

Tillväxt av bakterier under avsvalning, förvaring och upptining

Riskvärderingsrapport

av Karin Nyberg och Roland Lindqvist

Innehåll

Förord	3
Sammanfattning	4
Summary.....	5
Inledning	6
Övergripande frågeställning	6
Specifika frågor	6
Metodik	7
Faroidentifiering	9
Farokarakterisering.....	11
Bacillus cereus	11
Clostridium botulinum.....	11
Clostridium perfringens	11
Listeria monocytogenes.....	11
Salmonella spp.....	12
Staphylococcus aureus	12
Yersinia enterocolitica	12
Exponeringsuppskattning	13
Tillväxthastighet	13
Lagtid	13
Initial halt.....	13
Riskkarakterisering	14
Fråga 1. Tillväxt vid olika förvaringstemperaturer	14
Svar 1. Tillväxt vid olika förvaringstemperaturer	14
Fråga 2. Tillväxt under avsvälning	16
Svar 2. Tillväxt under avsvälning	16
Fråga 3. Tillväxt vid upptining av frysta livsmedel.....	21
Svar 3. Tillväxt vid upptining av frysta livsmedel.....	21
Fråga 4. Temperaturökning mellan butik och hem	22
Svar 4. Temperaturökning mellan butik och hem	22
Fråga 5. Tillväxt i färdiglagad mat under avsvälning	26
Svar 5. Tillväxt i färdiglagad mat under avsvälning	26
Referenser	28

Ansvarig handläggare: Karin Nyberg och Roland Lindqvist

Kvalitetsgranskad av: Jakob Ottoson

ISSN 1104-7089

Förord

Livsmedelsverket arbetar för att skydda konsumenternas intressen genom att arbeta för säker mat och bra dricksvatten, att informationen om maten är pålitlig så ingen blir lurad och för att främja bra matvanor.

En av Livsmedelsverkets uppgifter är att ta fram och förvalta olika konsumentråd som rör livsmedel och dricksvatten. Råden baseras på vetenskapliga rön och behöver löpande uppdateras.

Livsmedelsverkets rapport nr 2-2017 om tillväxt av bakterier under avsvälning, förvaring och upptining består av två delar, där del 1 är en riskhanteringsrapport och del 2 är en oberoende riskvärdering eller kunskapsöversikt.

I denna rapport del 2 redovisas riskvärdering som är uppdaterad utifrån aktuellt kunskapsläge i ämnet. Den har tagits fram och sammanställts av Livsmedelsverkets experter inom området mikrobiologi.

Rapporten har tagits fram på beställning av Livsmedelsverkets Rådgivningsavdelning och besvarar både allmänna samt specifika frågeställningar. Den är uppdelad i faroidentifiering, farokarakterisering, exponeringsuppskattning och riskkarakterisering, där de specifika frågeställningarna besvaras. I riskvärderingen ingår inte åtgärdsförslag till hur eventuella risker ska hanteras. Det redovisas i motsvarande riskhanteringsrapport.

Följande personer har arbetat med att ta fram denna rapport: Karin Nyberg, mikrobiolog, Roland Lindqvist, mikrobiolog och Jakob Ottoson, mikrobiolog.

Livsmedelverket september 2017

Sammanfattning

Det är inte ovanligt att bakterier förekommer i livsmedel, men ofta förekommer de inte i sjukdomsframkallande nivåer. Problem uppstår om dessa bakterier får möjlighet att föröka sig i livsmedel, t.ex. när upphettad mat svalnar, fryst mat tinas eller om mat förvaras tillräckligt länge vid felaktig temperatur. Underlaget behandlar hur olika typer av bakterier som kan vara sjukdomsframkallande efter tillväxt i livsmedel potentiellt skulle kunna öka i mängd under avsvälning, förvaring och tining av livsmedel. Dessutom beskrivs faktorer som påverkar bakteriernas tillväxthastighet.

Hur snabbt sjukdomsframkallande bakterier når upp till hälsofarliga nivåer i livsmedel beror på flera faktorer, såsom bakteriernas tillväxthastighet, lagtid och bakteriens ursprungshalt i livsmedlet. Yttre miljöfaktorer som påverkar bakteriell tillväxt i livsmedel är temperatur, pH och tillgängligt vatten. Generellt sett ger låga temperaturer en långsammare tillväxt och längre lagtid. Vid rumstemperatur (20 °C) kan det ta mellan 3 till 5 timmar för de bakterier som ingått i denna värdering att föröka sig med en faktor 10.

Vid nedkylning är vattenbad det sätt som är snabbast och som ger minst tillväxt av bakterier under nedkylningstiden. Upptining är lite mer komplicerat. Vid tining av livsmedel i kylskåp blir temperaturen aldrig högre än kylskåpstemperatur, i vilken de flesta bakterier inte kan tillväxa. Eftersom tiningen dock tar längre tid, så kan i förekommande fall de bakterier som kan växa vid låga temperaturer (såsom *Listeria* och *Yersinia*) möjligtvis växa till. Upptining i rumstemperatur går snabbare men å andra sidan är sannolikheten större att delar av livsmedlet når tillväxttemperaturer. Detta verkar vara ett större problem för produkter av mindre volym. När det gäller förvaring så ökar temperaturen i livsmedel snabbare ju varmare livsmedlet förvaras. Temperaturen i livsmedel sjunker snabbare om det placeras i ett kylskåp med 4 °C jämfört med 8 °C.

Summary

This supporting document focuses on bacteria that may cause sickness when growing in food. It is not unusual for bacteria to occur in foods, but they do not often occur at levels producing illness. Problems occur if these bacteria have the opportunity to grow in food. This may happen either when heated food cools, frozen food is being thawed out, or if food is kept for a sufficiently long time at an incorrect temperature. The document describes how different bacteria may potentially be able to increase in number during cooling, storage or thawing of foodstuffs. What is more, factors are outlined that influence how quickly or slowly potential growth occurs.

How quickly pathogenic bacteria reach levels injurious to health in foods depends on several factors, such as the growth rate of the bacteria, the storage time and the initial level of the bacteria in the food. The external environmental factors that are of importance for bacterial growth in foods are temperature, pH and available water. Generally speaking, low temperatures mean a lower growth rate and longer storage time. At room temperature (20°C), it may take between 3 and 5 hours for bacteria that have been included in this evaluation to reach a growth of 10 times.

In cooling, the quickest way and the way that results in the least growth of the bacteria during the cooling period is to use a water bath. Thawing is a little more complicated. By thawing foodstuffs in the fridge, the temperature never reaches higher than that of the fridge, at which most bacteria cannot grow. It takes a longer time, however, so in those cases that bacteria that can grow at lower temperatures (such as listeria and Yersinia) are present, these may possibly grow. Thawing at room temperature is quicker, but, on the other hand, there is a greater likelihood that parts of the food reach growth temperatures. This seems to be a bigger problem for smaller rather than larger products. As applies to storage, the temperature in foods increases more quickly the warmer the foodstuff is stored. The temperature in foods falls more quickly if it is placed in a fridge at 4°C compared with 8°C.

Inledning

Det är inte ovanligt att bakterier förekommer i livsmedel, och för det mesta innebär det inget problem. Vissa bakterier kan dock orsaka sjukdom om de finns i för höga nivåer eller om de får möjlighet att tillväxa i livsmedlet. Situationer då sjukdomsframkallande bakterier kan börja växa i livsmedel kan vara under tiden som upphettad mat svalnar, fryst mat tinas alternativt om mat förvaras tillräckligt länge vid en felaktig temperatur.

Den här riskvärderingen beskriver tillväxt av ett urval av sjukdomsframkallande bakterier som kan orsaka problem efter tillväxt under nedkylning, förvaring och tining av livsmedel. Dessutom beskrivs faktorer som påverkar hur snabbt eller långsamt en eventuell tillväxt sker.

Övergripande frågeställning

Den övergripande frågeställningen har varit att ta fram ett vetenskapligt underlag till Livsmedelsverket angående mikrobiologisk tillväxt vid nedkylning, förvaring och upptining av livsmedel.

Specifika frågor

1. Hur snabbt tillväxer ett urval av olika livsmedelsburna patogener vid olika förvaringstemperaturer, till exempel 4, 6, 8, 10 15 °C? Redovisa gärna svaret i tabell- eller diagramform.
2. Vad är skillnaden i avsvälning/nedkylningshastigheten för en större volym färdiglagad mat jämfört med om samma mat är uppdelad på flera mindre volymer? Jämför till exempel 2 liter med 4 x 0,5 liter från 60-80 °C ner till 15-20 °C och sen till kyl 4-8 °C genom att placera i 1) kyl, 2) vattenbad, 3) rumstemperatur?
 - a. Hur mycket kan livsmedelsburna patogener tillväxa under de olika volym- och temperaturförhållandena ovan?
3. Hur kan olika sätt att tina olika typer av frysta livsmedel påverka tillväxt av livsmedelsburna patogener? Jämför mellan 1) kylskåp, 2) kallt vattenbad, 3) mikrovågsugn och 4) rumstemperatur för livsmedlen helt och malet kött, fjäderfä, fisk samt bär/grönsaker.
4. Redovisa temperaturökning för kylvaror från butik till det egna kylskåpet och gör en uppskattningen hur den tid-temperatur kombinationen påverkar den mikrobiologiska tillväxten i kylvarorna, det vill säga:
 - a. Ungefär hur mycket kan temperaturen öka i kylvaror en svensk sommardag från det att de plockas ut ifrån kyldiskarna i butiken, packas i kassar och transporteras hem till konsumentens kylskåp?

- b. Hur lång tid tar det för kylvaror som värmts upp under transport mellan butik och hem att gå ner till 4 eller 8 °C efter placering i kylskåp i hemmet?
 - c. Hur mycket snabbare kan livsmedelsburna patogener tillväxa på grund av den temperaturökning som sker mellan butik och hem jämfört med om temperaturen varit konstant 4 eller 8 °C?
5. Hur mycket kan sjukdomsframkallande bakterier optimalt tillväxa i färdiglagad mat under två timmar vid 20-30 grader, det vill säga motsvarande rumstemperatur eller temperaturer under svenska varma sommardagar?

Metodik

Detta vetenskapliga underlag bygger på data från litteraturen, data från prognosmodeller samt egna modelleringar.

För att besvara frågan om tillväxt av olika bakterier vid olika förvaringstemperaturer (fråga 1, 4c och 5) har tillväxtkurvor från databasen ComBase använts. Optimala förhållanden avseende pH (7.0) och vattenaktivitet (0.997) har valts för alla bakterier. Generationstiden, det vill säga tiden för en bakterie att dela på sig en gång, har erhållits från de tillväxtkurvor som genererats från ComBase vid olika temperaturer. Generationstiden har sedan använts för att beräkna tiden i timmar för en tiofaldig ökning, 1 log-enhet, i tillväxt (fråga 1) alternativt hur mycket tillväxt som sker över tid (fråga 4c och 5). I fråga 4c har exponentiell tillväxt antagits, och formel (1) använts

Formel (1): $N = N_0 * 2^n$

(N= antal bakterier, N_0 = antalet bakterier från början, n = tiden/generationstiden).

Lagtider, det vill säga tiden innan bakteriens tillväxt kommit igång, har beräknats utifrån bakteriernas ”fysiologiska status” som angetts som default i ComBase. Den fysiologiska statusen anger hur anpassade bakteriecellerna är till sin miljö, vilket i sin tur påverkar lagtiden. Formel (2) har använts vid beräkningen av lagtidens längd.

Formel (2): $\text{lagtid} = -\log(\text{fysiologisk status})/\text{generationstid}$.

I svaren anges inte enbart medelvärdet för lagtid utan också värdet då den fysiologiska statusen är minus en standardavvikels samt plus en standardavvikelse. På så sätt ges en spridning i lagtid, vilket kan vara till hjälp att förstå hur denna kan variera beroende på hur anpassad för tillväxt de olika bakterierna är.

För att besvara frågor om nedkylning och tining av livsmedel och hur mycket mikroorganismer kan tillväxa under dessa processer (fråga 2) simulerades temperaturen i ärtsoppa under antagande om olika ursprungstemperaturer, volym (storlek på förvaringskärl) och nedkylningsmetod. Den temperaturmodell som användes var från De Jong et al. (2005) och bygger på Newtons lag för nedkylning och tar enbart hänsyn till värmeöverföring genom konvektion. Till skillnad från de Jong et al. (2005) implementerades modellen i programvaran R istället för Excel för att kunna implementera den fullständiga lösningen som bygger på beräkningar i serier. Temperaturen på det varmaste stället i livsmedlet beräknades. Samma

modell användes också för att beräkna tiden för att återgå till kyltemperatur (fråga 4b) med användande av parametervärden för kött. För detaljer om modellen och parametervärden, se appendix A.

Prognosmodeller baserade på ComBase implementerades också i R för att kunna beräkna hur mycket några olika bakterier kan tillväxa under olika nedkylningsförfaranden (appendix B, C). De mikroorganismer som valdes var två sporbildande bakterier; *Clostridium perfringens* och *Bacillus cereus*, en toxinbildande grampositiv bakterie; *Staphylococcus aureus*, och en gramnegativ bakterie; *Escherichia coli*.

Eftersom längden av en lagtid beror på både den nuvarande miljön och vilka betingelser bakterierna kommer från, det senare okänt, beräknades tillväxt med och utan lag-tid. För att beräkna tillväxt antogs en initial halt av 1 bakterie (0 log cfu/ml) och tillväxten beräknades enbart vid de temperaturintervall som modellerna hade utvecklats för.

Faroidentifiering

Matförgiftning med symtom främst från mag-tarmkanalen orsakas av att maten som ätits innehåller sjukdomsframkallande mikroorganismer eller giftiga ämnen (toxiner). Bakterier kan orsaka matförgiftning genom tre principiellt olika processer:

- Infektion, där bakterierna koloniserar tarmen, det vill säga sätter sig fast på tarmväggen och tillväxer, och därefter ger upphov till sjukdom.
- Intoxikation, klassisk matförgiftning, där maten innehåller toxiner som bildats av bakterier vid tillväxt.
- Toxiko-infektion, bakterier i maten bildar toxiner när de når tarmen.

De bakterier som identifierats som fara för tillväxt i livsmedel och som är inkluderade i denna riskvärdering är: två sporbildande bakterier; *Clostridium perfringens* och *Bacillus cereus*, två toxinbildande bakterier; *Clostridium botulinum* och *Staphylococcus aureus*, två bakterier med god förmåga att tillväxa vid låga temperaturer; *Listeria monocytogenes* och *Yersinia enterocolitica*, och den sjukdomsframkallande bakterien *Salmonella* spp. I tabell 1 visas temperatur- och pH-intervall samt minimum vattenaktivitet för tillväxt för dessa bakterier.

Tabell 1. Temperatur- och pH-intervall och minimum vattenaktivitet för tillväxt och toxinbildning av några livsmedelsburna bakterier. Källa (ICMSF, 1996).

Bakterie	pH min-max	pH optimum	Temp min-max (°C)	Temp optimum (°C)	Vattenaktivitet minimum
<i>Bacillus cereus</i>	5.0 – 9.0		4.0 - 55	30 - 40	0.93
<i>Clostridium botulinum</i> ^a					
- Proteolytiska	4.6 - ?	7	12 - ?	35 – 40	0.93
- Icke-proteolytiska	5 - ?	7	< 4 - ?	28 - 30	0.97
<i>Clostridium perfringens</i>	5.5 – 9.0	7.2	12 – 50	43 – 47	0.93
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.4 - 9.4	7.0	-0.4 – 45	37	0.92
<i>Salmonella</i>	3.8 - 9.5	7.0 – 7.5	7.0 - 46	35-43	0.94
<i>Stafylococcus aureus</i>					
- Tillväxt	4.0 – 10	6.0 – 7.0	7.0 – 48	37	0.83
- Toxinbildning	4.5 – 9.6	7.0 – 8.0	10 – 48	40 – 45	0.87
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.2 – 10	7.2	-1.3 – 42	25 – 37	5% NaCl

^a Gäller anaerob tillväxt

I de flesta livsmedel är näringstillgången för sjukdomsframkallande mikroorganismer god, vilket medför att antalet bakterier snabbt kan tillväxa (öka i antal) om övriga förhållanden

tillåter (FDA, 2012). Det finns flera faktorer som kan hämma alternativt främja tillväxt av mikroorganismer i livsmedel. Temperaturen är den enskilt viktigaste faktorn för tillväxt, men livsmedlets pH och tillgängligheten av vatten (vattenaktivitet) är också av stor betydelse (Madigan et al., 2003). Därför är det dessa faktorer som används i många prognosmodeller för mikrobiell tillväxt.

Farokarakterisering

Bacillus cereus

Bacillus cereus orsakar två typer av matförgiftning, varav en variant ger diarré och en variant ger kräkning orsakad av toxin som bakterien bildar i livsmedlet. Symtomen av diarré-varianten liknar de som orsakas av *Clostridium perfringens*, med kraftiga magsmärtor, gasbildning och vattnig diarré som uppkommer efter 8-16 timmar och oftast går över efter 24 timmar. De symtom som uppkommer vid förgiftning med kräktoxin är mycket likt de som orsakas av stafylokockenterotoxin, d.v.s. magkramp och kräkning. Dessa symtom uppkommer efter 1-5 timmar och går över inom 24 timmar. För båda varianter av *Bacillus cereus* matförgiftning krävs mellan 10^5 - 10^8 *Bacillus cereus* per gram livsmedel för att orsaka sjukdom (FDA, 2012).

Clostridium botulinum

Clostridium botulinum orsakar botulism som är en allvarlig nervsjukdom som orsakas av neurotoxin som bakterien producerar då den tillväxer. Symtomen på botulism är först illamående och kräkningar följt av synrubbingar, muskelsvaghet och andningssvårigheter. Om den drabbade inte får vård kan tillståndet vara dödligt då andningsmuskulaturen till slut förlamas. Det räcker med en mycket låg dos, endast några nanogram, av giftet för att orsaka botulism (ICMSF, 1996). Det tar vanligtvis mellan 18-36 timmar efter konsumtion innan symtom uppkommer.

Clostridium perfringens

Det krävs vanligtvis minst 10^6 *Clostridium perfringens* per gram livsmedel för att orsaka matförgiftning, även om känsliga individer kan drabbas även efter konsumtion av en mindre mängd bakterier (FDA, 2012; Gibbs, 2009). Inkubationstiden är vanligtvis mellan 12-18 timmar. Symtom uppkommer 8-22 timmar efter konsumtion av kontaminerade livsmedel och består av kraftiga magsmärtor, gasbildning och kraftig diarré. Tillfrisknande sker efter cirka 24 timmar.

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes orsakar två typer av sjukdom, dels en icke-invasiv variant som vanligtvis inte orsakar några större problem hos annars friska individer, dels en invasiv variant som kan orsaka blodförgiftning och hjärnhinneinflammation (FDA, 2012). *Listeria monocytogenes* har en hög mortalitet, då den ofta drabbar äldre och immunsvaga individer. Infektion med *Listeria monocytogenes* kan också orsaka missfall om den drabbade är gravid. För mer information, se separat riskvärdering om Listeria.

Salmonella spp.

Infektion av *Salmonella* spp. orsakar illamående, magkramper och kräkningar som vanligtvis uppkommer mellan 12 till 36 timmar efter konsumtion av kontaminerat livsmedel (ICMSF, 1996). Ofta anges att en dos på $>10^5$ bakterier orsakar infektion, men mycket lägre infektionsdos har också rapporterats, beroende på såväl serotyp av *Salmonella* spp. samt hälsotillståndet hos konsumenten (FDA, 2012). Om inga komplikationer infaller så är sjukdomsförloppet över efter 4 till 7 dagar.

Staphylococcus aureus

För att bli förgiftad krävs att maten som konsumeras innehåller mellan 20-100 nanogram stafylokockenterotoxin (Asao et al., 2003), och för att den mängden enterotoxin ska bildas uppskattas att det behövs minst 10^5 - 10^6 *S. aureus* per gram livsmedel (Adams, 2009). För känsliga individer krävs lägre halt av toxin för att orsaka sjukdom (FDA, 2012). Inkubationstiden, det vill säga tiden mellan konsumtion och insjuknande är kort (oftast 2-4 timmar) varvid symtom som magkramper och kräkningar uppträder. Sjukdomsförloppet är snabbt övergående, med fullt tillfrisknande efter cirka 24-48 timmar.

Yersinia enterocolitica

Infektion med *Yersinia enterocolitica* orsakar magkramper, feber och diarré som utvecklas efter 1 till 11 dagar efter konsumtion. Infektionen är självläkande och går över efter 5 till 14 dagar. I vissa fall kan följsjukdomar uppkomma, såsom olika autoimmuna komplikationer eller inflammatorisk reumatism (ICMSF, 1996). Den infektiösa dosen uppskattas till mellan 10^4 till 10^6 bakterier, men kan variera beroende på olika faktorer.

Exponeringsuppskattning

Hur snabbt sjukdomsframkallande bakterier når upp till hälsofarliga nivåer beror på faktorer som bakteriernas tillväxthastighet, lagtidens längd och den initiala halt av bakterien som livsmedlet innehåller.

Tillväxthastighet

Bakteriers tillväxthastighet påverkas av en rad yttre miljöfaktorer av vilka temperatur, pH och vattenaktivitet är de med störst betydelse (Madigan et al., 2003). Vid låga temperaturer sker kemiska och enzymatiska processer långsamt i bakterier, vilket ger en långsam tillväxthastighet. När temperaturen ökar sker också en ökning av bakteriens metaboliska processer vilket ökar tillväxten upp till den punkt där temperaturen är så pass hög att proteiner skadas varvid bakteriernas cellfunktion sjunker till noll (Madigan et al., 2003). Vattenaktiviteten är av betydelse eftersom allt liv är beroende av tillgång på vatten. Genom att tillsätta salt eller socker till ett livsmedel sänks det tillgängliga vattnet i livsmedlet, vilket gör det svårare för bakterier att tillväxa (Madigan et al., 2003).

Lagtid

Lagtiden är den tid det tar innan bakterier anpassat sig till förändringar i miljön och börjar växa (Swinnen et al., 2004). En bakteries lagtid varierar beroende på miljön bakterien befinner sig i, och ökar oftast med sjunkande temperatur, minskad vattenaktivitet och vid ogynnsamt pH (Tamplin, 2008). Temperatur är den faktor som studerats mest, och ju större temperaturskillnad bakterien utsätts för (inom sitt tillväxtintervall) desto större påverkan har det på lagtiden (Mellefont and Ross, 2003). Lagtiden påverkas också av bakteriens historia, dvs. vilken miljö den befunnit sig i tidigare, och av om bakterien befinner sig i sporform eller i växande form (Dufrenne et al., 1997; Tamplin, 2008). Det finns också rapporterat att lagtiden hos bakterier påverkas av antalet bakterier som är närvarande, och att den framförallt är längre och mer varierad vid låg initialhalt av bakterien (Augustin et al., 2000; Gay et al., 1996).

Initial halt

Den initiala halten av sjukdomsframkallande bakterier i livsmedlet är det antal bakterier som finns från början och som sedan kan börja föröka sig. Det finns studier som visat att tillväxten av bakterier ökar vid högre initial halt (Cogan et al., 2001). Studier på *Listeria* har också visat att tillväxten i närvaro av stressfaktorer, såsom pH, temperatur och vattenaktivitet, ökar vid en högre initial halt (Koutsoumanis and Sofos, 2005). Tänkbara förklaringar kan vara dels att sannolikheten är högre att det finns bakterier som tål stressfaktorn när den initiala halten är hög eller att tillväxten påverkas av cell-till-cell kommunikation (quorum sensing) och att koncentrationen av signalmolekyler är högre vid hög initial halt (Koutsoumanis and Sofos, 2005).

Riskkaraktärisering

Fråga 1. Tillväxt vid olika förvaringstemperaturer

Hur snabbt tillväxer ett urval av olika livsmedelsburna patogener vid olika förvaringstemperaturer, till exempel 4, 6, 8, 10 och 15 °C?

Svar 1. Tillväxt vid olika förvaringstemperaturer

I tabell 2 ges tiden för tillväxt av ett urval av livsmedelsburna patogener vid olika förvaringstemperaturer. Dessa tider har tagits fram via verktyget ComBase, som baseras på försök i buljong, och optimala förhållanden avseende pH (7.0) och vattenaktivitet (0.997) har valts. Dessa tider bör ses som ett worst-case, eftersom enskilda livsmedel kan ha egenskaper som hämmar tillväxt av patogener.

Tabell 2. Beräknad tid i timmar för 1 log-enhets tillväxt (exklusive lagtid) för några livsmedelsburna patogener vid fem olika förvaringstemperaturer. Baserad på data från ComBase.

	4 °C	6 °C	8 °C	10 °C	15 °C
<i>Bacillus cereus</i>	*	35	25	15	7
<i>Clostridium botulinum</i> ^a	75	40	20	10	5
<i>Clostridium perfringens</i>	*	*	*	*	21
<i>Listeria monocytogenes</i>	60	40	30	20	10
<i>Salmonella</i> spp.	*	*	45	30	10
<i>Stafylococcus aureus</i>	*	*	80	50	15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	25	20	15	10	5

^a Icke-proteolytiska

* Tillväxttiden har inte kunnat beräknas eftersom ComBase saknar data för dessa bakterier/temperaturer, antingen eftersom temperaturen ligger under bakteriens tillväxt-minimum eller att försök inte har gjorts vid dessa temperaturer.

I tabell 3 visas de lagtider som kan förekomma för samma bakterier under samma förhållanden. Lagtiderna är beräknade utifrån tillväxtkurvorna från ComBase och visas som ett medelvärde samt värdet vid plus eller minus en standardavvikelse. Förekomst av lagtid och dess eventuella längd har en stor påverkan på den totala tillväxttiden, främst i de lägre temperaturerna, vilket ger en stor osäkerhet vad gäller möjlig tillväxt.

Tabell 3. Lagtidens längd i timmar, beräknad medelvärde plus minus en standard-avvikelse, för några livsmedelsburna patogener vid fem olika förvaringstemperaturer. Baserat på data från ComBase.

		4 °C	6 °C	8 °C	10 °C	15 °C
<i>Bacillus cereus</i>	medel	*	123	85	59	24
	- 1 stdav	*	58	40	28	12
	+ 1 stav	*	260	180	124	52
<i>Clostridium botulinum</i> ^a	medel	334	161	85	48	15
	- 1 stdav	206	99	53	30	10
	+ 1 stav	539	260	137	78	25
<i>Clostridium perfringens</i>	medel	*	*	*	*	63
	- 1 stdav	*	*	*	*	34
	+ 1 stav	*	*	*	*	115
<i>Listeria monocytogenes</i>	medel	99	67	45	31	14
	- 1 stdav	43	29	20	13	6
	+ 1 stav	230	156	105	72	33
<i>Salmonella</i> spp.	medel	*	*	65	40	13
	- 1 stdav	*	*	37	22	7
	+ 1 stav	*	*	115	70	23
<i>Stafylococcus aureus</i>	medel	*	*	157	90	27
	- 1 stdav	*	*	89	51	15
	+ 1 stav	*	*	280	160	48
<i>Yersinia enterocolitica</i>	medel	26	20	15	12	7
	- 1 stdav	12	9	7	5	3
	+ 1 stav	56	42	32	25	14

^a Icke-proteolytiska

Det finns också resultat från tillväxtförsök i livsmedel. Som ett exempel visas i tabell 4 angiven tillväxt av *Listeria monocytogenes* i olika livsmedel inkuberade i olika temperaturer. Finns intresse för andra bakterier kan detta enkelt tas fram. När det gäller *Listeria monocytogenes* kan man se att de tillväxttider som anges i tabell 4, och som är från försök i livsmedel, generellt sett är längre än de tider som anges i tabell 2, där värden från försök i buljong anges. Detta förklaras av att försöken i odlingsbuljong är valda vid optimala tillväxtförhållanden för bakterierna, och förhållandena i faktiska livsmedel är inte optimala för tillväxt.

Tabell 4. Beräknad tid i timmar (med lagtiden inom parentes, där denna angivits) för 1 log-enhets tillväxt av *Listeria monocytogenes* i olika livsmedel vid olika förvaringstemperaturer.

Temp (°C)	Hönsbuljong ^a	Hönsbuljong ^b	Kräftstjört ^c	Skinka ^d	Referens
0			240 ^e		(Dorsa et al., 1993)
2.5	100 (192)	149 (84)			(Walker et al., 1990)
5	83 (72)	63 (36)			(Walker et al., 1990)
5				166 (138)	(Luo et al., 2015)
6			56 ^e		(Dorsa et al., 1993)
7.5	43 (48)	30 (24)			(Walker et al., 1990)
9.3	17 (24)	23 (24)			(Walker et al., 1990)
10				123 (59)	(Luo et al., 2015)
12			23 ^e		(Dorsa et al., 1993)
15				56 (19)	(Luo et al., 2015)

^aFörinkubering 30°C i 48h

^bFörinkubering 4°C i 6d

^cFörinkubering 27°C i 12h

^dRå skinka som inte förinkuberats

^eLagtiden har inte rapporterats

Fråga 2. Tillväxt under avsvälning

Vad är skillnaden i avsvälning/nedkylningshastigheten för en större volym färdiglagad mat jämfört med om samma mat är uppdelad på flera mindre volymer? Jämför till exempel 2 liter med 4 x 0,5 liter från 60-80 °C ner till 15-20 °C och sen till kyl 4-8 °C genom att placera i 1) kyl, 2) vattenbad, 3) rumstemperatur? Hur mycket kan livsmedels-burna patogener tillväxa under dessa volym- och temperatur-förhållanden?

Svar 2. Tillväxt under avsvälning

Undersökta scenarion: Vi antar att en ärtsoppa har tillagats och sedan kylts ner i ett runt kärl av olika storlek; 4 (radien=10 cm, djupet= 12.7 cm), 2 (9 cm, 7.9 cm) eller 0.5 (5 cm, 6.4 cm) liter. I de översta diagrammen i figur 1-3 visas temperaturen över tid i den varmaste punkten, beroende på om soppan kylts i kylrum (figur 1), i rumstemperatur (20 °C) och sedan när temperaturen är 25 °C flyttas till kylskåp (7 °C) (figur 2), eller i vattenbad med is som håller en temperatur av 7 °C (figur 3).

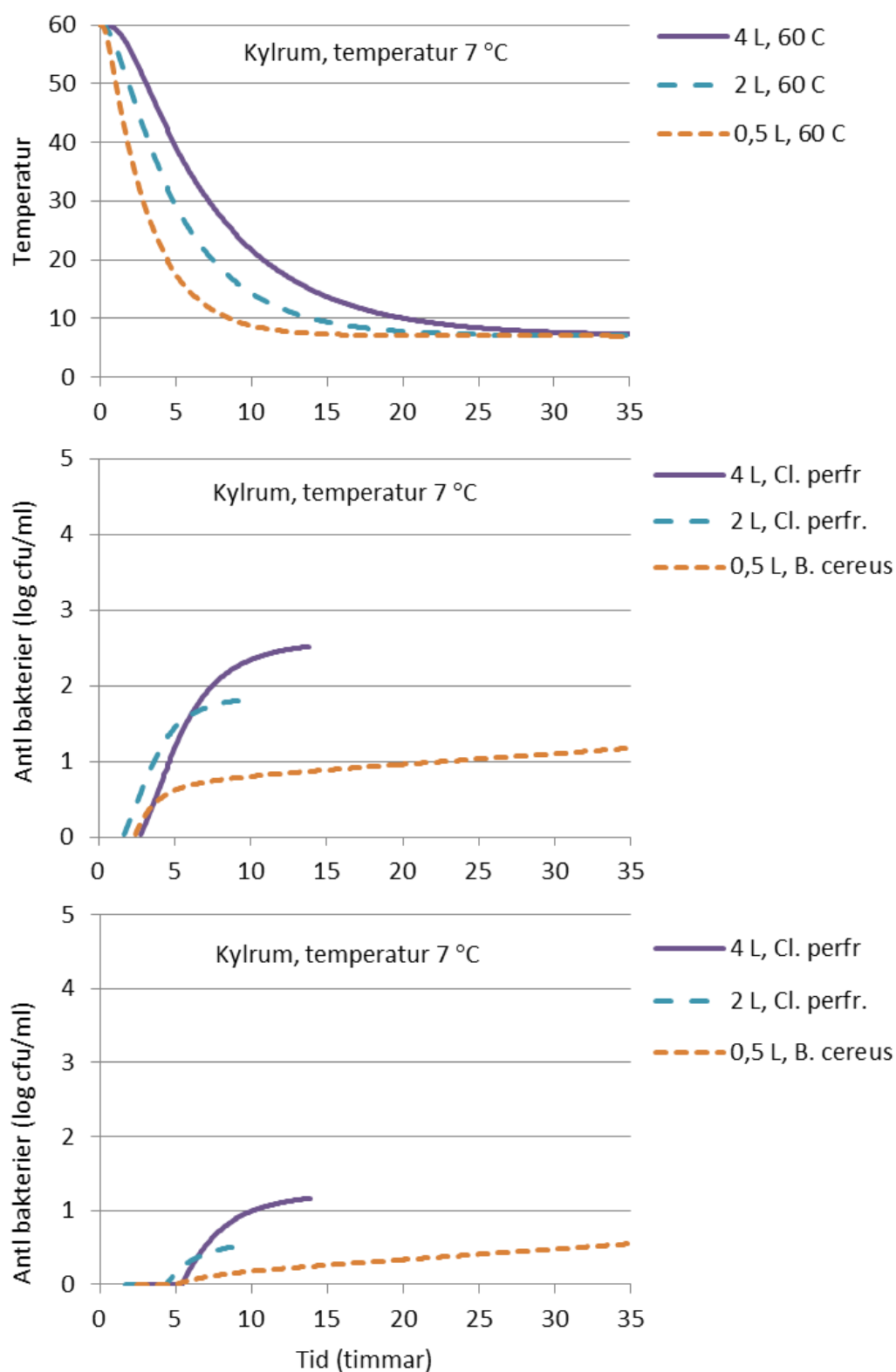
I de övre diagrammen i figur 1-3 syns att det snabbaste sättet att kyla ned ärtsoppan är i vattenbad medan kylning i rumstemperatur för att sedan flytta till kylskåp är det långsammaste. Kylning av 4 liter ärtsoppa ned till under 10 °C tar över 30 timmar vid kombinerad kylning rumstemperatur och kylskåp. I jämförelse så kyls 4 L soppa ned till den temperaturen på mindre än 8 timmar i ett vattenbad. Tiden att kyla direkt i ett kylskåp ligger mellan dessa två sätt men är inte lämpligt för stora volymer och konsumentkylskåp. Om soppan istället kyls i en 0.5 liters volym kommer temperaturen vid alla betingelser ner under 10 °C inom cirka 11 timmar.

Resultaten bygger på antaganden och teoretiska modeller så temperaturkurvorna visar principer men kan skilja sig från en faktisk process vilken också påverkas mycket av de praktiska förhållanden då nedkylningen sker. En begränsning i exemplet är att kärlet och soppan antas ha samma egenskaper vad gäller värmeöverföring. Ska specifika tid och temperaturkombinationer utvärderas för rekommendationer ur ett riskperspektiv behöver en grundligare utvärdering ske och valideras med praktiska försök.

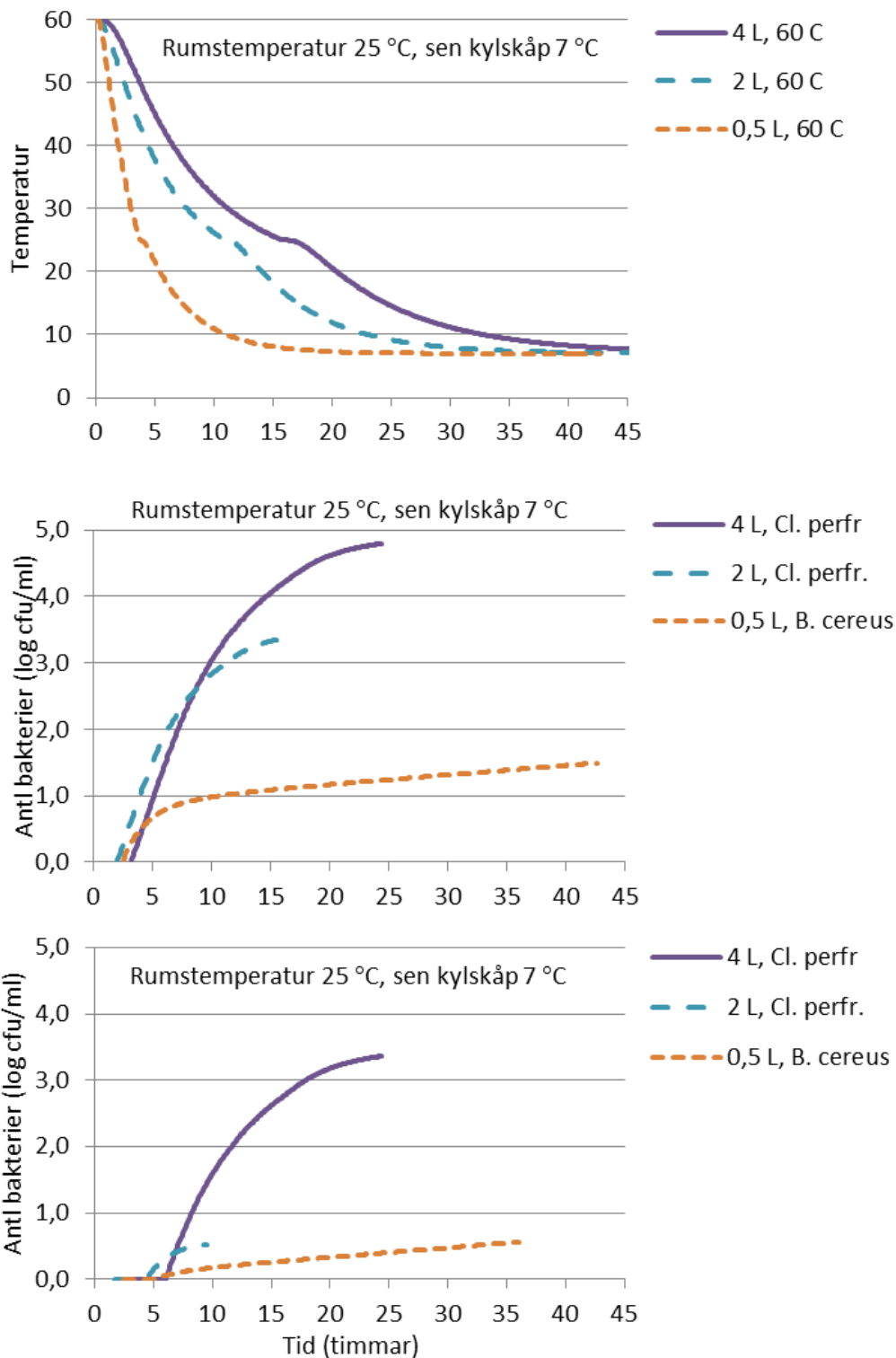
För alla tid och temperaturkurvor beräknade i fråga a var det någon av de sporbildande bakterierna *Clostridium perfringens* eller *Bacillus cereus* som växte mest. I de mellersta och nedre diagrammen i figur 1-3 visas den beräknade tillväxten för temperaturkurvor som visas i de översta diagrammen. I mittendiagrammen visas worst-case scenarion om lagtiden skulle vara noll, d v s bakterierna börja tillväxa så fort temperaturen är inom tillväxtintervallet, och i nedre diagrammen samma tillväxt med en lagtid.

Anledningen till att tillväxtkurvorna börjar och slutat vid olika tidpunkter är att de är utvecklade baserade på data som bara täcker ett visst temperaturintervall och extrapolering av modellen utanför dessa temperaturer har inte gjorts. Den största tillväxten, nästan 5 logenheter utan lag-tid innan tillväxt (3.3 logenheter med lag-tid) inträffade i en 4-litersvolym som kylts i rumstemperatur och sedan i kylskåp. Om samma volym kylts i ett vattenbad var tillväxten omkring 0.5 logenhet (0.05 logenheter med lag-tid). Om en 0.5 litervolym kyls i rumstemperatur och sedan kylskåp är den beräknade tillväxten 1.5 logenheter (0.6 logenheter med lag-tid).

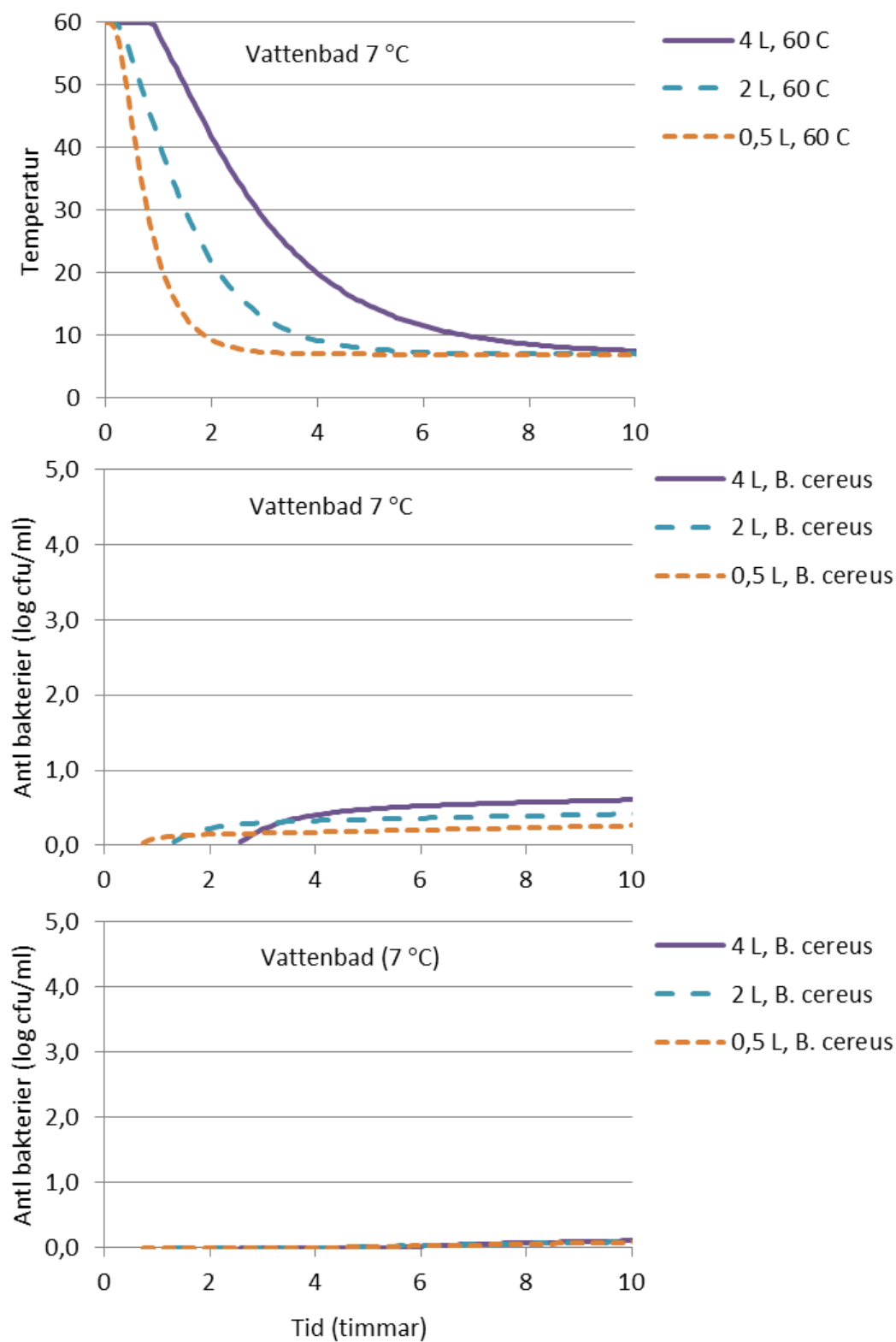
Sammanfattningsvis visas i dessa exempel att genom att enbart kyla ned livsmedel i små volymer och/eller använda kallt vattenbad istället för att förvara livsmedlet i rumstemperatur kan tillväxten av bakterier minskas med flera logenheter. En logenhet motsvarar en faktor tio, vilket om bakterierna är sjukdomsframkallande leder till en mindre risk eller om de är livsmedelsförsämmande kan ge en bättre hållbarhet hos livsmedlet.



Figur 1. Diagram över kylning i kylrum. Beräknade temperaturer (övre diagram) i ärtsoppa vid kylning av olika volymer, samt bakterietillväxt utan lagtid (mittendiagram) och bakterietillväxt med lagtid (nedre diagram).



Figur 2. Diagram över kylning i rumstemperatur följt av kylskåp. Beräknade temperaturer (övre diagram) i ärtsoppa vid kylning av olika volymer, samt bakterietillväxt utan lagtid (mitten diagram) och bakterietillväxt med lagtid (nedre diagram).



Figur 3. Diagram över kylning i vattenbad. Beräknade temperaturer (övre diagram) i ärtsoppa vid kylning av olika volymer, samt bakterietillväxt utan lagtid (mittendiagram) och bakterietillväxt med lagtid (nedre diagram).

Fråga 3. Tillväxt vid upptining av frysta livsmedel

Hur kan olika sätt att tina olika typer av frysta livsmedel påverka tillväxt av livsmedelsburna patogener? Jämför mellan 1) kylskåp, 2) kallt vattenbad, 3) mikrovågsugn och 4) rumstemperatur för livsmedlen helt och malet kött, fjäderfä, fisk samt bär/grönsaker.

Svar 3. Tillväxt vid upptining av frysta livsmedel

Bakterier finns på ytan av helt kött och andra livsmedel, men kan också finnas inne i livsmedel som malet kött eller sammansatta livsmedel beroende på tillverkningsprocessen. Det som påverkar hur mycket tillväxt som kan ske är om någon del av livsmedlet där det finns bakterier når en tillväxttemperatur innan livsmedlet har tinat, samt hur länge detta sker. En annan viktig faktor är lagtidens längd hos bakterierna vilken alltid är svår att uppskatta och behöver undersökas genom experiment.

Tinas livsmedlen i kylskåp eller kallt (kylskåpstemperatur) vatten så blir temperaturen aldrig högre än kylskåpstemperatur men å andra sidan kan upptiningen ta längre tid vilket kan ge längre tid för tillväxt av psykrotrofa förskämningsbakterier och patogener som till exempel *Listeria monocytogenes* och *Yersinia enterocolitica*, medan de flesta andra patogeners tillväxt är förhindrad eller mycket långsam. Upptining i rumstemperatur går snabbare men å andra sidan är sannolikheten större att delar av livsmedlet når tillväxttemperaturer. Detta verkar vara ett större problem för storleksmässigt mindre än större produkter. Det beror på att uppvärmningen från omgivningen sker genom en förhållandevis mindre yta i relation till hela volymen av fryst produkt varför yttemperaturen inte stiger lika mycket som i en storleksmässigt mindre produkt. För hel fryst kyckling visade Jimenez et al (2000) att upptining i rumstemperatur till en temperatur av 4 °C (inre temperatur vid bröstbenet) inom 14 timmar var en säker rutin vilket också upptining i kylskåp var. Upptiningen i kylskåp tog längre tid och under den tiden hade förskämningsbakterier, *Pseudomonas*, börjat växa. Däremot hade halten av *Salmonella hadar* minskat under upptining både i rumstemperatur och i kylskåp. Ingham et al. (2005) gjorde upptiningsförsök med fryst hel kyckling (1670 g), och två olika mängder av köttfärs (453 g eller 1359 g) som ympats på ytan eller i mitten med *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 eller *S. aureus* vid 22 eller 30 °C i 9 timmar. Deras slutsats var att upptining av hel kyckling ≥ 1670 g vid ≤ 30 °C, ≤ 9 timmar, och köttfärs ≥ 453 g vid ≤ 22 °C ≤ 9 timmar inte var särskilt riskabla beteenden. Dessa resultat speglar inverkan av förpackningens storlek, och upptining av mindre portioner och/eller längre tider avråddes från.

Vid upptining i mikrovågsugn finns också möjlighet för tillväxttemperaturer eftersom värmefördelningen kan vara variabel men å andra sidan går tiningsprocessen oftast väldigt snabbt och temperaturer i ytan kan nå för bakterier letala nivåer. I försök med upptining av frysta hamburgare som inokulerats med *E. coli* O157:H7 minskade halten vid upptining vid 4 °C i 12 timmar, 23 °C i 3 timmar och i mikrovågsugn (700 W i 120 s), men effekten var beroende på vilken *E. coli*-stam som undersöktes och vilken mikrobiologisk metod som användes för kvantifiering vilket antyder att en del bakterier endast skadats vid frysning och upptining (Sage and Ingham, 1998). Författarna betonade att upptining längre tid än 3 timmar i rumstemperatur kunde leda till tillväxt av *E. coli* O157:H7.

Andra variabler kan påverka risken och varierar beroende på vilket livsmedel det gäller. Rått kött innehåller oftare patogener är vegetabilier och frukt men hettas å andra sidan oftare upp

innan konsumtion. Tillväxten är generellt lägre i vegetabilier och frukt än i kött men frysning och tining kan slå sönder växt- och djurceller vilket kan göra näringen mer åtkomlig och att tillväxthämmande mekanismer fungerar sämre (ASHRAE, 2006).

Sammanfattningsvis kan andra upptiningsrutiner än i kylskåp vara säkra, men det beror på livsmedlets egenskaper, storleken och formen på förpackningen, de faktiska temperaturer och tider som upptiningen sker, samt hur lång tid och under vilka betingelser som livsmedlet förvaras mellan upptining och tillagning/konsumtion.

Fråga 4. Temperaturökning mellan butik och hem

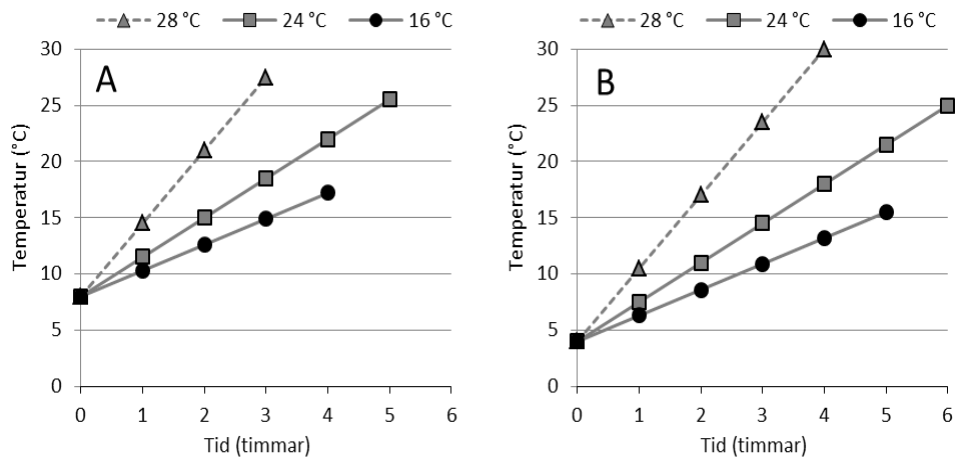
Redovisa temperaturökning för kylvaror från butik till det egna kylskåpet och gör en uppskattningen hur den tid-temperatur kombinationen påverkar den mikrobiologiska tillväxten i kylvarorna, det vill säga:

1. Ungefär hur mycket kan temperaturen öka i kylvaror en svensk sommardag från det att de plockas ut ifrån kyldiskarna i butiken, packas i kassar och transporteras hem till konsumentens kylskåp?
2. Hur lång tid tar det för kylvaror som värmts upp under transport mellan butik och hem att gå ner till 4 eller 8 °C efter placering i kylskåp i hemmet?
3. Hur mycket snabbare kan livsmedelsburna patogener tillväxa på grund av den temperaturökning som sker mellan butik och hem jämfört med om temperaturen varit konstant 4 eller 8 °C?

Svar 4. Temperaturökning mellan butik och hem

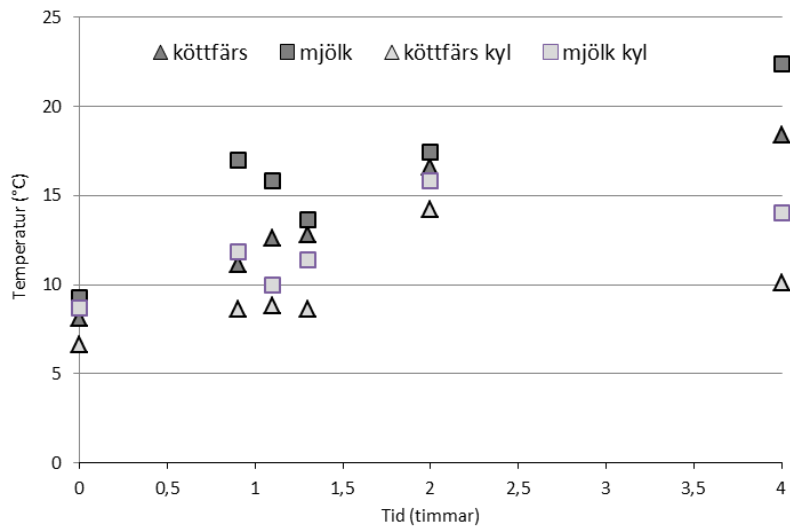
- a. För att besvara frågan om hur mycket temperaturen kan öka i kylvaror mellan kyldisken i butik till de når konsumentens kylskåp används tidigare opublicerade resultat från Livsmedelsverket (Anonym, 2003). Denna studie syftade bl.a. till att undersöka hur mycket livsmedel ökade i temperatur under transport från butik till hemmet. Temperaturen loggades kontinuerligt i kylvaror såsom köttfärs, mjölk och strömming. Försöket utfördes på olika dagar med höga yttre temperaturer (28 och 24 °C). Temperaturen mättes i mitten av varorna, från butiken och under transport i matkassar under 1 till 6 timmar. Samma typ av varor placerades också i en kylväska tillsammans med en kylklamp (~ 16 °C), och temperaturen följdes på liknande vis.

Figur 4a och b visar en möjlig temperaturökning i livsmedel utifrån data från ovan nämnda försök. I figur 4a startar mätningen på 8°C och i figur 4b startar mätningen på 4°C. När utetemperaturen var 28 °C ökade temperaturen i livsmedlen i snitt ca 6.5 °C per timme. När utetemperaturen var 24 °C ökade temperaturen i livsmedlen i snitt ca 3.5 grader per timme. När temperaturen var 16 °C ökade temperaturen i snitt ca 2.3 grader per timme. Spridningen i temperaturökning per timme (min-max) var dock stor (5.0 - 7.6 °C vid 28 °C, 2.2 - 4.5 °C vid 24 °C och 1.2 - 3.4 C vid 16 °C).



Figur 4. Uppskattad temperaturökning i livsmedel över tid vid tre olika lufttemperaturer, efter antagande om genomsnittliga linjära temperaturökningar baserade på försöksdata; 28 °C (6.5 °C/timme), 24 °C (3.5 °C/timme) samt 16 °C (2.3 °C/timme). Figur A visar temperaturökningen vid en starttemperatur på 8 °C hos livsmedlet och B visar temperaturökningen vid en starttemperatur på 4 °C.

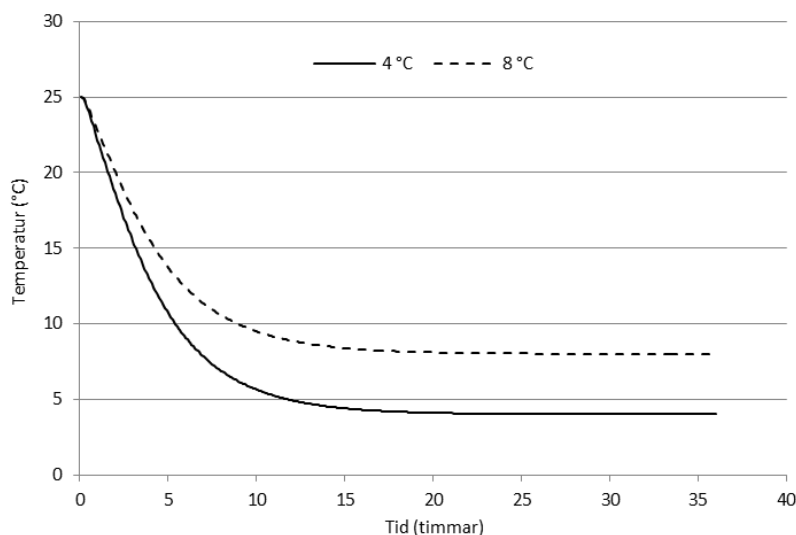
Sammanfattningsvis visar figur 4 att temperaturen i livsmedel ökar snabbare ju varmare yttertemperaturen är. Hur stor påverkan denna temperaturökning har på livsmedlets högsta temperatur avgörs således av såväl temperaturen från början som hur länge livsmedlet transporteras.



Figur 5. Försöksdata som visar uppmätt temperatur i två olika livsmedel (köttfärs och mjölk) vid kassan i butik (tid = 0) samt efter olika tid i en vanlig matkasse alternativt i en kylväska.

Figur 5 visar start- och sluttemperatur för två olika livsmedel (köttfärs och mjölk) som antingen transporterats i en vanlig kasse eller i en kylväska med kylklamp. Här kan man se att temperaturen efter 4 timmar har ökat för båda livsmedel och transportsätt, men att ökningen är långsammare i kylväska. Detta beror antagligen på att yttertemperaturen skiljer sig åt, då det är svalare i kylväskan. Temperaturen i kylväskan låg på cirka 16 °C.

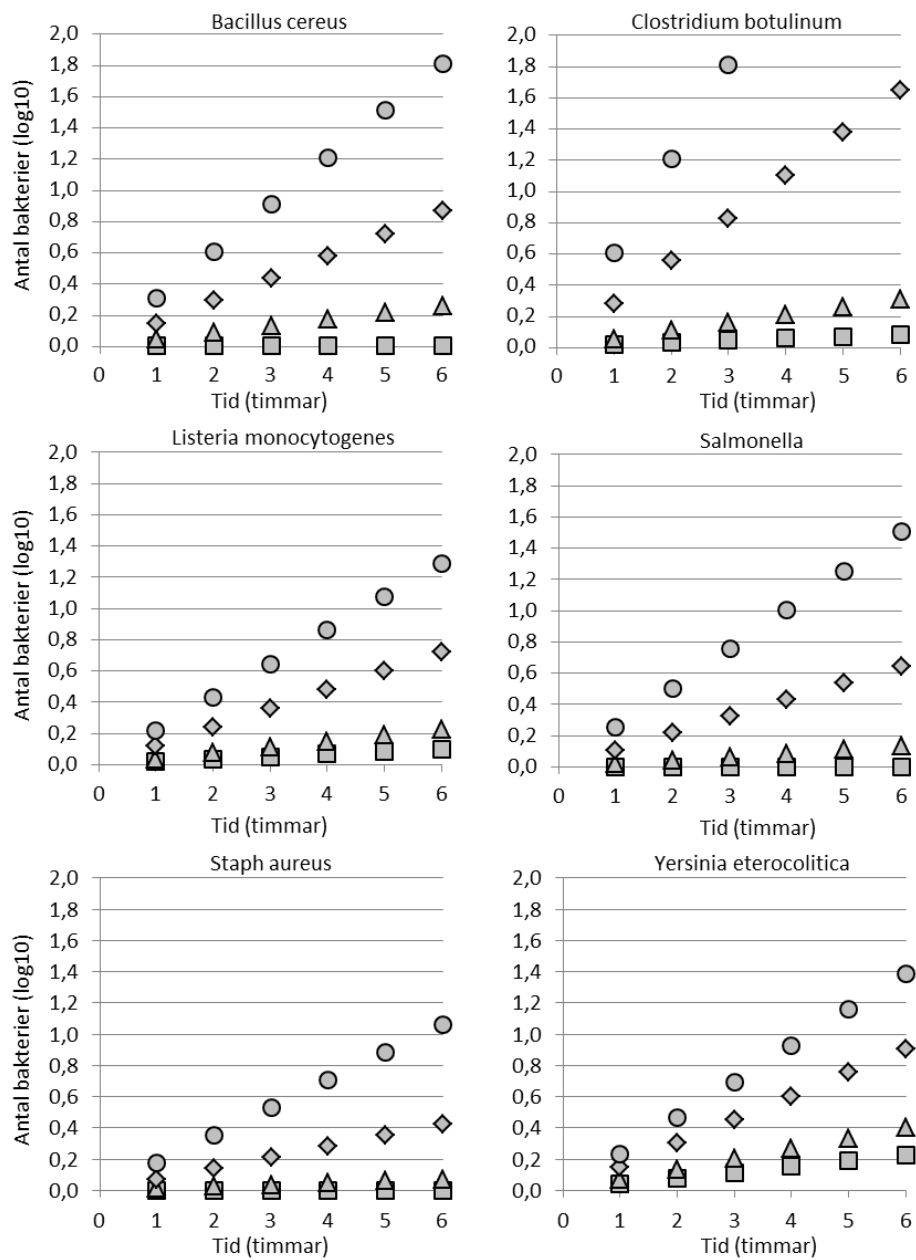
- b. För att besvara frågan om hur lång tid det tar för kylvaror som värmts upp under transport att åter igen kylas ner används som exempel tiden för en 800 g malet kött att kylas ned till 4 eller 8 °C efter att ha haft en temperatur av 25 °C vid ankomsten till hemmet. [Malet kött, 10 cm radie, 2.7 cm tjockt, $h = 5.3$ (8 °C) eller 5.6 (4 °C) (konvektiv värmeöverföringskoefficient, $W/m^2 \cdot K$), $k = 0.4$ (värmekonduktivitet, $W/m \cdot K$), densitet = 960, specifik värmekapacitet = 3520 ($J/kg \cdot K$)] (ASHRAE, 2006). Resultatet visas i figur 6.



Figur 6. Beräknad tid och temperaturkurva på varmaste stället vid nerkyllning av malet kött (ca 800 g, 20 cm i diameter och 2.7 cm tjock) som ursprungligen håller 25 °C i kylskåp som håller 4 eller 8 °C.

- c. Frågan om hur mycket snabbare livsmedelsburna patogener kan tillväxa på grund av den temperaturökning som sker mellan butik och hem jämfört med om temperaturen varit konstant 4 eller 8 °C redovisas i figur 7. Figur 7 visar tillväxten, i antal bakterier (\log_{10}) över tid för de olika bakterier som studerats, vid 4, 8, 15 och 20 °C. I beräkningen har det utgått ifrån att det initialt funnits 1 st bakterie ($0 \log_{10}$ CFU) som sedan fått växa till i de olika temperaturerna. Förhållandet mellan de olika temperaturerna skiljer sig inte om man ökar den initiala halten, även om mängden bakterier kommer öka.

I figur 7 syns att tillväxthastigheten är betydligt högre vid såväl 20 som 15 °C jämfört med vid 4 och 8 °C. Vid 4 och 8 °C växer bakterierna knappt någonting, med undantag för *Yersinia enterocolitica*, som är den bakterie, av de som ingått i denna riskvärdering, som växer bäst vid låga temperaturer. Skillnaden blir större ju längre tid som går, och vid tider upp till en timme hinner inte bakterierna växa till allt för mycket mer även vid de högre temperaturerna. Vårt att nämna är också att det inte inkluderats någon lagtid i dessa beräkningar, vilket medför att figur 7 visar ett worst-case scenario. Vårt att nämna är att tillväxten av *Clostridium botulinum* förutsätter anaeroba förhållanden.



Figur 7. Skillnaden i tillväxt mellan fyra olika förvaringstemperaturer visat som antal bakterier som växt till över tid. Ingen hänsyn har tagits till lagtid. Temperaturerna som använts är ■ = 4°C, ▲ = 8°C, ◆ = 15°C och ● = 20°C. I beräkningen har det utgått från ett startvärde på 1 st bakterie (0 log₁₀). Diagrammen är baserade på data från ComBase.

Fråga 5. Tillväxt i färdiglagad mat under avsvälning

Hur mycket kan sjukdomsframkallande bakterier optimalt tillväxa i färdiglagad mat under två timmar vid 20-30 grader, det vill säga motsvarande rumstemperatur eller temperaturer under svenska varma sommardagar?

Svar 5. Tillväxt i färdiglagad mat under avsvälning

Utifrån generationstider hämtade från ComBase, och således baserade på försök i buljong, har antalet bakterier, uttryckt i \log_{10} , beräknats efter två timmars tillväxt i 20, 25 och 30 °C. Beräkningarna har utgått från att det endast funnits en bakterie i det ursprungliga livsmedlet. Resultaten visas i tabell 4. Vid den högsta temperaturen (30°C) kan bakterierna tillväxa mellan 1-2 \log_{10} på två timmar. Vid 20-25°C kan bakterierna tillväxa mellan 0.3-1.5 \log_{10} på två timmar.

Tabell 5. Ökning av antalet bakterier (\log_{10}) efter 2 timmar vid tre olika förvarings-temperaturer för ett urval av livsmedelsburna patogener. Ingen hänsyn har tagits till lagtid.

	20 °C	25 °C	30 °C
<i>Bacillus cereus</i>	0.6	1.2	2.0
<i>Clostridium botulinum</i> (icke-proteolytisk)	1.2	1.5	1.2
<i>Clostridium perfringens</i>	0.3	0.6	1.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.4	0.7	1.0
<i>Salmonella</i> spp.	0.5	1.0	1.5
<i>Stafylococcus aureus</i>	0.4	0.7	1.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.5	0.7	0.9

Tabell 6 visar lagtider, och det är endast *Salmonella* (vid 30°C) och *Yersinia* (vid 30°C och minus 1 standardavvikelse) som har en lagtid kortare än 2 timmar (1 timme). Detta skulle innebära att det eventuellt endast är *Salmonella* och *Yersinia* som skulle hinna börja tillväxa under två timmars förvaring, och då endast vid 30°C.

Tabell 6. Lagtider (timmar) från ComBase för ett urval av livsmedelsburna patogener vid tre olika förvaringstemperaturer.

		20 °C	25 °C	30 °C
<i>Bacillus cereus</i>	medel	11	6	3
	- 1 stdav	5	3	2
	+ 1 stav	24	12	7
<i>Clostridium botulinum</i> icke-proteolytisk	medel	8	6	7
	- 1 stdav	5	4	5
	+ 1 stav	13	10	12
<i>Clostridium perfringens</i>	medel	24	12	6
	- 1 stdav	14	6	4
	+ 1 stav	45	21	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	medel	8	5	4
	- 1 stdav	3	2	2
	+ 1 stav	18	11	8
<i>Salmonella</i> spp.	medel	6	3	2
	- 1 stdav	3	2	1
	+ 1 stav	10	5	3
<i>Stafylococcus aureus</i>	medel	11	5	4
	- 1 stdav	6	3	2
	+ 1 stav	19	10	6
<i>Yersinia enterocolitica</i>	medel	4	3	2
	- 1 stdav	2	1	1
	+ 1 stav	9	6	5

Referenser

- Anonym, 2003. Temperaturstudie. Livsmedelsverket.
- ASHRAE, 2006. Thermal properties of foods. ASHRAE Handbook. 9.
- Augustin, J.-C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. 66, 1706-1710.
- Cogan, T., Domingue, G., Lappin-Scott, H., Benson, C., Woodward, M., Humphrey, T., 2001. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. Int J Food Microbiol. 70, 131-141.
- De Jong, A., Beumer, R., Zwietering, M., 2005. Modeling growth of *Clostridium perfringens* in pea soup during cooling. Risk Analysis. 25, 61-73.
- Dorsa, W., Marshall, D., Moody, M., Hackney, C., 1993. Low temperature growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in precooked crawfish meat. J Food Protection. 56, 106-109.
- Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W., Notermans, S., 1997. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. International Journal of Food Microbiology. 34, 89-94.
- FDA, Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, Second Edition. 2012.
- Gay, M., Cerf, O., Davey, K., 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14 degrees C. J Appl Bacteriol. 81, 433-438.
- ICMSF, Microorganisms in food 5 - Microbiological specifications of food pathogens. In: T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker, R. B. Tompking, Eds.). Blackie Academic & Professional, London, UK, 1996.
- Ingham, S., Wadhera, R., Fanslau, M., Beuge, D., 2005. Growth of *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* during thawing of whole chicken and retail ground beef portions at 22 and 30 °C. J Food Protection. 68, 1457-1461.
- Jiménez, S., Pirovani, M., Salsi, M., Tiburzi, M., Snyder, O., 2000. The effect of different thawing methods on the growth of bacteria in chicken. Dairy, Food and Environmental Sanitation 20, 678-683.
- Koutsoumanis, K. P., Sofos, J. N., 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 104, 83-91.
- Luo, K., Hong, S.-S., Wang, J., Chung, M.-J., Oh, D.-W., 2015. Development of predictive models for the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* on fresh pork under different storage temperatures. J Food Protection. 78, 921-926.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., 2003. Brock Biology of Microorganisms. Pearson Education, New Jersey.
- Mellefont, L. A., Ross, T., 2003. The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. International Journal of Food Microbiology. 83, 295-305.
- Sage, J., Ingham, S., 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties. J Food Protection. 61, 1181-1183.

- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J. J., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 137-159.
- Tamplin, M., Modeling pathogen behavior in foods. In: P. Fratamico, A. Bhunia, J. Smith, Eds.), *Foodborne pathogens - microbiology and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, 2008.
- Walker, S., Archer, P., Banks, J., 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol*. 68, 157-162.



Livsmedelsverket

Uppsala Hamnesplanaden 5, SE-751 26

www.livsmedelsverket.se