Helsinki, May 1995

Madsen, S.B., Little, C.L. & Knøchel, S.: Effekt af syreadaptation på overlevelse af *Salmonella typhimurium* og *Yersinia enterocolitica* 0:3 ved lavt pH. Poster. Levnedsmiddelforskning '94.

Jørgensen, F., P. Stephens, Cole, M., Jones, M. & S. Knøchel: Varmeresistens hos osmotisk stressede *Listeria monocytogenes* bestemt v.hj.a. en "submerged coil"-metode. Poster. Levnedsmiddelforskning '94.

Little, C., Mikkelsen, A.M. & Knøchel, S.: Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* and *Salmonella* in Brie stored at 4, 8 and 20 C. Poster. Food Micro '93. 15th Int. Symp. ICFMH. Bingen. 1993

Knøchel, S.: Vækst og overlevelse af patogene bakterier i ost. Dansk Mejeriteknisk Selskab. Marts 1993 (foredrag)

Undervisning

På grundlag af projektet gives der undervisning inden for emnerne: "patogene bakterier i mejeriprodukter" og "HACCP og brug af prediktive modeller" i faget "Mejeriprodukternes mikrobiologi".

