



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Bakteriofager som biokontroll av salmonellakontaminerade groddar

Cecilia Björkehag

Uppsala

2012

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:23*

Bakteriofager som biokontroll av salmonellakontaminerade groddar

Cecilia Björkehag

*Handledare: Jacob Ottoson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Biträdande handledare: Roland Lindqvist, Livsmedelsverket*

Examinator: Ivar Vågsholm, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0234, Nivå AX, 24hp*

Nyckelord: Salmonella, groddar, biokontroll, bakteriofag

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:23*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary.....	2
Inledning.....	3
Litteraturstudie	3
Grodधार	3
Livsmedelsutbrott associerade med groddar.....	4
Salmonella.....	4
Risker vid groddning	5
Kontroll av mikroorganismer vid groddning	6
Biokontroll	7
Bakteriofager.....	7
Material och metod.....	8
Stammar	9
Bakterieanalyser	9
Faganalyser	9
Delstudie 1 - Studie i lösning.....	9
Delstudie 2 – Studie under groddning	10
Bestämning av salmonellahalt.....	10
Bestämning av faghalt	12
Pastörisering.....	12
Resultat	12
Delstudie 1 - Studie i lösning.....	12
Delstudie 2 – Studie under groddning	13
Bestämning av salmonellahalt.....	13
Bestämning av faghalt	15
Pastörisering.....	15
Diskussion.....	16
Utvärdering av biokontroll.....	16
Utvärdering av fagens överlevnad under groddning	17
Utvärdering av antagonisters påverkan	17
Utvärdering av pastörisering	18
Utvärdering av metoden	19
Slutsats.....	20
Litteraturförteckning	21

FIGURFÖRTECKNING

Figur 1 <i>Produktionsöversikt alfalfagroddar</i>	6
Figur 2. <i>Groddningskammare</i>	11
Figur 3. <i>Färgomslag i mikrotiterplatta, efter tillsats av tetrazolium</i>	13

TABELLFÖRTECKNING

Tabell 1 <i>Salmonellahalt hos fröer/groddar vid olika steg under groddning efter tillsättande av bakteriofager</i>	14
Tabell 2. <i>Faghalt hos fröer/groddar efter ett och ett halvt dygn</i>	15
Tabell 3 <i>Bakteriehalt av befintliga bakterier på fröer</i>	15
Tabell 4 <i>Salmonellahalt hos fröer/groddar vid olika steg under groddning efter pastörisering</i>	16

Bilaga A PM från studiebesök på Grogården

Bilaga B Sammanfattning internationella groddutbrott 1982-2011

SAMMANFATTNING

Groddar har de senaste årtiondena varit källan till ett antal stora matförgiftningsutbrott (både i Sverige och internationellt), varav de flesta har orsakats av olika serotyper av salmonella. Groddar anses vara ett risklivsmedel på grund av att:

- fröerna vid skörd inte betraktas som blivande livsmedel (vilket gör att kraven på hygien inte är så stora)
- risken för mikrobielltillväxt är stor under groddning, då denna sker i en gynnsam miljö för mikroorganismer med avseende på temperatur och fuktighet
- det inte finns någon optimal kontrollmetod för att hindra mikrobielltillväxt under groddning. I Sverige tillämpas värmebehandling av fröerna innan groddning men groddar värmebehandlas inte före konsumtion

Biokontroll med bakteriofager har tidigare undersökts på fröer innan groddning samt andra livsmedel. En minskning av salmonellahalt har setts med upp till 3,5 log (99,97%).

I den här studien undersöktes bakteriofagens påverkan av antal salmonellabakterier både i lösning och under groddning. Metoden för groddning utformades med utgångspunkt att efterlikna groddproduktion i större skala.

På grund av att fröerna som har använts i studien redan från början innehöll bakterier har resultaten varit svårtolkade med avseende på salmonellaväxt. Resultaten har inte kunnat säkerställas statistiskt. Efter tillsättning av bakteriofager till salmonellakontaminerade fröer har en initial minskning av salmonellahalten setts. Bakteriofagen som har använts har visats överleva groddningen. En mindre studie gjordes på värmebehandling av fröer, där kundcesalmonella inte påvisas med den använda metoden ($<10^2$ CFU/ml). De befintliga bakterierna på fröerna överlevde till viss del värmebehandling.

I den här studien gav både pastörisering och bakteriofager de befintliga bakterierna på fröerna en kompetitiv fördel gentemot salmonellan under groddning. Detta ger en indikation om att det finns potential för bakteriofager att fungera som biokontroll av salmonellakontaminerade groddar. För att vidare utvärdera om metoden kan användas som komplement till nuvarande kontrollmetoder, för att öka livsmedelssäkerheten i groddproduktion, krävs mer forskning. För vidare studier krävs att problemet med befintliga bakterier på fröerna övervinns. Resultaten från pastöriseringsstudien samt litteraturstudien som har gjorts stödjer den nuvarande rekommendationen om värmebehandling av fröer innan groddning. Rekommendationen bör även innefatta de groddar som groddas hemma av konsumenten, värmebehandlingen bör utföras likt metoden som används inom den svenska industrin, alternativt att fröerna industriellt pastöriseras innan försäljning till konsumenterna.

SUMMARY

Sprouts have, the last decades (both in Sweden and internationally), been the source to a number of food poisoning outbreaks and these have often been caused by different serotypes of salmonella. Sprouts are considered food at risk since

- seeds are not treated as future food in the initial steps of harvest, therefore aren't the demands of hygiene management high
- the environment that the sprouting takes place in enables microbial growth, in regard to temperature and humidity
- there is today no optimal control method to prevent microbial growth. In Sweden we are currently using heat treatment of the seeds before sprouting

Bio control with bacteriophages has previously been researched on seeds before sprouting but also on other food. A reduction of salmonella has been seen with up to 3,5 log (99,97%).

In this study the bacteriophages effect on it's host strain was investigated both in broth solution and during sprouting. The method that has been used to sprout was designed to resemble the industrial production of sprouts as much as possible.

The seeds that were used in the study contained bacteria from the beginning. Due to this fact the interpretation of salmonella growth became hard. No statistical data have been collected. Initially a reduction of salmonella was seen after adding bacteriophages to infected seeds. It has been shown that the bacteriophage used has survived during sprouting. A minor study on heat treatment of seeds was performed, where salmonella wasn't detected with the method that was used ($<10^2$ CFU/ml). Some of the bacteria that already existed on the seeds survived the heat treatment.

In this study both adding bacteriophages and heat treatment gave the already existing bacteria competitive advantage towards salmonella during sprouting. This gives an indication that there is potential for bacteriophages to work as bio control of salmonella infected seeds. To be able to further evaluate if the method can be used as a complement to current control methods, to increase food safety in sprout production, more research is required. To get results that are easier to interpret the problem with already existing bacteria on seeds has to be overcome. The result from the heat treatment study together with the literature overview, that has been done, supports the current recommendation about heat treatment of seeds before sprouting. The recommendation should also include those who sprouts seeds at home. The heat treatment should be done similar to the method used in the Swedish industry, alternatively that the seeds undergo heat treatment before they are sold to the consumers.

INLEDNING

Groddar är idag populär hälsokost och används ofta som ingrediens i sallader, som pålägg och dekoration. Under de senare åren har groddar varit källan till ett antal stora matförgiftningsutbrott (både i Sverige och internationellt), vilket har resulterat i en ökad rädsla att bli sjuk då man äter groddar. Groddningsprocessen är mycket gynnsam för bakteriell tillväxt med avseende på temperatur och fuktighet. Det finns idag inget optimalt sätt att reducera och framför allt inte att eliminera bakterier hos färdigproducerade groddar. Svenska Livsmedelsverket uppmanar därför till vidare utveckling av en säker groddproduktion (Lindmark, 2002). Att undersöka om bakteriofager kan användas som en kontrollmetod kan vara ett steg för att bidra till en ökad livsmedelssäkerhet. European Food Safety Authority (EFSA) har tidigare undersökt bakteriofager i kombination med livsmedel av animalt ursprung (EFSA, 2009). Vidare undersökningar av specifika bakteriofag-/livsmedelskombinationer uppmuntras av EFSA.

Den här studien är en pilotstudie för att utvärdera om bakteriofager kan användas som biokontroll av salmonella i storskalig produktion av groddar, som ett komplement till pastörisering (definieras här som 30 sekunder i 85°C vatten) eller annan desinfektion som sker innan groddningsprocessen. Vidare gjordes en mindre studie på pastöriseringssteget. Vid användning av en kombination av flera kontrollåtgärder (såsom sköljning av fröer, pastörisering innan groddning samt tillsättande av bakteriofager) kan en acceptabel livsmedelssäkerhet uppnås i större utsträckning än vad kontrollåtgärderna enskilt kan göra (hurdle teknologi) (Ross et. al, 2003).

Hypotesen är att med hjälp av tillsats av bakteriofager i blötlägningsvatten alternativt sköljvatten hämma eller eliminera tillväxten av salmonella under groddning. Önskvärt vore att hämningen är så effektiv att man ej riskerar att bli sjuk av att äta de färdiga groddarna.

Rapporten består först av en litteraturstudie av salmonella och groddar, nuvarande kontrollmetoder samt varför biokontroll skulle kunna fungera bra som ett komplement. Därefter följer en beskrivning av den här studien med resultat samt efterföljande utvärdering och diskussion.

LITTERATURSTUDIE

Groddar

När fröer går från att vara just fröer till att börja växa bildas det först en grodd (Sydgrönt, 2011). Grodden är stadiet innan fröet sätter rötter för att kunna hämta näring från jorden och på så vis kunna fortsätta växa till en växt. Under groddningen ökar mängden näringsämnen och de blir mer lättillgängliga för oss att ta upp.

Groddarna började användas som livsmedel i Asien och kom till Europa på 1500- och 1600-talet. Det sägs att engelska flottan använde groddar för att förhindra skörbjugg (Sydgrönt, 2011). I Sverige produceras idag ca 400 ton groddar per år i den storskaliga produktionen och till detta tillkommer ytterligare en stor mängd som odlas hemma direkt av konsumenten (uppskattades 2002 till 220 ton) exakt

hur mycket groddar som konsumeras i Sverige är inte känt (Lindmark, 2002, Bilaga A).

Groddar har visats vara näringsrika, de innehåller bl.a. proteiner, B-vitamin och mineraler (Fordham et al., 1975). Idag används många olika typer av fröer till groddning. De vanligaste groddarna är alfalfagroddar och böngroddar. Även andra groddar finns tillgängliga såsom rödbetsgroddar och purjolökgroddar (Bilaga A, Sydgrönt 2011). I Sverige äts groddarna framförallt råa, medan de i de asiatiska länderna ofta används i wokade måltider. Tillagningen resulterar i ytterligare ett steg för att öka livsmedelssäkerheten, då många patogener (ex. salmonella och *E.coli*) avdödadas vid upphettning. Faktumet att vi äter dem råa gör att kraven på en säker produktion ökar.

Livsmedelsutbrott associerade med groddar

Både internationellt och i Sverige har groddar orsakat ett antal livsmedelsburna sjukdomsutbrott (Lindmark, 2002, Taormina et al., 1999). De vanligaste orsakerna har varit *Escherichia coli*, olika serotyper av *Salmonella* och *Bacillus cereus*, men ytterligare ett antal patogener har gett upphov till sjukdom som har kopplats till groddar (EFSA, 2011a). Mellan 1973 och 1998 rapporterades 15 sjukdomsutbrott över hela världen, där orsaken var groddar kontaminerade med olika serotyper av salmonella (Taormina et al., 1999). I Sverige rapporterades från 1988 till 2009 12 livsmedelsutbrott orsakade av groddar kontaminerade med olika serotyper av salmonella (Werner et al., 2007, Lindblad M., 2009a, Lindblad M., 2009b, Lindblad M., 2010). En sammanfattning av internationella utbrott mellan 1988-2011 återfinns i bilaga B.

Det största utbrottet orsakat av groddar, var i Japan 1996. Orsaken var *E. coli* O157:H7. Ca 10 000 fall rapporterades varav 6 000 kunde konfirmeras med odling (Taormina et al., 1999). Vid utbrottet i Tyskland och Frankrike våren/sommaren 2011 rapporterades knappt 4 000 sjukdomsfall. Orsaken var importerade fröer från Egypten som var kontaminerade med *E. coli* O104:H4 (EFSA, 2011b). Dödsfall rapporterades vid båda utbrotten.

Under de tre senaste svenska utbrotten (mellan 2003 och 2007) insjuknade drygt 200 personer totalt (Lindblad M., 2009b). Det största svenska utbrottet var 1994 och orsakades av importerade alfalfafröer från Australien som var kontaminerade med *Salmonella bovismorbificians*, en relativt ovanlig serotyp (Ponka et al., 1995). Utbrottet sträckte sig över både Sverige och Finland. Totalt insjuknade 492 personer, varav 282 personer i Sverige. Inga dödsfall rapporterades (Montville and Matthews, 2005, Lindblad M., 2009b). Utbrottet medförde en kraftigt sänkt konsumtion av groddar i Sverige (Lindmark, 2002). Under våren/sommaren 2011 kunde en sänkt efterfrågan av groddar ses även i Sverige och svenska producenter är fortfarande (oktober, 2011) inte uppe i full produktion (Bilaga A). I samband med utredningen av det tyska utbrottet avrådde Livsmedelsverket, under drygt en vecka (2011-06-27 till 2011-07-06), konsumenterna från att äta groddar överhuvudtaget vilket kan vara en trolig anledning till att efterfrågan sänktes (Livsmedelsverket, 2011a, Livsmedelsverket, 2011b).

Salmonella

I Sverige är salmonella tillsammans med campylobacter de vanligaste bakteriella orsakerna till matförgiftning (Lindblad M., 2010, Lindblad M., 2009b, Lindblad M., 2009a, Smittskyddsinstitutet 2012). Salmonella är en liten, gramnegativ, ickesporulerande stav (Adams and Moss, 2008). Det finns ca 2 400 serotyper av salmonella. *Salmonella* Enteritidis och *Salmonella* Typhimurium är de vanligaste serotyperna som orsakar matförgiftning.

Bakterien finns normalt i mag-tarmkanalen hos ett stort antal djur och insekter, utan att de visar klinisk sjukdom (Adams and Moss, 2008). Salmonella kan växa till mellan 5 - 47°C, men optimal temperatur för tillväxt är 37°C. Salmonella avdödas vid upphettning, 60 - 70°C.

Risklivsmedel för salmonella är kött, ägg och vegetabilier som sallad inklusive groddar. I Sverige finns en omfattande kontrollverksamhet inom animalieproduktionen, därför anses importerade livsmedel (framför allt vegetabilier) innebära störst risk för salmonellasmitta.

Vanliga symptom vid matförgiftning orsakad av salmonella är feber, nedsatt allmäntillstånd, illamående, buksmärter, kräkningar och diarré (Adams and Moss, 2008). Inkubationstiden är vanligen mellan 6 och 48 timmar. Generellt brukar det krävas stora mängder bakterier för att orsaka sjukdom, vanligtvis minst 10⁶ bakterier. Detta kan variera beroende på serotypens virulens, individens mottaglighet och vilket livsmedel som är kontaminerat. Vid ett antal utbrott har en infektionsdos så låg som 10-100 bakterier visats (Adams and Moss, 2008)

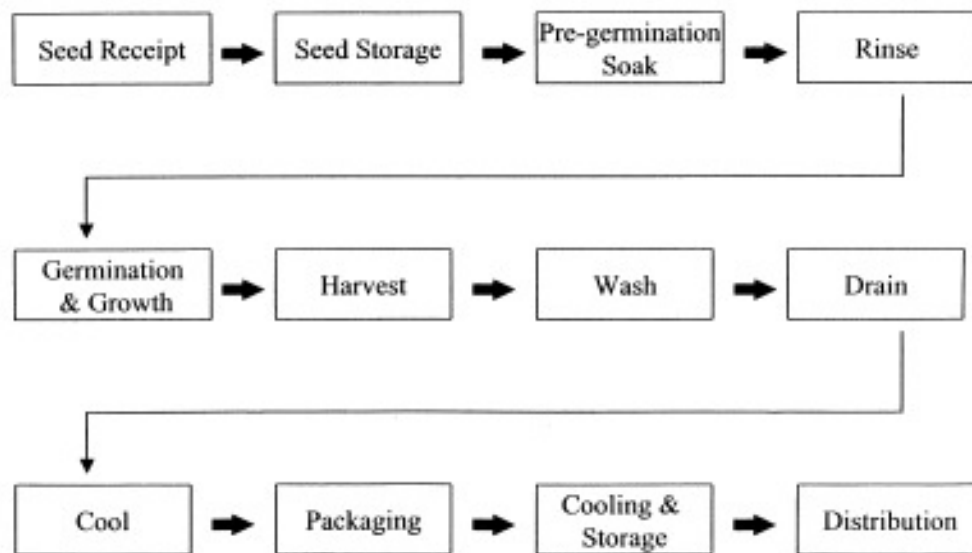
Risker vid groddning

Groddar är en färskprodukt som rekommenderas att ätas kort (ca en vecka) efter skörd (Lindmark, 2002, Bilaga A). Generellt är risken för kontamination av färska frukt- och grönsaksprodukter som störst ”på fältet”, vid initial bearbetning och i konsumentens kök (Lynch et al., 2009). Detta kan även appliceras på groddindustrin då kontamination framför allt sker under skörd och lagringen av fröer, men kan ske i princip när som helst mellan skörd och förtärande (NACMCF, 1999). Den största kontaminationsrisken är förorenat vatten och otillräcklig kontroll av vilda djur så som möss, råttor och fåglar (både under odling och lagring).

Vid skörd kontamineras fröerna ofta med smuts och lera. Vid skörden är fröernas slutgiltiga ändamål inte alltid bestämt. De kan t.ex. användas vidare inom jordbruk eller säljas till groddproducenter (EFSA, 2011a). Detta leder till att fröerna inte behandlas som blivande livsmedel från början, utan ses som livsmedel först hos groddproducenten. De reningsprocesser som sedan sker i samband med lagring, sortering, tvätt och förpackning reducerar antalet patogener, men eliminerar dem inte (NACMCF, 1999). Under stegen där fröerna utvecklas till groddar kan patogener både öka (t.ex. gynnsamma förhållanden för tillväxt eller p.g.a. dålig hygien) och minska till antalet (t.ex. om rengöringsstegen lyckas). Företagens rutinprotokoll i form av GMP (Good Manufacturing Process), GHP (good hygienic practice) och HACCP (hazard analysis critical control points) samt

personalens faktiska dagliga rutiner och kunskap om hygien spelar stor roll när det gäller livsmedelssäkerheten.

Produktionen börjar med att fröerna blötläggs, detta för att fröet ska svälla och frökapseln ska mjukna. Därefter sköljs fröerna. Själva groddningen sker normalt mellan 20 och 26°C (internationellt) och i ca 15°C (i Sverige), i roterande trummor, bäddar eller tunnor. Vatten (av dricksvattenkvalitet) tillsätts med jämna mellanrum till trumman, bädden eller tunnan (NACMCF, 1999, Lindmark, 2002). Det går åt stora mängder vatten vid produktion (NACMCF, 1999, Bilaga A). Beroende på vilken typ av frö som används och i vilken miljö groddningen sker tar groddningen olika lång tid. För alfalfafröer tar groddningen mellan 3-7 dagar. Produktionsöversikt över alfalfagroddar kan ses i figur 1. Miljön är, både med avseende på temperatur och fuktighet, optimal för tillväxt av bakterier. Målet är därför att eliminera patogena mikroorganismer innan groddning.



Figur 1. Produktionsöversikt alfalfagroddar. (NACMCF, 1999)

Kontroll av mikroorganismer vid groddning

En grundförutsättning för en säker produktion är att minimera risken för kontamination (NACMCF, 1999). Detta sker bl.a. genom att använda rent vatten och att ha en välplanerad skadedjursbekämpning i alla led. Groddar består som tidigare nämnts till huvudsak av två ingredienser; frö och vatten. Det är oftast fröerna som är kontaminerade.

Fröer är generellt mycket lättare att rengöra än färdiga groddar. Detta både pga att antalet mikroorganismer är lägre men också p.g.a. fröernas respektive groddarnas struktur. Kraven för att desinfektionsprocessen ska vara lyckad är, förutom att minska/eliminera antalet mikroorganismer också, att fröet ska behålla sin förmåga till groddning (fruktsamhet).

Ett första steg att kontrollera fröerna är att provta dem för att se om de innehåller patogener (Lindmark, 2002). Provtagningen kan dock resultera i att man invaggas

i en falsk säkerhet då prov endast tas från en liten del av partiet. Det finns därför en stor risk att bakterierna missas (Inami et al., 2001). Salmonella kan finnas kvar i groddfröer i flera år.

Nästa steg är att försöka eliminera bakterier som finns bland fröerna. Försök har gjorts med olika kemiska desinfektionsmedel (ex. klor, etanol, olika väteperoxidkombinationer och ozonlösningar) (NACMCF, 1999). Andra metoder som används för desinfektion är bl.a. surfaktantlösningar, värmebehandling och strålning. Många av dessa metoder lyckas reducera bakterieantalet med 1-2 log (90-99%), men ingen lyckades eliminera bakterierna fullständigt vilket gör att riskerna med livsmedlet kvarstår. Det finns i nuläget ingen optimal metod för att rena fröer från patogener (Montville and Schaffner, 2004). En framkomlig väg för att reducera smittrycket kan vara att använda sig av en kombination av olika metoder (hurdle-teknologi) (Ross et. al, 2003).

Internationellt används idag ofta en kombination av olika desinfektionsprocesser (NACMCF, 1999). US Food and Drug Administration (FDA, USAs motsvarighet till Livsmedelsverket) rekommenderar att fröer blötläggs i vatten med 20 000 ppm kalcium hypoklorit (Montville and Schaffner, 2004, FDA, 1999). Detta trots att studier med relativt höga klorhalter har gjorts utan att bakterierna har eliminerats samt att det finns andra metoder som reducerat bakteriehalten mer effektivt (Jaquette et al., 1996). Försök att tillföra olika antimikrobiella medel (bl.a. väteperoxid och olika kombinationer av klorlösningar) under själva groddningsprocessen har också gjorts (Fett, 2002), även detta utan några framgångsrika resultat. I Sverige pastöriserar de flesta groddodlare fröerna innan groddning, vanligen genom att sänka ner groddarna i 85°C vatten i 30 sekunder (Lindmark, 2002, Bilaga A).

Biokontroll

Biokontroll innebär att tillväxt av vissa mikroorganismer (framförallt patogener) kontrolleras med hjälp av andra mikroorganismer. Som konstaterats tidigare så sker groddningen under nästintill optimala förhållanden för att t.ex. bakterier ska kunna växa till (med avseende på temperatur och fuktighet). Den trivsamma miljön skulle kunna utnyttjas genom att tillsätta andra mikroorganismer, som också trivs men inte är sjukdomsframkallande, utan istället kan bekämpa patogenerna som finns bland fröerna.

Tidigare när potentiella metoder för biokontroll av salmonella har studerats, har bakteriofager (Leverentz et al., 2001, Whichard et al., 2003, Kocharunchitt et al., 2009, Pao, 2004), olika antagonistbakterier (Leverentz et al., 2006, Ye et al., 2010) samt kombinationer av antagonister och bakteriofager undersökts.

Bakteriofager

Bakteriofager (fager) är virus som infekterar bakterier (Quinn et al., 2011, Thougard Herluf et al., 2007). Det finns två typer av bakteriofager; lytiska fager och temperata fager. De lytiska fagerna är virulenta för värdbakterierna. Vid infektion förökar sig fagen i bakterien och lyserar därigenom bakteriecellen. De temperata fagerna, också kallade profager, kan växla mellan lytisk- och lysogenfas. Under den lysogena fasen är de ofta inkorporerade i bakteriers DNA

eller finns som plasmider i bakteriernas cytoplasma. Då bakterien förökar sig, nedärvs även det inkorporerade virus-DNA:t. När profagerna övergår i lytisk fas blir de virulenta och lyserar bakteriecellen. Bakteriofager är oftast värdspecifika. Det innebär att en viss typ av bakteriofag bara infekterar en subtyp av en bakteriefamilj och inte flera, vilket vore önskvärt vid användande som biokontroll.

Bakteriofager kan användas dels som direkt kontroll (hämmande på bakterier) och dels som biomarkör för om det finns patogener i livsmedel (Hagens and Loessner, 2007). Sedan 1960-talet har det publicerats studier som har visat bakteriofagers effektivitet som biokontroll för olika värd bakterier (Jay et al., 2005). De flesta av dessa studier har utförts på laborativ nivå i buljong.

De bakteriofager som hittills har undersökts med avseende på livsmedelskontroll har anrikats från framför allt miljöprover, avloppsvatten, avföring och jord (Greer, 2005). Bakteriofager kan även finnas naturligt i olika livsmedel, men i de fall bakteriofager har påvisats i livsmedel har också en hög koncentration patogena bakterier (5 log CFU/g) setts.

År 2006 godkände FDA användandet av bakteriofager som kontroll av *Listeria monocytogenes* i kalla kött- och kycklingprodukter så som korv, kallskuret och smörgåspålägg (Bren, 2007). *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* och *Listeria* är patogener som potentiellt skulle kunna kontrolleras med hjälp av bakteriofager (Mahony et al., 2011). För att bakteriofager ska kunna användas som biokontroll måste att antal kriterier vara uppfyllda. Fager som används bör vara strikt lytiska och bör inte kunna överföra gener/information mellan sig och bakterier. Detta för att minimera risken för resistensutveckling. Fagernas värdspecifitet bör även vara noga utvärderad. I vissa fall kan det vara önskvärt att använda sig av en fag med begränsad värdspecifitet, men i de flesta fall är det mer gynnsamt med bred specificitet. I de fall där fagen används direkt i livsmedel måste den kunna överleva och verka i den miljön som livsmedlet förvaras. Det är också viktigt fagens biosäkerhet och resistensmönster utvärderas innan praktisk tillämpning (Hagens and Loessner, 2007). Förutom att fagen inte ska vara direkt toxisk för människan (eukaryota celler) bör den ha minimal påverkan på konsumentens tarmflora (Mahony et al., 2011).

Fördelar med att använda bakteriofager som biokontroll är att de finns naturligt i vår omgivning och att de är specifika. De är självbevarande och om det finns ett tillräckligt stort antal mottagliga bakterier fortsätter de att föröka sig och infektera bakterierna (Greer, 2005). Detta gör att användandet av bakteriofager kan vara väldigt kostnadseffektivt. Det finns inte heller något som tyder på att livsmedlen skulle ta skada (ex. förändrat utseende, smak och lukt) av tillsatta bakteriofager.

Nackdelar som har diskuterats med användande av bakteriofager är att det finns en risk för utveckling av resistens (Kudva et al., 1999, Mahony et al., 2011, Greer, 2005), därför kan en kombination av olika fager behöva användas. Fager har visats kunna överföra virulensfaktorer mellan bakterier, men fler studier bör göras på detta (Whichard et al., 2003). Det finns argument för att bakteriofager inte skulle vara tillräckligt effektiva (Greer, 2005), men det bör utredas ytterligare. Det är även svårt att hitta bakteriofager med tillräckligt bred värdspecifitet.

Tidigare studier där bakteriofager har använts för att kontrollera just salmonella hos groddar har gjorts (Kocharunchitt et al., 2009, Pao, 2004). I båda studierna har bakteriofager tillhörande familjerna *Myoviridae* och *Siphoviridae* använts. Studierna har visat att fagerna överlever groddningsprocessen. Pao et. al reducerade salmonellatillväxten med 0,5-1,37 log (68-95,7%). Båda studierna anser att det finns potential för vidare forskning inom området. Vid studier där en kombination av fager och antagonistbakterier har använts (Ye et al., 2010) lyckades bakteriehalten reduceras så att salmonella endast kunde påvisas vid anrikning.

Andra livsmedel där bakteriofager har undersökts som biokontroll med avseende på salmonellaväxt är t.ex. melon, äpple (Leverentz et al., 2001) och kycklingkorv (Whichard et al., 2003). I studierna har salmonellahalten reducerats med 2-3,5 log (90-99,97%).

MATERIAL OCH METOD

Studien bestod av två delar. I den första delen av studien undersöktes vid vilka koncentrationskombinationer som bakteriofager lyckades hämma bakterietillväxten så att salmonella inte kunde påvisas. Dessa siffror användes sedan för att se om samma koncentrationer var applicerbara under groddning under den andra delen av studien.

Stammar

Bakteriofagen som användes var fag *Salmonella* Typhimurium typ 28b. Bakteriestammen som användes var *Salmonella* Typhimurium typ 5 (värdstam för den aktuella fagen). Kombinationen av bakteriofag – värdstam har använts i tidigare försök med avloppsvatten (Carlander, 2000).

Bakterieanalyser

Bestämning av bakteriekoncentrationer respektive bakteriehalter har skett genom odling. Spädningsserie (1:10) av bakterieproverna gjordes under delstudie 1 i TSB-buljong (SVA-produktion, Uppsala, SE) och under delstudie 2 i fysiologisk natriumklorid (0,9%, SVA-produktion). Under delstudie 1 odlades proverna på LB-agar (Sigma, St Louis, Missouri) och under delstudie 2 på brilliant green agar (BG) (SVA-produktion). 100 µl från spädningsserierna togs och spreds ut över agarplatta. Odling skedde i 37°C över natt och därefter räknades antalet kolonier som växt ut. Detektionsnivån var 100 CFU/g.

Faganalyser

Fag 28b propagerades på sin värdstam enligt standardmetod (Anonym, 2000). Värdstammen odlades i LB (Sigma) på roterande inkubator vid 37 °C under 90 minuter. Bakteriofager från ett lysat tillsattes med ett beräknat MOI (antalet plaque forming units, PFU/ antalet colony forming units, CFU) = 1 (~10⁸ PFU/ml). Inkuberingen fortsatte i ca 5 timmar. Lösningen centrifugerades 3000 g under 10 minuter och supernatanten sterilfiltrerades för att avskilja eventuella bakterier. Lysatet titrerades enligt nedan och visade sig ha en titer på 2x10¹¹ PFU/ml.

Bakterier (värdstam) anrikades i LB-buljong (Sigma) under 3 timmar, 37°C i snurrande inkubator. Spädningsserier (1:10) av faglysatet, likt vid bakterieanalyserna, gjordes. Odling gjordes enligt dubbelagarmetoden på LB-agar (Adams, 1959). Odling skedde i 37°C över natt och därefter räknades av antalet plaque som bildats.

Delstudie 1 - Studie i lösning

Metoden för försöken grundas till stor del på en metod som har använts vid ett tidigare försök där faglys av salmonella studerats (McLaughlin, 2007). Försöken gjordes i en mikrotiterplatta där bakterier och fager av olika koncentrationer tillsattes i brunnarna. Därefter kontrollerades huruvida fager hade lyserat bakterierna med hjälp av tetrazolium. I det här försöket användes 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (Sigma). Tetrazolium är en redox-indikator som reduceras till formazan vid kontakt med levande celler, vilket ger ett rött färgomslag. Då infärgningsmetoden inte fungerade till en början verifierades resultaten, d.v.s. om det fanns bakterier i proven eller inte, med hjälp av ytterligare två metoder; mätning av absorbans i ELISA-mätare och utodling av samtliga brunnar på LB-agar (endast vid första försöket). Försöket upprepades fyra gånger.

Bakterier anrikades i TSB-buljong (SVA-produktion) under 3-4 timmar i 37°C, i snurrande inkubator. 80µl bakterieprov från olika spädningar tillsattes i varje brunn. Därefter tillsattes 80 µl bakteriofager från olika spädningar, varefter inkubering i 37°C, i snurrande inkubator utfördes över natt. Efter det mättes absorbansen i brunnarna i mikrotiterplattan med ELISA-mätare, våglängd 595 nm. Innan mätning tillsattes ytterligare en rad med bakterier från spädningsserien, och en brunn med endast buljong, som kontroll. Efter mätningen tillsattes 40 µl tetrazoliumlösning med koncentration 1,2 mg/ml till alla brunnar. Mikrotiterplattan inkuberades under ytterligare 2 timmar, i 37°C, i snurrande inkubator. Därefter lästes plattan av med avseende på synligt färgomslag.

Bedömning av vilken bakteriofagkoncentration som krävs för att minska bakteriekoncentrationen gjordes genom bestämning av koncentration tillsatta bakterier respektive tillsatta bakteriofager enligt metod för bakterie- respektive faganalys beskriven ovan.

Delstudie 2 – Studie under groddning

Bestämning av salmonellahalt

Groddningen skedde vid två olika temperaturer. Dels vid 25°C, som representerar den temperatur som används vid produktion internationellt (NACMCF, 1999), dels vid 15°C som representerar den svenska produktionen (Lindmark, 2002)(Bilaga A). Fröerna som användes var alfalfafröer med ursprungsland Italien. Fröerna köptes i hälsokostbutik, fröer från samma påse användes under hela studien. Fröerna förvarades i rumstemperatur under sex veckor.

Metoden som användes för groddningen försökte efterlikna en större produktion i den mån det var möjligt (mörk och fuktig miljö, där vatten kan rinna bort från fröerna efter sköljning). Fröerna blötades först i vatten under ca 6 timmar, i 25°C. Sedan placerades de i ”groddningskammare” (upp-och-nervänd låda för

pipettspetsar med kaffefilter i botten, se figur 2). Kranvatten tillsattes i groddningskammarna morgon och eftermiddag (kallas här sköljning).



Figur 2. Groddningskammare som har använts i studien. Groddar odlade i 3 dygn i 15°C.

Fröerna kontaminerades med salmonella i samband med blötläggningen. Bakterier togs från agarplatta (ett antal kolonier) och slammades upp i 200 ml kranvatten. 200 μ l från denna lösning överfördes till ett annat kärl med 200 ml kranvatten. 12 g fröer tillsattes varje kärl. Efter 3 timmar hälldes bakterievattnet av och varje kärl delades upp i ytterligare två kärl. I alla fyra kärl tillsattes 100 ml kranvatten och i två av kärnen (ett med hög och ett med låg bakteriekoncentration) tillsattes 1 ml faglösning med koncentrationen 2×10^{11} PFU/ml. Blötläggningen varade i ytterligare 3 timmar. Vid varje temperatur användes fyra groddningskammare. Fröerna sköljdes morgon och eftermiddag med 15 ml kranvatten. Behandlingen upprepades i 3 dagar.

Prov för odling togs från bakterievattnet innan tillsättning av fröer, från fröer efter avhällning av bakterievattnet samt efter avhällning av fag-/kontrollvatten, dvs. innan placering i groddningskammare. Under groddningen togs prov från fröerna/groddarna vid två tillfällen, dels efter ett och halvt dygn och dels efter tre dygn. 5-10 g fröer/groddar blandades i stomacher med fysiologisk natriumklorid (0,9%, SVA-produktion) (spädning 1:10) under 1 minut. Bakterieanalys gjordes enligt metod beskriven ovan.

Försöket upprepades fem gånger (under fem veckor), med några justeringar mellan dem. Vid omgång ett blötlades groddarna i bakterievatten i 6 timmar och fager tillsattes sedan i sköljningsvattnet (150 μ l faglösning i 15 ml vatten), prov togs då endast efter tre dygns groddning. Vid omgång två togs inga odlingsprov från kamrarna med låg bakteriekoncentration under groddning. Vid omgång tre, fyra och fem användes dubbel mängd fröer (och således även dubbel mängd vatten och faglösning). Vid omgång tre pastöriserades groddarna i 30 sekunder i

80°C vatten innan blötläggning. Vid omgång fyra och fem pastöriserades fröerna i 60 sekunder i 80°C vatten innan blötläggning.

Bestämning av faghalt

Faganalys gjordes på prover som tagits efter andra blötläggnings samt prover tagna efter groddning i ett och ett halvt dygn vid omgång två, tre och fem. Faganalys gjordes även på kontroller från omgång tre för att verifiera att fager inte sugits upp av filtret i groddningskammaren. Faganalys gjordes enligt metod beskriven ovan.

Pastörisering

Efter omgång tre tillsattes fröer utan bakterietillsats i LB-buljong, under 4 timmar i 37°C i snurrande inkubator, för att försöka anrika bakterier som redan fanns på fröerna. Bakterianalys av dessa samt ej blötlagda fröer gjordes enligt metod beskriven ovan.

Vid omgång fyra odlades groddar i ytterligare två kamrar, vid båda temperaturerna. Inga bakterier eller fager tillsattes i dessa kamrar. Pastörisering i 60 sekunder i 80°C vatten gjordes av 12 g fröer innan blötläggning, 12 g fröer blötlades utan någon behandling (kontroll). Prov för odling togs efter ett och ett halvt dygn på samma sätt som vid utvärdering av salmonellatillväxt.

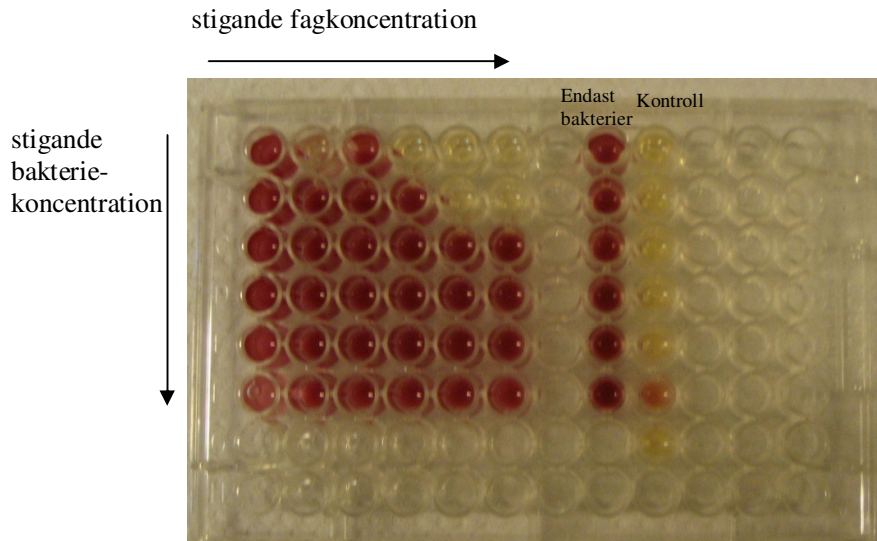
Även vid omgång fem odlades groddar i ytterligare två kamrar, vid varje temperatur. Samma mängder som vid bestämning av salmonellahalt användes. Opastöriserade fröer blötlades i bakterievatten i 3 timmar. Därefter pastöriserades hälften av fröerna i 80°C vatten i 60 sekunder och blötlades sedan på nytt i ytterligare 3 timmar. Den andra hälften (kontroll) blötlades också på nytt i ytterligare 3 timmar. Prov för odling togs från det första blötläggningssvattnet, från fröer efter blötläggning ett, efter blötläggning två, vid ett och ett halvt dygn samt efter tre dygn. Bakterianalys gjordes enligt metod beskrivning ovan.

RESULTAT

Delstudie 1 - Studie i lösning

Resultat vid tetrazoliuminfärgning, mätning av absorbans i ELISA-mätare samt odling på LB-agar stämde överens gällande förekomst av bakterier.

Salmonella kunde inte påvisas i de brunnar där relationen tillsatta PFU/CFU var $\geq 10^6$. I övriga brunnar kunde bakterier påvisas, men lägre absorbansvärden sågs i de brunnar med låga bakteriekoncentrationer där PFU/CFU låg nära 10^6 . Ingen vidare kvantitativ bedömning av detta gjordes. Exempel på färgomslag i mikrotiterplatta kan ses i figur 3.



Figur 3. Undersökning av vilka koncentrationskombination fag/värdstam som krävs för att avdöda värdstamen. Färgomslag i mikrotiterplatta efter inkubering av fag/värdstam samt tillsats av tetrazolium

Delstudie 2 – Studie under groddning

Bestämning av salmonellahalt

Bestämning av salmonellahalten försvårades p.g.a. att fröerna redan var kontaminerade med bakterier, vilka under groddning till viss del konkurrerade ut salmonellabakterierna som tillsatts. Baserat på bedömning av bakteriernas utseende på BG-agar ansågs fröerna vara kontaminerade med *Klebsiella* samt ytterligare någon art inom familjen *Enterobacteriaceae* (personlig kommentar L. Fernström, BVF, SLU). Resultat för bakterieanalyserna av fröer och groddar presenteras i tabell 1. Om tabellen läses i vertikalt plan kan salmonellatillväxten jämföras vid olika omgångar, vid samma provtagningstillfälle under processen. I horisontellt plan kan salmonellatillväxten följas under samma omgång, vid olika provtagningstillfällen (d.v.s. vid olika tillfällen under blötläggning samt groddning). I de fall där räkning av kolonier var möjlig finns halt angiven, i övriga fall finns en bedömning av de bakterier (övriga *Enterobacteriaceae*) som växte samt om salmonella kunde ses eller ej. Vid en subjektiv bedömning av tätheten av bakterieväxt efter inkubering på BG-agar över natt, bedömdes växten övriga *Enterobacteriaceae* tätare på prover från fagbehandlade fröer jämfört med kontroller, störst skillnad kunde ses vid groddning vid 15°C. Ingen vidare kvantitativ bedömning av övriga bakterier gjordes. Vid omgång fyra var det ingen bakterieväxt, varför denna omgång är utelämnad i tabellen.

Salmonellahalt hos fröer/groddar vid olika steg under groddning efter det att alfalfafröer kontaminerats med salmonella samt antingen blötläggning (fag) eller inte behandlats ytterligare (kontr.)

Bakteriekoncentration blötläggningssvatten		Bakteriehalt fröer efter blötläggning 1		Bakteriehalt fröer efter blötläggning 2				Bakteriehalt groddar/fröer efter 1½ dygn				Bakteriehalt groddar/fröer efter 2 dygn		
[CFU/ml]		[CFU/g]		[CFU/g]				[CFU/g]				[CFU/g]		
Hög	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög	Låg	Hög
				Fag	Kontr	Fag	Kontr	Fag	Kontr	Fag	Kontr	Fag	Kontr	Fag
5x10 ⁶	4x10 ⁴	5x10 ⁶	2x10 ⁴	Ej utfört*				Ej utfört				ÖE S+	ÖE S+	ÖE S+
								Ej utfört				ÖE S+	ÖE S+	ÖE S+
6x10 ⁵	6x10 ²	3x10 ⁵	5x10 ²	1x10 ³ **	3x10 ⁵	<10 ²	<10 ²	2x10 ⁷ E	2x10 ⁷ E	Ej utfört		Ej utfört		
								ÖE S+	ÖE S+	Ej utfört		Ej utfört		
4x10 ⁶	5x10 ⁴	4x10 ⁶	1x10 ⁴	8x10 ⁴ **	6x10 ⁵	3x10 ² **	5x10 ³	7x10 ⁷	1x10 ⁸	2x10 ⁶ E	4x10 ⁶	5x10 ⁷	1x10 ⁸	ÖE S-
								ÖE S+	10 ⁷ E	ÖE S-	ÖE S+	ÖE S+	ÖE S+	ÖE S-
7x10 ⁶ E	6x10 ⁴ E	5x10 ⁶ E	3x10 ⁴ E	4x10 ⁴ **E	2x10 ⁵ E	3x10 ² **E	1x10 ⁴ E	6x10 ⁷ E	7x10 ⁷ E	7x10 ⁶ E	2x10 ⁷	8x10 ⁷ E	8x10 ⁷ E	2x10 ⁷ E
								ÖE S-	ÖE S+	ÖE S-	ÖE S+	ÖE S+	ÖE S+	ÖE S+

ning 1 varade i 6 h

erna mycket små efter inkubering över natt, bekräftat antal CFU efter ytterligare ett dygn i 37°C

Enterobacteriaceae

st av salmonellakolonier

ÖE överväxt av övriga *Enterobacteriaceae*

S- inga salmonellakolonier kunde ses

Bestämning av faghalt

Faganalyser som gjordes på prover tagna från fröer efter blötläggning 2 visade att fagkoncentrationerna i samtliga prover var $> 5 \times 10^8$ CFU/ml (stämmer överens med förväntat värde, tillsatt 2×10^9 PFU/ml). Resultaten från faganalyser som gjordes tagna från groddar/fröer efter ett och ett halvt dygns groddning presenteras i tabell 2. De kontroller som analyserades visade inte någon förekomst av bakteriofager.

Tabell 2. Faghalt hos alfalfafröer/-groddar som har kontaminerats med salmonella samt behandlats med bakteriofager, analysen är utförd efter ett och ett halvt dygns groddning

		Faghalt [PFU/g]	
Omgång 2	15°C	Hög bakteriehalt	$2,6 \times 10^6$
	25°C	Hög bakteriehalt	$6,7 \times 10^8$
Omgång 3	15°C	Hög bakteriehalt	$1,3 \times 10^6$
		Låg bakteriehalt	$1,5 \times 10^6$
	25°C	Hög bakteriehalt	$3,6 \times 10^9$
		Låg bakteriehalt	$5,4 \times 10^8$
Omgång 5	15°C	Hög bakteriehalt	$2,3 \times 10^7$
		Låg bakteriehalt	$2,5 \times 10^6$
	25°C	Hög bakteriehalt	$2,6 \times 10^9$
		Låg bakteriehalt	$2,2 \times 10^9$

Pastörisering

Bakterieanalys av fröer som ej blötlagts samt fröer som anrikats i LB-buljong visade $< 10^2$ CFU/g. Resultat av bakterieanalys av pastöriserade respektive opastöriserade fröer, utan tillsats av salmonella, efter ett och ett halvt dygns groddning presenteras i tabell 3. Resultat av bakterieanalys av fröer som pastöriserats efter tillsättning av salmonella presenteras i tabell 4.

Ingen försämrad grobarhet sågs vid pastörisering av torra fröer. De fröer som pastöriserades efter 3 timmar blötläggning groddade inte.

Tabell 3. Bakteriehalt hos alfalfafröer/-groddar som har värmebehandlats innan groddning, bakterier har ej tillförts fröerna, analysen är utförd efter ett och ett halvt dygns groddning

		Bakteriehalt [CFU/g]	Bedömning koloniernas utseende
Opastöriserade fröer utan salmonella	15°C	5×10^5	Blandflora, delvis grön/gula, slemmiga, utflytande stora kolonier kolonier (<i>Klebsiella</i>)
	25°C	$>> 3 \times 10^7$	Överväxt av grön/gula, slemmiga, utflytande stora kolonier kolonier: (<i>Klebsiella</i>). Blandflora sågs under.
Pastöriserade fröer utan salmonella	15°C	4×10^4	Små gröna kolonier i renkultur, någon typ av <i>Enterobacteriaceae</i>
	25°C	$> 3 \times 10^7$	Små gröna kolonier i renkultur, någon typ av <i>Enterobacteriaceae</i>

Tabell 4. Salmonellahalt hos fröer/groddar vid olika steg under groddning, efter det att alfalfafröer först har kontaminerats med salmonella, sedan värmebehandlats (pastörisering) alternativt inte behandlats ytterligare (kontroll)

		Bakteriehalt	
		[CFU/g]	
Blötläggning		4×10^6	
[CFU/ml]			
Fröer efter blötläggning 1		3×10^6	
Fröer efter blötläggning 2	Pastörisering	$< 10^2$	
	Kontroll	2×10^6	
Groddar/fröer efter 1½ dygn	Pastörisering	15°C	$< 10^2$
		25°C	Växt övriga <i>Enterobacteriaceae</i> , framförallt <i>Klebsiella</i>
	Kontroll	15°C	$2,5 \times 10^7$ + <i>Klebsiella</i>
		25°C	Växt övriga <i>Enterobacteriaceae</i>
Groddar efter 3 dygn	Pastörisering	15°C	Riklig växt övriga <i>Enterobacteriaceae</i> *
		25°C	Riklig växt övriga <i>Enterobacteriaceae</i> *
	Kontroll	15°C	Riklig växt övriga <i>Enterobacteriaceae</i> , kan se enstaka salmonellakolonier i botten*
		25°C	Riklig växt antagonister kan se enstaka salmonellakolonier i botten*

*Vid jämförelse av bakterieplattor med prov från samma spädning, kunde en tätare växt övriga *Enterobacteriaceae* ses på kontrollerna jämfört med de pastöriserade proverna.

DISKUSSION

Groddar är ett risklivsmedel eftersom de produceras under förhållanden som är gynnsamma för bakterietillväxt. I den här studien har jag undersökt om bakteriofager kan tillföras för att hämma tillväxten av salmonella under groddning, önskvärt vore om salmonellahalten i de fagbehandlade proverna inte bara var lägre än sin kontroll utan också att dessa halter var lägre än halterna som uppmättes hos fröer efter att dessa kontaminerats. Den befintliga bakteriefloran som fanns på fröerna växte snabbare än salmonellabakterierna jag tillsatte, vilket omöjliggjorde vidare kvantitativ bestämning av salmonella på utvecklade groddar. Den befintliga bakteriefloran kommer fortsättningsvis att kallas antagonister.

Utvärdering av biokontroll

Antagonisterna på fröerna jag använde bestod till största del av *Klebsiella* men också av ytterligare någon art inom familjen *Enterobacteriaceae*. Antagonisterna var kompetitiva vid groddning i 25°C, där salmonella till viss del totalt konkurrerats ut. Enligt försäljarens konsumentinformationsavdelning tas prov från fröerna hos fröleverantören (enligt svenska myndigheters anvisningar). Fröerna går inte igenom någon desinfektion eller bakteriehämmande behandling. Provtagning är bra, men som tidigare har konstaterats är det stor risk att bakterier missas vid provtagning. Eftersom detektionsgränsen för patogener är hög måste prov tas på en stor mängd fröer för att kunna hitta dessa bakterier, så stora prover tas i allmänhet inte av fröpartierna (Inami et al., 2001). Man kan alltså inte testa sig till

säkerhet, men man kan verifiera genom provtagning att en process resulterar i acceptabel säkerhet.

Jag kan inte statistiskt säkerställa mina resultat, men vid groddning kan tendenser ses till att bakteriofagerna har haft påverkan på bakteriehalten. Bakteriehalten minskade efter blötläggning två med 1-2 log (90-99%) i de prover som har blötlagts i faglösning jämfört med kontrollerna. Vid odling har dessutom bakteriekolonierna som växt ut från fagbehandlade fröer varit mindre efter inkubering över natt jämfört med kontrollerna. Efter ytterligare ett dygns inkubering växte kolonierna ut till samma storlek som kontrollerna. Vid en subjektiv jämförelse av mängden antagonister från fagbehandlade prov och kontroller bedömdes antalet antagonister vara större på fagbehandlade fröer, vilket kan bero på att antagonisterna har ett försprång gentemot salmonellan som hämmats av bakteriofager. Då antagonisterna från början får en kompetitiv fördel gentemot salmonellan fortsätter deras möjlighet till tillväxt vara större än salmonellans under groddningen.

Under groddning har tillväxt av salmonella skett med 2-4 log. Inte vid någon bakterieanalys av groddar, där salmonellakolonier har kunnat räknas, har bakteriehalten varit lägre hos groddar som groddats i tre dygn jämfört med bakteriehalten hos nykontaminerade fröer. Bakteriehalten har inte heller varit $<10^6$ CFU/g hos några groddar som groddats i tre dygn. Detta gör att det skulle räcka med att äta ett gram groddar för att löpa hög risk att bli sjuk. Att bakterierna initialt har hämmats av bakteriofagerna kan i det här fallet inte anses tillräckligt för att öka livsmedelssäkerheten. Det betyder att resultaten från min studie tyder på att behandling med fager måste kompletteras med andra åtgärder såsom pastörisering.

Utvärdering av fagens överlevnad under groddning

Det finns ett antal olika sätt att beskriva förhållandet mellan värdceller, tillsatta bakteriofager och faktiskt infekterade celler (Bigwood et al., 2009). I många studier har resultaten redovisats som Multiplicity Of Infection (MOI). MOI anses inte vara en optimal redovisningsform (Kasman et al., 2002). I den här rapporten har MOI definierats som tillsatt PFU/CFU och $MOI_{faktiskt}$ som kvoten av PFU som en beräknad halt från faganalys av prover och CFU beräknad utifrån obehandlad kontroll. I mina försök har jag kunnat visa att fagerna fäster bra på fröerna efter blötläggning i faglösning samt att de finns kvar i relativt stor mängd efter groddning i ett och ett halvt dygn. Fagerna har dock inte kunnat föröka sig i samma grad som värdbakterierna. Det största problemet är alltså inte att fagerna inte finns bland groddarna, utan att de inte lyckas infektera salmonellabakterierna. Detta kan bero på ett antal olika faktorer. För det första kan det vara så att temperaturen som groddningen skett vid inte är optimal för att fagerna ska kunna infektera bakterierna. Vidare ska man vara medveten om att sannolikheten att bakteriofagerna ska träffa på värdbakterierna är ganska låg redan i lösning och sannolikheten troligtvis minskar ytterligare när de ska träffa på varandra i ett livsmedel. Resultaten från delstudie 1 visar också att MOI-värdet är väldigt högt för den här kombinationen. I försöken med groddarna uppnåddes inte det värdet. De fröer som blötlades i bakterielösning med hög koncentration hade ett $MOI_{faktiskt}$ -värde på ungefär 10^4 jämfört kontrollerna (påverkan av vattenbyte är medräknat) och de fröer som blötlades i bakterielösning med låg bakteriekoncentration hade ett $MOI_{faktiskt}$ -värde mellan 10^5 och 10^7 . Detta ska då jämföras med det beräknade MOI-värdet från delstudie 1 vilket var 10^6 . Med tanke på att MOI-värdet som krävs höjs ytterligare, då sannolikheten för möte mellan bakterier och fager kan antas sänkas i livsmedel, var alltså värdet för $MOI_{faktiskt}$ för lågt i mina groddförsök för att kunna eliminera salmonella. Det bör dock återigen poängteras att det trots detta sågs viss effekt av fagerna.

Utvärdering av antagonisters påverkan

För att kunna göra ytterligare utvärdering av om bakteriofager skulle kunna ha effekt på salmonellakontaminerade groddar krävs att man kommer förbi problemet med antagonister som omöjliggör räkning av salmonellakolonier. Vid tidigare studier av liknande karaktär har befintliga bakterier på groddarna också varit ett problem (Kocharunchitt et al., 2009). Olika typer av fröer är ofta kontaminerade till olika grad och är olika svåra att rengöra (NACMCF, 1999). Just alfalfafrön innehåller ofta mycket kontaminanter. Förutom att dessa bakterier konkurrerar ut salmonellan, kan de tänkas utgöra en alternativ bindningsyta för fagera vilket ytterligare minskar sannolikheten att bakteriofager ska stöta på just salmonellabakterierna (Wilkinson, 2001).

Biofilmerna som bildas kan ses som ytterligare ett skydd mot patogener. I en studie (Ye et al., 2010) där en kombination av bakteriofager och antagonistbakterier har använts har salmonellatillväxten under groddning hämmats så att salmonella har påvisats endast vid anrikning. Detta kan ge en indikation om att antagonisterna som fanns bland fröerna redan från början inte är av ondo utan snarare tvärt om. En förutsättning för att kunna dra nytta av de befintliga bakterierna är att de inte i sig är patogena. Som antagonister i mina försök har jag sett *Klebsiella* och ytterligare ospecificerad art inom familjen *Enterobacteriaceae*. Värt att påpeka är att det finns patogena *Klebsiellor* och ytterligare ett antal patogener inom familjen *Enterobacteriaceae* (Smittskyddsinstitutet, 2011). För att kunna uttala sig mer om huruvida antagonister i sig kan fungera som biokontroll eller ej bör fler kontrollerade studier (d.v.s. aktivt tillförande av utvalda bakterier och inte att andra bakterier "råkade" finnas bland fröerna) av antagonister göras.

Utvärdering av pastörisering

Att pastörisera fröerna har i det här försöket inte lyckats eliminera antagonister. Att hitta fröer som är sterila från början anses vara omöjligt. Vid studier där befintlig biofilm på fröer har undersökts har reducering/elimination genom tillsats av antimikrobiella medel med sköljvatten varit svårt (Fett, 2000). För att kunna fortsätta utvärdera möjligheter till biokontroll med bakteriofager enligt samma system/metod som jag har använt måste ett sätt där endast salmonellan växer ut vid odling försöka uppnås. Detta genom att använda ett mer selektivt medium alternativt använda en salmonellastam som växer med tydliga karaktäristika så att salmonellakolonierna är lätta att skilja från andra bakteriekolonier vid räkning.

Pastörisering är idag det kontrollsteg som tillämpas för att öka livsmedelssäkerheten för groddar i Sverige (Bilaga A, Lindmark, 2002). Den nuvarande rekommendationen är att doppa fröer i 85°C vatten, under 30 sekunder innan groddning. Dessa rekommendationer baseras på en japansk studie, i stor skala, gjord på mungbönor (Bari et al., 2010a) men resultaten har extrapolerats på alla typer av fröer (personlig kommentar R. Lindqvist, SLV). För att validera metodens säkerhet bör metoden utvärderas på flera typer av fröer. Även i Japan pastöriserar groddodlare (på frivillig basis) fröer innan groddning. Studien gjordes på mungbönor och visade att efter 30-40 sekunder i 85°C vatten kunde varken *Salmonella* eller *E.coli* O157:H7 detekteras. Studien visade också att deras gällande pastöriseringsmetod, 10 sekunder i 85°C vatten var mer effektivt än FDAs rekommendation att blötlägga fröer i 20 000 ppm kalcium hypoklorit.

Mina pastöriseringsförsök visar tendenser till att detta är ett framgångsrikt sätt att döda salmonella men inte andra bakterier som finns bland fröerna. Men även i detta försök så var resultaten otillräckliga för att kunna säkerställa dem statistiskt, tolkning försvårades p.g.a.

växt av andra bakterier. Anledningen till att pastöriseringen gjordes i 60 sekunder (istället för 30 sekunder som är angivet som rekommendation), är att pastöriseringen ansågs otillräcklig vid omgång tre då 30 sekunder användes. Vid pastörisering av torra fröer i upp till en minut har inga tecken på försämrad grobarhet iakttagits. Att grobarheten försämrades så kraftigt i försöket med pastörisering av salmonellakontaminerade groddar, kan antas bero på att groddarna hade varit blötlagda och därför hade bättre konduktivitet än torra fröer. Då värmeöverföringen var mer effektiv, värmdes fröets kärna upp mer och därigenom förlorade den sin förmåga till groddning. I en tidigare japansk studie har grobarheten försämrats med mer än 10% då fröer behandlas i 90°C under 90 sekunder (Bari et al., 2010b), vilket ansågs för mycket i industriell verksamhet. Vid pastörisering i 85°C i 30-40 sekunder minskade grobarheten med ungefär 5% vilket får anses acceptabelt för industriell tillverkning (Bari et al., 2010a).

Enligt groddproducenterna på Grogården betraktas alla fröer som smutsiga innan pastörisering. De upplever inte ev. försämrad grobarhet som ett problem. En nackdel som Grogården presenterade med pastörisering är att det är mycket arbetskrävande, t.e.x tunga lyft och arbete med hett vatten.

Jag har inte läst några studier där man utvärderar hur befintliga antagonister påverkas av värmebehandling. Jag har i min studie sett tydlig skillnad i vilka antagonister som växer till efter värmebehandling, men jag har inte lyckats eliminera dem. Det är känt att antagonisterna kan bilda biofilm på fröer, men osäkert huruvida salmonella och *E.coli* O157:H7 kan göra det (Fett, 2000). Vid både min studie och andra studier som har gjorts är fröerna konstgjort kontaminerade med salmonella, dvs. de tillsatta bakterierna sitter mest sannolikt på frökapselns yta. Förutom faktumet att de befintliga bakterierna kan bilda biofilm, vilket gör dem svårare att få bort, kan det även bero på att de befintliga bakterierna sitter innanför frökapseln. Pastörisering och andra behandlingsmetoder är mer effektiva mot bakterierna som tillsatts då dessa sitter på ytan, medan de redan befintliga bakterierna sitter innanför frökapseln och man helt enkelt inte kommer åt dem.

I Japan äts ungefär 70 gånger mer groddar i kg/person/år än i Sverige. Det hittills största utbrottet var i Japan 1996, men i övrigt har Japan inte varit överrepresenterat i den sjukdomsstatistik jag har tagit del av. Enligt Bari et al (2010a) så har Japan nära noll sjukdomsutbrott (detta gäller lokalt producerade groddar). I Sverige har vi fler groddassocierade utbrott, mellan 1988 till 2009 rapporterats 12 livsmedelsutbrott orsakade av salmonellakontaminerade groddar. (Werner et al., 2007, Lindblad M., 2009a, Lindblad M., 2009b, Lindblad M., 2010). Att risken är högre i Sverige skulle kunna bero på att vi till större del äter groddarna råa (men rapporteringsrutiner som felkälla ska inte uteslutas). Pastöriseringen som tillämpas i Sverige bör kunna anses ge god livsmedelssäkerhet. Riskerna att bli matförgiftad av groddar bedöms, utifrån detta, som störst när man groddar själv hemma (eller i de fall fröerna inte pastöriseras innan groddning). Rekommendation till alla som odlar groddar i hushållet bör vara att pastörisera fröerna innan groddning, liksom metoden som används inom den svenska industrin, alternativt att industriellt pastörisera fröer innan försäljning till konsumenterna.

Utvärdering av metoden

Resultaten från delstudie 1 visar att den fag/värdstamskombinationen som använts i den här studien har ett högt MOI-värde. Då fagen kunde propageras effektivt tillsammans med värdstammen borde kombinationen ha fungerat bättre. Normalt ligger MOI runt 1. Varför resultaten från delstudie 1 inte stämmer överens med tidigare försök är svårt att förklara. Vid tidigare studier på bakteriofager och groddar (Kocharunchitt et al., 2009) användes ett MOI_{faktiskt}-värde på 70. I den studien föreslås att ett ännu högre värde bör användas. Studier som gjorts på kycklingskinn där bakteriofager och salmonella tillsatts visade att ju högre MOI_{faktiskt}-värde desto bättre reduktion av salmonella (Goode et al., 2003).

Metoden med mikrotiterplatta för att titta på olika koncentrationskombinationer kan vara ett bra alternativ att använda vid en större studie. Om tetrazolium ska användas som indikator är det viktigt att TSB används som bakteriesubstrat. Vid användande av LB som substrat blev det inget färgomslag vid tillsatts av tetrazolium, trots att bakterieförekomst kunde bekräftas genom odling.

Min studie står för ett modellsystem för en större studie vars resultat skulle kunna vara applicerbara på verkliga förhållanden. Vid en eventuell mer omfattande studie måste valet av vilken eller vilka bakteriofager som ska användas göras med större noggrannhet. Som det tidigare nämnts har det gjorts försök där en blandning av olika bakteriofager har använts, som har visats ha bättre effekt än då endast en bakteriofag använts (Ye et al., 2010). Den bakteriofag som från början var tänkt att använda, Felix O1, isolerades för första gången 1943 (Felix and Callow, 1943). Felix O1 har beskrivits som ett bra val för salmonella som värd bakterie (Kuhn et al., 2002). Fördelar med att använda Felix O1 är den är ett dubbelsträngat DNA virus, vilket gör den tåligt i livsmedel, den har ett brett värdspektrum, liten risk för resistensutveckling och den är lytisk.

Tidigare har salmonellakontaminerade groddar gett upphov till fler sjukdomsutbrott än de som varit kontaminerade med *E.coli*. Men i de fall där groddarna har varit kontaminerade med *E.coli* har konsekvenserna varit allvarligare, med ett större antal insjuknade personer och fler dödsfall. För att kunna använda bakteriofager som biokontroll av groddar skulle det krävas en blandning av olika bakteriofager (dvs. som infekterar och lyserar både *Salmonella* och patogena *E.coli*).

SLUTSATS

Både pastörisering och fager gav antagonisterna en kompetitiv fördel gentemot salmonellan i den här studien. Detta ger en indikation om att det finns potential för bakteriofager att användas för att öka livsmedelssäkerheten vid produktion av groddar. För att kunna ge ytterligare rekommendationer och bedöma om det skulle kunna vara applicerbart i produktion krävs en mer omfattande studie, där kvantitativa resultat kan erhållas.

För vidare studier krävs att problem med befintliga bakterier på fröerna övervinns och att en fag-värdstamskombination med ett lägre MOI-värde används. En inledande studie i lösning bör göras mer ingående innan eventuell applicering under groddning. Ytterligare faktorer som bör undersökas är risken för utvecklande av resistens hos bakteriofagen/erna.

Då ingen optimal metod för att reducera mikroorganismer bland groddar finns bör flera olika steg kombineras för att uppnå godtagbar livsmedelssäkerhet, enligt hurdle teknologin. Att

skölja och pastörisera fröer innan groddning rekommenderas både för storskaligproduktion och för groddning hemma. Att som konsument skölja groddarna innan konsumtion reducerar halten bakterier ytterligare och att tillaga groddarna (uppvärmning) ökar livsmedelssäkerheten ännu mer.

För att kunna lösa grundproblemet, d.v.s. att fröer som används till groddning innehåller mycket bakterier när de kommer till groddproducenten, kan det första steget vara att ändra synen på fröer redan vid skörden. Om fröerna redan från början skulle betraktas som blivande livsmedel och hygien vid den initiala hanteringen kan ökas, kanske problemet med tillväxten av patogener under groddning istället kan lösas på så sätt skulle kunna.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Adams, M. H. 1959. *Bacteriophages*, New York, Interscience publishers.
- Adams, M. R. & MOSS, M. O. 2008. *Food microbiology*, Cambridge, UK, RSC Publishing.
- Anonym 2000. Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages - Part 2: Enumeration of somatic coliphages. . *Geneva, International Standardisation Organisation, ISO 10705-2*.
- Bari, M. L., ENOMOTO, K., NEI, D. & KAWAMOTO, S. 2010a. Practical Evaluation of Mung Bean Seed Pasteurization Method in Japan. *Journal of Food Protection*, 73, 752-757.
- Bari, M. L., ENOMOTO, K., NEI, D. & KAWAMOTO, S. 2010b. Scale-Up Seed Decontamination Process to Inactivate Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Enteritidis on Mung Bean Seeds. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 51-56.
- Bigwood, T., HUDSON, J. A. & BILLINGTON, C. 2009. Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages. *FEMS Microbiol Lett*, 291, 59-64.
- Bren, L. 2007. Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA Consum*, 41, 20-2.
- Carlander, A., Aronsson, P., Allestam, G., Stenström, T.-A., Perttu, K 2000. Transport and retention of bacteriophages in two types of willow cropped lysimeters. *Environ Sci Health A35*, 1477-1492.
- EFSA 2009. The use and mode of action of bacteriophages in food production, Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards, *The EFSA Journal (2009)*, 1076, 1-26.
- EFSA 2011a. Scientific opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. *EFSA Journal*, 9(11):2424.
- EFSA 2011b. Shiga toxin-producing E. coli (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock1. *EFSA Journal*, 9(10):2390.
- FDA. 1999 *Guidance for Industry: Reducing Microbial Food Safety Hazards For Sprouted Seeds* [Online]. www.fda.gov/food. [Accessed 2011-10-27].
- Felix, A. & Callow, B. R. 1943. Typing of Paratyphoid B Bacilli by Vi Bacteriophage. *Br Med J*, 2, 127-30.
- Fett, W. F. 2000. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *J Food Prot*, 63, 625-32.
- Fett, W. F. 2002. Reduction of the native microflora on alfalfa sprouts during propagation by addition of antimicrobial compounds to the irrigation water. *Int J Food Microbiol*, 72, 13-8.
- Fordham, J. R., Wells, C. E. & Chen, L. H. 1975. Sprouting of Seeds and Nutrient Composition of Seeds and Sprouts. *Journal of Food Science*, 40, 552-556.
- Goode, D., Allen, V. M. & Barrow, P. A. 2003. Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*, 69, 5032-6.

- Greer, G. G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteriat. *J Food Prot*, 68, 1102-11.
- Hagens, S. & Loessner, M. J. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 513-9.
- Inami, G. B., Lee, S. M., Hogue, R. W. & Brenden, R. A. 2001. Two processing methods for the isolation of Salmonella from naturally contaminated alfalfa seeds. *J Food Prot*, 64, 1240-3.
- Jaquette, C. B., Beauchat, L. R. & Mahon, B. E. 1996. Efficacy of chlorine and heat treatment in killing Salmonella stanley inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. *Appl Environ Microbiol*, 62, 2212-5.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. & Golden, D. A. 2005. *Modern food microbiology*, New York, Springer.
- Kansas state university. 2011. *Sprouts Associated Outbreaks* [Online]. Available: <http://bites.ksu.edu/sprouts-associated-outbreaks> [Accessed 2011-12-15].
- Kasman, L. M., Kasman, A., Westwater, C., Dolan, J., Schmitd, M. G. & Norris, J. S. 2002. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol*, 76, 5557-64.
- Kocharunchitt, C., Ross, T. & McNeil, D. L. 2009. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control Salmonella associated with seed sprouts. *Int J Food Microbiol*, 128, 453-9.
- Kudva, I. T., Jelacic, S., Tarr, P. I., Youderian, P. & Hovde, C. J. 1999. Biocontrol of Escherichia coli O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3767-73.
- Kuhn, J., Suissa, M., Chiswell, D., Azriel, A., Berman, B., Shahar, D., Reznick, S., Sharf, R., Wýse, J., Bar-On, T., Cohen, I., Giles, R., Weiser, I., Lubinsky-Mink S. & Ulitzur, S. 2002. A bacteriophage reagent for Salmonella: molecular studies on Felix 01. *Int J Food Microbiol*, 74, 217-27.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E. & Sulakvelidze, A. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot*, 64, 1116-21.
- Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C. P. & Camp, M. J. 2006. Biocontrol of the food-borne pathogens Listeria monocytogenes and Salmonella enterica serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1135-1140.
- Lindblad M., K. N., Lindqvist R., Hjertqvist M.) 2010. Rapporterade misstänkta Matförgiftningar 2009. In: SMI, S. O. (ed.).
- Lindblad M., W. A., Lindqvist R., Hjertqvist M., Andersson Y. 2009a. Rapporterade misstänkta matförgiftningar 2008. In: SMI, S. O. (ed.).
- Lindblad M., W. A., Lindqvist R., Hjertqvist M., Andersson Y., 2009b. Matförgiftningar i Sverige- analys av rapporteradematförgiftningar 2003-2007. In: Smittskyddsinstitutet, L. O. (ed.).
- Lindmark, H. 2002. Mikrobiologisk riskprofil för frukt och grönsaker. In: Livsmedelsverket, S. (ed.).
- Livsmedelsverket. 2011a. *Livsmedelsverket avråder från att äta råa groddar* [Online]. www.slv.se. [Accessed Nyhetsarkivet, 2011-06-27].

- Livsmedelsverket. 2011b. *Livsmedelsverket tar bort rekommendationen om att inte äta råa groddar* [Online]. www.slv.se. [Accessed Nyhetsrkiivet 2011-07-06].
- Lynch, M. F., Tauxe, R. V. & Hedberg, C. W. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol Infect*, 137, 307-15.
- Mahony, J., O, M. C. A., Ross, R. P. & Van Sinderen, D. 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr Opin Biotechnol*, 22, 157-63.
- Mclaughlin, M. R. 2007. Simple colorimetric microplate test of phage lysis in *Salmonella enterica*. *J Microbiol Methods*, 69, 394-8.
- Montville, R. & Schaffner, D. W. 2004. Analysis of published sprout seed sanitization studies shows treatments are highly variable. *J Food Prot*, 67, 758-65.
- Montville, T. J. & Matthews, K. R. 2005. *Food microbiology : an introduction*, Washington, D.C., ASM Press.
- NACMCF 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *Int J Food Microbiol*, 52, 123-53.
- Pao, S., Randolph, S.P., Westbrook, E.W. and Shen, H. 2004. Use of Bacteriophages to Control *Salmonella* in Experimentally contaminated Sprout Seeds. *J Food Sci*, 69, M127- M130.
- Ponka, A., Andersson, Y., Siitonen, A., De Jong, B., Jahkola, M., Haikala, O., Kuhmonen, A. & Pakkala, P. 1995. *Salmonella* in alfalfa sprouts. *Lancet*, 345, 462-3.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., Fitzpatrick, E. S., Fanning, S. & Hartigan, P. J. 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*, Chichester, West Sussex, UK, Wiley-Blackwell.
- Ross A.I., Griffith M.W., Mittal G.S., Deeth H.C. 2003, Combining non thermal technologies to control foodborne microorganisms, *Int. J Food Microbiol*, 31;89 (2-3): 125-36
- Smittskyddsinstitutet, 2011. *Sjukdomsinformation om Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)* [Online]. www.smi.se. [Accessed 2012-01-17].
- Smittskyddsinsitutet 2012 *Livsmedelsburna infektioner/intoxicationer* [Online] www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/sok-pa-sjukdomskategori/ [Accessed 2012-02-02]
- Sydgrönt.AB 2011. *Groddfakta* [Online]. www.svenskagroddar.se. [Accessed 2011-11-03].
- Taormina, P. J., Beuchat, L. R. & Slutsker, L. 1999. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. *Emerg Infect Dis*, 5, 626-34.
- Thougaard Herluf, Varlund Verner & Rene, M. M. 2007. *Grundläggande mikrobiologi med livsmedelsapplikationer*, Studentlitteratur AB.
- Werner, S., Boman, K., Einemo, I., Erntell, M., De Jong, B., Lindqvist, A., Lofdahl, M., Lofdahl, S., Meeuwisse, A., Ohlen, G., Olsson, M., Stamer, U., Sellstrom, E. & Andersson, Y. 2007. Outbreak of *Salmonella* Stanley in Sweden associated with alfalfa sprouts, July-August 2007. *Euro Surveill*, 12, E071018 2.

- Whichard, J. M., Sriranganathan, N. & Pierson, F. W. 2003. Suppression of Salmonella growth by wild-type and large-plaque variants of bacteriophage Felix O1 in liquid culture and on chicken frankfurters. *J Food Prot*, 66, 220-5.
- Wilkinson, M. H. 2001. Predation in the presence of decoys: an inhibitory factor on pathogen control by bacteriophages or bdellovibrios in dense and diverse ecosystems. *J Theor Biol*, 208, 27-36.
- Ye, J., Kostrzynska, M., Dunfield, K. & Warriner, K. 2010. Control of Salmonella on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages. *J Food Prot*, 73, 9-17.

PM BESÖK GROGÅRDEN 2011-10-06

I oktober 2011 var Jakob Ottoson (min huvudhandledare) och jag på studiebesök på Grogården. Vi fick där en presentation av företaget och hur deras groddproduktion går till, samt rundvandring.

Grogården är belägen ca en mil utanför Örebro och är Sveriges tredje största groddodlare. Företaget har funnits sedan 1984, sedan 2004 ägs och drivs det av Robert Sundström. Grogården producerar ca 50 ton groddar per år, totalt produceras 400 ton groddar i Sverige/år. Alfalfa groddar är den största produkten, men de har även mer specialiserade sorter som böngroddar, purjolöksgroddar, rödbetsgroddar, ärt- och bönmixer och mungbönor. Produktionen är till största delen ekologisk. Groddarna är märkta med Krav och Svenskt sigill. Fröerna köps framför allt från Italien och till viss del från Kina (mungbönor). Innan de levereras testas de för *Salmonella* och *E.coli* O:157.

Den nuvarande lokalen byggdes i samråd med kommunens miljökontor för att man ska kunna hålla en så hög livsmedelssäkerhet som möjligt. Vid produktionen tänker man mycket på flödet i lokalen. Fröen kommer vid leverans in i ett frömottagningsrum. Där betraktas fröerna som orena. Innan groddning pastöriseras alla fröer genom att sänkas ner i 85°C vatten i 30 sekunder. Detta är de svenska producenterna, enligt Robert Sundström, ensamma om att göra i Europa. Han upplever inte att groddbarheten försämras. Det är dock ett mycket arbetsamt steg.

Till själva groddningen används gamla mjölktankar. Dessa fungerar mycket bra att använda då de är lätta att rengöra (runda kanter och rostfritt stål) och de ger en bra miljö för groddarna (mörker och fuktigt). När fröerna placerats i mjölktankarna spolats de med kallvatten ca var fjärde till var sjätte timme, vattnet rinner igenom tanken. Det tar ca 20-30 minuter innan tanken är helt tömd på vatten. Det går åt ca 30 000 liter vatten/dygn för produktionen. Temperaturen i tanken överstiger aldrig 15°C inne i groddningstanken. Groddarna ses till flera gånger per dag och bedöms då framför allt med avseende på lukt och utseende (färg etc) för att kontrollera att de groor normalt. Groddningen tar i den här temperaturen ca 1 vecka, men varierar lite beroende på frö. Jämförs med att man internationellt odlar groddarna under ca tre dygn, men i en temperatur av ca 24°C (NACMCF, 1999).

När groddarna sedan ska skördas sköljs de återigen och för vissa sorter försöker man också skölja bort skalen. Beroende på när sköljningen sker i förhållande till förpackning, torkas groddarna antingen genom självtorkning i kar eller i en centrifug.

Hållbarheten på groddarna är 8 dygn efter förpackning. Företaget levererar framför allt till grossister, en del säljs via Sydgrönt i dagligvaruhandeln.

I somras fick produktionen stänga helt i två veckor i samband med EHEC-utbrottet i Tyskland. Produktionen är nu igång till 60-70% av maxkapacitet, pga av minskad efterfrågan.

Slutsats: Den största risken som identifierats i litteraturen är groddningstemperaturen (NACMFC, 1999) och att det inte finns någon optimal metod att rena frön från patogener (Montville and Schaffner, 2004). Ingen av dessa steg kan utifrån vårt studiebesök bedömas vara någon stor risk i den här typen av produktion. Groddningen som sker industriellt sker i en mörk, fuktig miljö, där vatten tillsätts med jämna mellanrum, men rinner av snabbt för att fröerna inte ska ligga i blöt under en längre tid.

SAMMANFATTNING INTERNATIONELLA GRODDUTBROTT, 1982 -2011

(Kansas state University, 2011, Taormina et al., 1999, EFSA, 2011a)

I Sverige rapporterades från 1988 till 2009 12 livsmedelsutbrott orsakade av groddar. Alla dessa var kontaminerade med olika serotyper av *Salmonella* (Werner et al., 2007, Lindblad M., 2009a, Lindblad M., 2009b, Lindblad M., 2010). Exakta uppgifter om årtal för dessa utbrott saknas, varför de till viss del utelämnats i tabellen.

År	Patogen	Antal fall	Plats	Källa
1982	<i>Yersinia enterocolitica</i>	16	Pennsylvania	Mungbönor sköljvatten
1988	<i>Salmonella Saint-Paul</i> , <i>S. Havana</i> ; <i>S.</i> <i>Muenchen</i>	148	Sverige	Mungbönor
	<i>S. Saint Paul</i>	143	Storbrittanien	Mungböfrön
	<i>S. Virchow</i>	7	Storbrittanien	Mungbönor
1989	<i>S. Gold-Coast</i>	31	Storbrittanien	Krasse, frön och eller groddlare
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	Canada	Alfalfa
1990	<i>S. Anatum</i>	15	Washington	Alfalfa
1992	<i>S. enterica</i>	272	Finland	Alfalfa
1994	<i>S. Bovis mordificans</i>	Ca 500-600	Finland, Sverige	Alfalfafrön
1995	<i>S. Stanley</i>	242	Finland, USA	Alfalfafrön
1995/96	<i>S. Newport</i>	>133	USA, Kanada, Danmark	Alfalfafrön
1996	<i>E. coli</i> O157:H7	>10 000	Japan	Rädisefrön
	<i>S. Montevideo</i> and <i>S.</i> <i>Meleagridis</i>	Ca 500-920	Kalifornien Nevada	Alfalfafrön och/eller groddlare
1996/97	<i>E. coli</i> O157:H7	126	Japan	Rädisefrön, groddlare
1997	<i>S. Anatum</i> & <i>S.</i> <i>Infantis</i>	109	Kansas, Missouri	Alfalfafrön
	<i>E. coli</i> O157:H7	Ca 80-85	4 stater I USA	Alfalfafrön
	<i>E. coli</i> O157:H7	108	Michigan, Virginia	Alfalfafrön
	<i>S. Meleagridis</i>	78	Kanada	Alfalfafrön
1997/98	<i>S. Senftenberg</i>	Ca 50-60	Kalifornien Nevada	Alfalfafrön och/eller groddningstrumma

Bilaga B

Bakteriofager som biokontroll av salmonellakontaminerade groddar

1998	<i>S. Havana</i>	18	2 US States	Alfalfafrön
	<i>S. Cubana</i>	22	5 US States	Alfalfafrön
	<i>E. coli</i> O157:H7	8	Kalifornien, Nevada	Alfalfa, Klöverfrön och/eller groddodlare
1999	<i>S. Mbandaka</i>	75	4 stater I USA	Alfalfafrön
	<i>S. Muenchen</i>	> 157	Flera stater, USA	Alfalfa frön
	<i>S. Saint-Paul</i>	36	Kalifornien, USA	Klöver
	<i>S. paratyphi</i> var <i>Java</i>	51	Kanada	Alfalfafrön
	<i>S. typhimurium</i>	120	Kolorado	Alfalfafrön
	<i>Salmonella</i> spp.	34	USA	Alfalfa
2000	<i>Salmonella</i> spp.	22	Kalifornien, USA	Alfalfa
	<i>S. Enteritidis</i> PT 4b	27	Nederländerna	Mungbönfrön
	<i>S. Enteritidis</i>	75	4 stater I USA	Mungbönor
	<i>Salmonella</i> spp.	8	Kanada	Alfalfa
	<i>Salmonella</i> spp.	84	Kanada	Mungbönfrön
2001	<i>S. Enteritidis</i> PT	913	Kanada, USA	Mungbönfrön
	<i>S. Kottbus</i>	31	4 stater i USA	Alfalfafrön
2002	<i>S. Enteritidis</i>	n/a	Maine	Mungbönor
	<i>S. Abony</i>	13	Finland	Mungbönor
2003	<i>S. Saint-Paul</i>	>9	Oregon, Washington	Alfalfa
	<i>S. Chester</i>	26	USA	Alfalfagroddar
	<i>E. coli</i> O157:H7	7	USA	Alfalfagroddar
	<i>E. coli</i> O157:NM	13	USA	Alfalfagroddar
2004	<i>S. bovis</i> moribificans	35	USA	Alfalfagroddar
	<i>E. coli</i> O157	2	USA	Alfalfagroddar
2005	<i>Salmonella</i> spp	648	Kanada	Munböngroddar
	<i>E. coli</i> O157:H7	1	USA	Munböngroddar
2005/06	<i>S. Oranienburg</i>	126	Australien	Alfalfafrön
2006	<i>S. Braenderup</i>	4	USA	Böngroddar

Bilaga B

Bakteriofager som biokontroll av salmonellakontaminerade groddar

	<i>S. Oranienburg</i>	15	Australien	Alfalfafrön
	<i>S. Bareilly, S Virchow</i>	115	Sverige	Alfalfafrön
2007	<i>S. stanley</i>	44	Sverige	Alfalfagroddar
	<i>S. weltevreden</i>	45	Danmark, Norge och Finland	Alfalfagroddar
2008	<i>S. Typhimurium</i>	24	USA	Alfalfagroddar
2009	<i>S. Cubana</i>	14	Kanada	Lökgroddar och alfalagroddar
	<i>S. Saintpaul</i>	90	USA	Alfalfagroddar
	<i>S. bovismorbificans</i>	42	Finland	Alfalfagroddar
2010	<i>S. bareilly</i>	190	Storbritannien	Böngroddar
	<i>S. Newport</i>	28	USA	Alfalfagroddar
2010/11	<i>Salmonella</i> spp	125	USA	Alfalfagroddar
2011	<i>Salmonella</i> spp	7	Oregon, Washington	Klövergroddar
	<i>E. coli O104:H4</i>	4,321 (50 dödfall, 852 HUS-fall)	Europa	Böngroddar
	<i>S. enteritidis</i>	21	USA	Alfalfagroddar