



## Rapport

### God slagtehygiejne ved høj hastighed

13. november 2013  
Proj.nr. 2001472  
Version 1  
VHR/JUSS

Bestemmelse af nølefasen for udvalgte salmonella isolater

Hardy Christensen og Vinnie H. Rasmussen

#### Sammendrag

##### *Baggrund*

Tidligere forsøg har vist, at slagtekroppe ikke altid blev fuldt nedkølede under udligning, og at temperaturen var forholdsvis høj på de steder, hvor kroppene rørte hinanden under udligning. Det giver en teoretisk mulighed for vækst af Salmonella i kontaktpunkter eller ved mørbradhoved. Modelberegninger har vist, at tilvæksten kan være op til 1,5 log-enheder.

##### *Formål*

Formålet med forsøgene var at undersøge, om der også i praksis kan ske en tilvækst på op til 1,5 log-enheder i forbindelse med udligning af slagtekroppe.

##### *Konklusion*

Der er gennemført forsøg med de Salmonella-serotyper, der er hyppigst forekommende på fersk kød. Forsøgene viste, at der i praksis ikke forventes nogen tilvækst af Salmonella under udligning – hverken hvor kroppene rører hinanden eller ved mørbradhovedet, hvis denne er løsnet på slagtegangen. Det skyldes, at nølefasen på kød er så lang, at væksten ikke kommer i gang, før udligningen er overstået.

## Indledning

### Baggrund

Tidligere forsøg har vist, at slagtekroppe ikke altid blev fuldt nedkølet under udligning og, at temperaturen var forholdsvis høj der, hvor kroppene rørte hinanden. Det giver en teoretisk mulighed for vækst af Salmonella i kontaktpunkter eller ved mørbradhoved. Modelberegninger har vist, at tilvæksten kan være på 1,5 log-enheder. Den forudgående tunnelkøling betyder formodentlig, at salmonella vil være i en nølefasen under udligningen og en eventuel tilvækst antager næppe de proportioner, som modellen forudsiger.

For at undersøge om en sådan tilvækst er reel eller kun teoretisk blev nølefasen for udvalgte salmonella isolater fastlagt dels i gødningsopslemninger og dels på kødoverflader.

## Formål

Formålet var at bestemme nølefasen for udvalgte salmonella isolater under de temperaturforhold, der kan forekomme i kontaktpunkter på slagtekroppe under udligning.

## Forsøgsbeskrivelse

### Salmonella isolater

Der blev anvendt 4 salmonella isolater:

- *S. typhimurium*, nr. 5015 fra DC's kulturbank
- Monofasisk typhimurium, nr. 5016 fra DC's kulturbank
- *S. infantis*, nr. 4761 fra DMRI's kulturbank
- *S. derby*, nr. 5014 fra DC's kulturbank

Isolaterne er valgt, så de bedst muligt repræsenterer de salmonellatyper, der findes på slagtekroppe i DK.

### Podcocktail

Der blev fremstillet en podcocktail af de 4 salmonellastammer. Fra fryserør blev hver stamme opformeret i BHI-bouillon, 37°C, natten over. Efterfølgende blev de udstreget og dyrket på BHI-agar, 37°C i 24 timer. Lidt kolonimasse fra hver stamme blev overført til 10 ml BHI-bouillon og opformeret ved 37°C i ca. 1 døgn til et kimtalsniveau på  $10^9$  cfu/ml. De opformede kulturer blev blandet i forholdet 1:1:1:1.

Der podes med en kultur, hvor bakterierne forventes at være i den stationære fase svarende til den fase, de forventes at være i, når de er tilført slagtekroppe via indhold fra fordøjelseskanalen.

### Temperatur

Nølefasen blev fastlagt ved 10°, 15°, og 20°C samt 37°C (reference). Under forsøget blev temperaturer målt med termologgere.

<i>Tid</i>	Der blev udtaget prøver straks efter podning (T= 0) samt efter 2, 4, 6, 24 og 30 timer.
<i>Fastlæggelse af nølefase</i>	Præ-opvarmede Blue-Cap flasker med 100 ml steril gødningsopslemning, ca. 10 gram gødning i 90 ml fysiologisk saltvand, blev tilsat podcocktail, 10 µl af fortyndingen 10 <sup>-2</sup> (svarende til ca. 10 <sup>3</sup> cfu/ml). De podede opslemninger blev inkuberet ved de respektive temperaturer.
- <i>Gødningsopslemning</i>	
- <i>Kødoverflader</i>	Svinekamme blev, umiddelbart inden podning, flamberet. Svær/spæk og sølvhinde blev fraskåret under aseptiske forhold. Derefter blev kammene udskåret i prøvestykker á 500 cm <sup>2</sup> . Værktøj blev rengjort mellem hver kam og der blev skiftet handsker.
	Prøvestykkerne blev præ-opvarmet til de respektive temperatur. Overfladen af hvert prøvestykke blev podet med 5 ml podcocktail, 10 <sup>-3</sup> fortynding svarende til ca. 10 <sup>4</sup> cfu pr. 10 cm <sup>2</sup> (boreprøve). Podcocktailen blev fordelt jævnt over hele prøvearealet. Efter podning blev hvert prøvestykke opdelt i 5 prøver á 100 cm <sup>2</sup> . Prøverne blev placeret i bakker og tildækket med film, så overfladen ikke tørrede ud. Filmen blev påsat, så den ikke rørte kødet. Herefter blev prøverne inkuberet ved de respektive temperaturer.
	Til kontrolprøver blev der anvendt upodede prøvestykker á 100 cm <sup>2</sup> . Kontrolprøverne blev inkuberet ved 37°C.
<i>Prøvetagning og analyser</i>	<u>Gødningsopslemning</u> : Der blev udtaget 3 prøver for hver temperatur henholdsvis tid. Prøverne blev analyseret ved overfladeudsæd på BHI agar, 37°C i 24 timer.
	<u>Kødoverflader</u> : Der blev udtaget 5 boreprøver for hver temperatur henholdsvis tid. Boreprøver blev udstanset med rundbor 10 cm <sup>2</sup> og skåret fri ved hjælp af pincet og skalpel. Rundbor, skalpel og pincet blev steriliseret mellem hver prøve.
	Hver boreprøve blev overført til en stomacherpose, tilsat 50 ml FKP og stomacheret i 1 minut. Prøverne blev analyseret på BHI agar, som gødningsopslemningerne.
<i>Beregninger</i>	Ved beregninger antages, at væksten følger Baranyi's og Roberts vækstmodel (Baranyi, 1994) :
	Kimtallet $N$ til tiden $t$ bestemmes ud fra formelen nedenfor, hvor $N_0$ angiver startkimtallet, $N_\infty$ angiver slutkimtallet, og $\mu_{max}$ angiver den maksimale væksthastighed.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu_{max} A(t) - \ln\left(1 + \frac{e^{\mu_{max} \cdot A(t)} - 1}{e^{(\ln(N_\infty) - \ln(N_0))}}\right)$$

$A(t)$  er et udtryk, der beskriver nedsættelse af væksten med tiden. Det beregnes ud fra formlen nedenfor, hvor  $h$  er en konstant.

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left( e^{-h} + (1 - e^{-h}) e^{-\mu_{\max} \cdot t} \right)$$

Sammenhængen mellem  $\mu_{\max}$  og temperatur ( $T$ ) kan beskrives med formlen nedenfor, hvor  $\beta_0$  og  $\beta_1$  er konstanter.

$$\mu_{\max} = \beta_0 e^{\beta_1 T}$$

Det vil sige, at når temperaturen og de tre konstanter  $h$ ,  $\beta_0$  og  $\beta_1$  kendes, kan vækst beregnes.

Konstanterne  $h$ ,  $\beta_0$  og  $\beta_1$  er estimeret på basis af de fundne vækstkurver i gødningsopslemninger og på kødoverflader vha Proc. Nlin (SAS®, version 9.2).

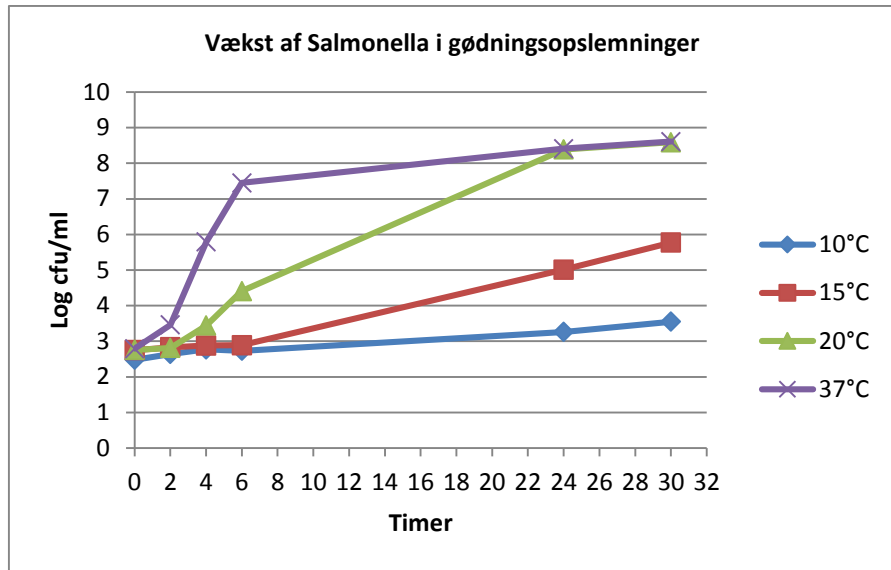
## Resultater og diskussion

### Rådata

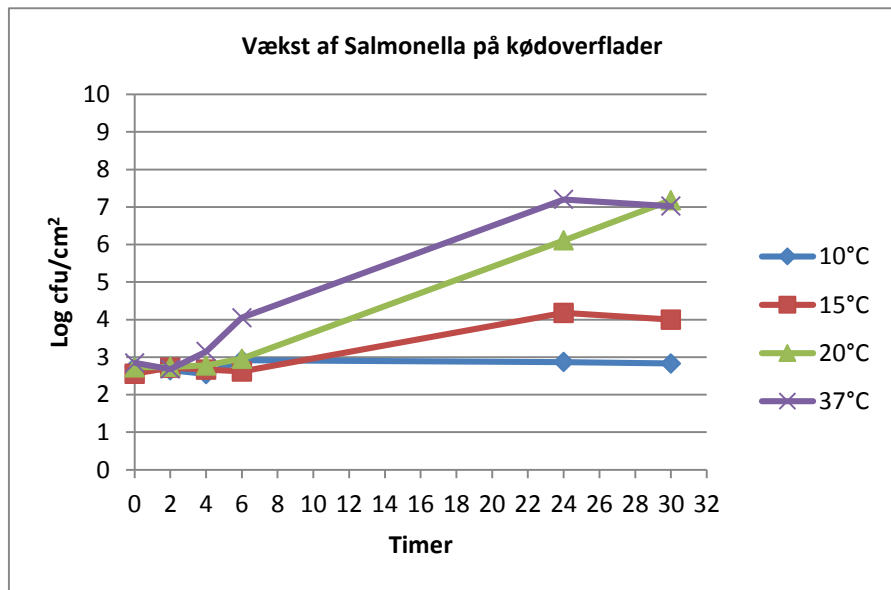
Rådata findes i mappen: "Y:/projekt/P2001472-SAF4 God slagtehygiejne ved høj hastighed".

### Vækstkurver

- *Gødningsopslemning* Salmonella isolaternes vækstforløb i gødningsopslemninger ved 10, 15, 20 og 37°C er illustreret i figur 1.
- *Kødoverflader podede prøver* Vækst af salmonella isolater på kødoverflader ved 10, 15, 20 og 37°C er vist i figur 2. De gennemsnitlige kintal og standardafvigelse fremgår af tabel 1 og 2 i bilag 1.
- *kontrolprøver* På de ikke podede kødoverflader (kontrolprøver) var vækst af aerobe kim (20°C) ikke påviselig efter 24 timer ved 37°C. Efter 30 timer blev der påvist  $10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>. Det indikerer, at kødets baggrundsflora ikke havde en betydende effekt på vækst af salmonella isolaterne.



**Figur 1.** Vækst af Salmonella isolater i gødningsopslemning ved 10, 15, 20 og 37°C. N=3.



**Figur 2.** Vækst af Salmonella isolater på kødoverflader ved 10, 15, 20 og 37°C. N=5.

### Nølefaser

Det ses umiddelbart af figur 1 og 2, at tilvæksten af salmonella i en tidsperiode på 30 timer ved alle temperaturer var større i gødningsopslemning end på kødoverflader. Det er især den kortere nølefase i gødningsopslemninger, der giver en højere tilvækst end på kødoverflader.

*Konstanter for hhv. nølefase og maksimal væksthastighed*

De observerede værdier for vækst ved forskellig temperatur kan "beskrives matematisk" vha. den anvendte model for vækst. For vækst i gødningsopslemning er det kun 0,8 % af variationen, der ikke kan forklares vha. modellen. For vækst på kødflader er det kun 1,9 % af variationen, der ikke kan forklares vha. modellen. Det vil sige, at det ud fra resultaterne er muligt at estimere vækst af Salmonella ved en vilkårlig temperatur i intervallet 10 °C til 37 °C.

Da de observerede værdier for vækst ved forskellige temperaturer kan beskrives med stor nøjagtighed vha. modellen, refereres i det følgende kun til beregnede værdier for nølefase mv., da disse vil være mere nøjagtige end de værdier, der kan aflæses fra vækstkurverne vist i figur 1 og figur 2.

De fundne værdier for konstanter til beregning af hhv. nølefase og maksimal væksthastighed i gødningsopslemninger og på kødoverflader er vist i tabel 1.

**Tabel 1:** Konstanter til beregning af vækst for den anvendte cocktail af Salmonellastammer i gødningsopslemninger og på kødoverflader.

	Gødningsopslemning	Kødoverflader
H	3,3922	9,4896
$\beta_0$	0,1018	0,1639
$\beta_1$	0,0872	0,0697

For alle tre konstanter gælder, at værdien fundet på kødoverflader er signifikant forskellig fra værdien fundet i gødningsopslemninger, om end forskellene for  $\beta_0$  og  $\beta_1$  er små og i praksis ubetydelige.

*Beregnet nølefase*

Vha. konstanten h kan nølefasen beregnes. De beregnede nølefaser ved hhv. 10, 15, 20 og 37 °C er vist i tabel 2.

**Tabel 2:** Nølefase i timer som funktion af temperatur og dyrkningsmedie; beregnet vha. h i tabel 1.

	Gødningsopslemning	Kødoverflader
10 °C	14 timer	29 timer
15 °C	9 timer	20 timer
20 °C	6 timer	14 timer
37 °C	1 time	4 timer

*Maksimal væksthastighed*

Maksimal væksthastighed for vækst af Salmonella i gødningsopslemning og kødoverflader er vist for 4 temperaturer i tabel 3. Til sammenligning er der foretaget tilsvarende beregninger i en af de mest almindeligt anvendte prædiktive modeller: Growth predictor (ComBase predictor - <http://modelling.combase.cc/>).

Af tabel 3 fremgår, at når temperaturen er  $\geq 20$  °C, svarer de fundne væksthastigheder nogenlunde til den væksthastighed, der prædikeres i "Growth predictor". Men ved temperaturer  $\leq 15$  °C, er den maksimale væksthastighed betydeligt større end prædikeret i "Growth Predictor". Det gælder både for vækst i gødningsopslemning og vækst på kødflader. Det vil sige, at når væksten først er i gang, går den hurtigere end forventet ved temperaturer  $\leq 15$  °C.

**Tabel 3:** Maksimal væksthastighed, log cfu/time, som funktion af temperatur for en cocktail af Salmonella. Værdien er beregnet som hældningskoefficient til den lineære del af vækstkurven.

	Fundne værdier		Combase (pH=5,8 Aw=0,997)
	Gødningsopslemning	Kødoverflade	
10 °C	0,10	0,14	0,031
15 °C	0,16	0,17	0,095
20 °C	0,24	0,27	0,23
37 °C	1,09	0,89	0,87

#### Temperatur under udligning

Det er tidligere vist, at slagtekroppe ikke altid er fuldt nedkølede inden udligning. I overfladen af skinker, på kroppe, der hang meget tæt, var udligningstemperaturen op til 11,9°C og det blev registreret, at temperaturen lå mellem 10 og 20°C i ca. 13 timer. Ved mørbradhoved i skinken blev der målt op til 17°C under udligningen og temperaturen faldt til 10°C i løbet af 6 timer (Christensen og Rasmussen, 2013).

#### Vækst af salmonella

- *Teoretisk tilvækst uden nølefasen*

Modelberegninger baseret på disse temperaturprofiler samt vækst uden nølefasen viste, at der kan være en tilvækst af salmonella på 1,5 log henholdsvis 0,6 log (ComBase predictor - <http://modelling.combase.cc/>). Teoretisk svarer det til, at antallet af salmonella stiger omtrent med en faktor 30 henholdsvis en faktor 4. Disse stigningsfaktorer kan have indflydelse på den procentvise forekomst af salmonella positive prøver.

- *Reel tilvækst med nølefasen*

I temperaturområdet fra 20°C til 10°C er nølefasen henholdsvis 14 og 29 timer. Det betyder, at der i et tidsrum på 13 timer ikke vil være en tilvækst af salmonella i overfladen af skinker og der vil således heller ikke være en tilvækst af salmonella i skinken ved mørbradhoved inden for en periode på 6 timer.

Ved de temperaturforhold, der findes ved udligning, vil den reelle tilvækst med nølefasen være mindre end den teoretiske tilvækst som prædikeret med "Growth Predictor" uden nølefasen. Det skyldes, at nølefasen er så lang, at væksten ikke når at komme i gang i løbet af udligningsperioden.

Med udgangspunkt i de gennemførte forsøg med vækst af de almindeligt forekommende serotyper på kødflader, forventes ved eksempelvis 10 °C, at antallet af Salmonella øges med en faktor 10 i løbet af de første 36 timer; derefter vil antallet forøges med en faktor 10 for hver 7'ende time.

## **Konklusion**

Forsøgene med de serotyper af Salmonella, der er hyppigst forekommende på fersk kød, viste, at der i praksis ikke forventes nogen tilvækst af Salmonella under udligning. Det skyldes at nølefasen på kød er så lang, at væksten ikke kommer i gang før udligningen er overstået.

## **Referencer**

Christensen, H. og Rasmussen, V. 2013. God slagtehygiejne ved høj hastighed. DMRI Rapport 20130130.

Baranyi, J. og T.A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology. 23, s. 277-294.



**Tabel 1.** Data fra bestemmelse af salmonella isolaters nølefase i gødningsopslemning ved 10, 15, 20 og 37°C. Data er angivet som gennemsnitlige kimalt (n=3) og standardafvigelse.

Timer	Temperatur							
	10°C		15°C		20°C		37°C	
	Gns. cfu/ml	Stdv	Gns. cfu/ml	Stdv	Gns. cfu/ml	Stdv	Gns. cfu/ml	Stdv
0	2,48	±0,6	2,75	±0,0	2,76	±0,1	2,79	±0,1
2	2,64	±0,1	2,83	±0,0	2,81	±0,0	3,46	±0,1
4	2,77	±0,1	2,88	±0,0	3,44	±0,2	5,79	±0,1
6	2,73	±0,0	2,89	±0,1	4,41	±0,1	7,45	±0,1
24	3,26	±0,2	5,01	±0,0	8,39	±0,1	8,41	±0,1
30	3,55	±0,1	5,77	±0,1	8,59	±0,1	8,61	±0,1

**Tabel 2.** Data fra bestemmelse af salmonella isolaters nølefase på kødoverflader ved 10, 15, 20 og 37°C. Data er angivet som gennemsnitlige kimalt (n=5) og standardafvigelse.

Timer	Temperatur							
	10°C		15°C		20°C		37°C	
	Gns. cfu/ml	Stdv	Gns. cfu/ml	Stdv	Gns. cfu/ml	Stdv	Gns. cfu/ml	Stdv
0	2,73	±0,2	2,56	±0,1	2,73	±0,1	2,85	±0,1
2	2,65	±0,1	2,72	±0,2	2,74	±0,1	2,68	±0,1
4	2,55	±0,2	2,67	±0,1	2,78	±0,1	3,15	±0,4
6	2,92	±0,1	2,62	±0,1	2,96	±0,1	4,05	±0,7
24	2,87	±0,5	4,18	±0,7	6,11	±0,5	7,20	±0,2
30	2,83	±0,3	4,00	±0,3	7,18	±0,3	7,02	±0,1