

Produksjonshygiene og holdbarhet av pre-rigor laksefilet

Nivå av bakterier og kartlegging av bakterieflora/mikrobiota på pre-rigor produsert islagret laksefilet

Even Heir, Solveig Langsrud, Birgitte Moen og Anlaug Ådland Hansen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
NO-5141 Fyllingsdalen

Sundalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-070-0 (trykt) ISBN: 978-82-8296-071-7 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Produksjonshygiene og holdbarhet av pre-rigor laksefilet (forprosjekt). Nivå av bakterier og kartlegging av bakterieflora/mikrobiota på pre-rigor produsert islagret laksefilet	<i>Rapportnr.:</i> 14/2013 <i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Even Heir (prosjektleder), Solveig Langsrud, Birgitte Moen og Anlaug Ådland Hansen	<i>Dato:</i> 16.04.2013 <i>Ant. sider og vedlegg:</i> 17 sider; 3 vedlegg
<i>Avdeling:</i> Trygg og holdbar mat	<i>Prosjektnr.:</i> 10201
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> Prosjekt FHF # 900792
<p><i>Sammendrag:</i></p> <p>Formålet med dette forprosjektet har vært å gi en oversikt over dagens status for prosess/hygieneforhold som kan ha betydning for kvalitet og holdbarhet til fersk, islagret pre-rigor filetert laks. Arbeidet er gjennomført i samarbeid med sju norske produsenter av pre-rigor laksefilet. Forprosjektet inkluderte 1) State-of-the-art litteraturreport 2) Lagringsforsøk, prøvetaking og mikrobiologiske analyser av pre-rigor filetert laks fra syv produksjonsanlegg. Spørreskjema til produsenter for å kartlegge produksjonsforhold og rutiner 3) Formulere innhold i et evt videreført hovedprosjekt.</p> <p>Resultatene viste:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lite dokumentasjon i litteraturen på sammenhengen mellom bakterienivå, -type og spisekvalitet av islagret laks - Industriell filetering av laks kan bidra med betydelig bakteriesmitte av bakterier man anser som problematiske (<i>Pseudomonas</i>, <i>Shewanella</i>) for holdbarhet til islagret laksefilet, men at det er forskjeller i smitte mellom anlegg - Bakteriesmitte til filet var ofte høyere ved produksjonsstart enn senere på dagen - Det var hovedsakelig små forskjeller i bakterieflora mellom anlegg - Bakterier som dominerte på prosessert laks fra anleggene tilhørte slekten <i>Pseudomonas</i> etterfulgt av <i>Shewanella</i>. <p>Resultatene fra forprosjektet danner et godt utgangspunkt for videre studier knyttet til å fastsette mulig økt holdbarhetstid for islagret laks samt bestemme betydningen av spesifikke bakterier for kvalitet og holdbarhet til fersk, islagret laks.</p>	
<p><i>English summary:</i></p> <p>The aim of this project was to provide an overview of the current status of the process / hygiene conditions that may affect the quality and shelf life of fresh, ice-stored pre-rigor filleted salmon. The work was conducted in collaboration with seven Norwegian pre-rigor salmon fillet processing plants. The project included 1) State-of-the-art literature report 2) Sampling and microbiological analysis of pre-rigor filleted salmon from seven processing plants for qualitative and quantitative analyses of the microflora of fresh ice-stored salmon filets. Questionnaire for processing plants to identify production routines and conditions 3) Formulate content in a possibly continuing master.</p> <p>The data from the project forms a good basis for further studies related to determine the potential of increased shelf life of ice-stored salmon and clarify the importance of specific bacteria for quality and durability of fresh ice-stored salmon.</p>	

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	2
3	Problemstilling og formål	3
4	Prosjektgjennomføring	4
5	Resultater og konklusjon	5
5.1	Nivå av bakterier på filet av islagret pre-rigor slaktet laks ved Dag 1/Dag 2 etter slakt	5
5.2	Nivå av bakterier på filet av islagret pre-rigor slaktet laks ved Dag 10 etter slakt.....	6
5.3	Nivå av bakterier på håndsløyd og -filetert laksefilet og maskinelt produsert filet.....	7
5.4	Temperatur og pH i fisk i kassene	8
5.5	Bestemmelse av type bakterieflora på fersk islagret laksefilet.....	8
5.6	Etablering av samling av bakterier fra pre-rigor laksefilet for evt senere forsøk med lagring/forringelse	11
5.7	Spørreundersøkelse til anlegg om rutiner ved produksjon av pre-rigor laksefilet	12
5.8	Konklusjoner.....	14
5.9	Forslag til videre arbeid	15
6	Leveranser	16
7	Generelle kommentarer til forsøksoppsett, analyser og kvalitetssikring	17
	Vedlegg	

1 Sammendrag

Kontroll med bakterier er viktig for holdbarhet og sensorisk kvalitet av fersk fisk. Produksjon av pre-rigor filetert, fersk laksefilet er økende og har potensial for å gi betydelig merverdi for norsk lakseproduksjon. Pre-rigor filet innehar et unikt utgangspunkt med hensyn til ferskheten av råstoffet. Økt kontroll med bakterier i hele kjeden fra råvare via prosess og lagring og fram til konsum er viktig for å oppnå et best mulig produkt som tilfredsstiller kravene til forbruker gjennom hele holdbarhetstiden. Dette vil kunne bidra til produksjon av fersk laksefilet med økt kvalitet, lengre holdbarhetstid, mindre svinn og dermed økt fortjeneste.

Formålet med dette forprosjektet har vært å gi en oversikt over dagens status for prosess/hygieneforhold som kan ha betydning for kvalitet og holdbarhet til fersk, islagret pre-rigor filetert laks. Arbeidet har inkludert: 1) State-of-the-art litteraturreport 2) Lagringsforsøk og mikrobiologiske analyser av pre-rigor produsert laksefilet fra syv anlegg 3) Utarbeide forslag til videreføring av arbeidet i et hovedprosjekt.

Studien har vist at sammenhengen mellom bakterienivå, bakterietype og spisekvalitet av islagret laks er lite dokumentert i litteraturen. Analyser av laks fra syv anlegg viste at laksefilet smittes med bakterier gjennom produksjonsprosessen. Det var et høyere smittenivå til fileter tidlig på produksjonsdagen enn senere på produksjonsdagen i anleggene med lavest hygienisk kvalitet. Bakterier som assosieres med forringelse av islagret fisk (*Pseudomonas*, *Shewanella*) dominerte mer på fisk som var prosessert i anlegget enn kontrollfisk som var håndsløyet og -filetert utenfor anlegget.

Oppsummert indikerer resultatene at bakterier man regner med er problematiske for holdbarhet av islagret laks i stor grad påføres laksen ved filetering og at problemet er størst ved produksjonsstart. Resultater fra forprosjektet gir et godt grunnlag for videre studier for å avklare potensiale for å oppnå forlenget holdbarhet på islagret laksefilet samt påvise viktige smittekilder i produksjonsprosessen.

2 Innledning

Forprosjektet ble igangsatt for å avdekke om det er potensial for å oppnå økt mikrobiologisk kvalitet på islagret pre-rigor laksefilet og hvordan dette evt. kan oppnås. Forprosjektet inkluderte: 1) State-of-the-art kunnskapsrapport basert på studie av tilgjengelig litteratur knyttet til faktorer, smittekilder og tiltak for å oppnå økt holdbarhet til islagret laksefilet; 2) Prøvetaking og analyser av pre-rigor filetert laks fra syv produksjonsanlegg for å kunne vurdere om det er potensiale for å oppnå økt holdbarhet på norsk pre-rigor filetert laks; 3) Utarbeide forslag til videreføring av arbeid i et evt. hovedprosjekt. Anleggene som deltok besvarte også en enkel spørreundersøkelse knyttet til produksjonsforhold og rutiner som kan ha betydning for mikrobiologisk kvalitet på laks. Kvantifisering av mulig økt holdbarhetstid på islagret pre-rigor filetert laks lå ikke inne i forprosjektet.

Forprosjektet har påvist forskjeller i produksjonsforhold/-rutiner mellom anlegg og opprettet en samling av bakterieisolater fra islagret pre-rigor laksefilet fra norske anlegg. Dette vil være et godt utgangspunkt for å bestemme betydningen av spesifikke bakterier for kvalitet og holdbarhet til fersk, islagret laks samt avklare om økt mikrobiologisk kontroll kan gi økt holdbarhetstid. Dette er grunnlaget i forslag om videre studier basert på resultatene av dette forprosjektet. Forslag om videre studier er blitt framlagt Styringsgruppen i prosjektet.

Arbeidet i forprosjektet har vært gjennomført i perioden april 2012-mars 2013. Det ble opprettet en styringsgruppe i prosjektet med deltagere fra FHF, laksenæringen og Nofima. Ansvarlig for oppsett, analyser og gjennomføringen av prosjektet har vært Nofima, Ås. Det har vært tett samarbeid med norske produsenter av pre-rigor laksefilet.

3 Problemstilling og formål

Produksjon av laksefilet er økende, og det er et mål å fremby et produkt som opprettholder god kvalitet over lengre tid. Kunnskap om faktorer som begrenser holdbarheten er vesentlig for å ha et godt grunnlag for å fastsette holdbarhet på islagret laksefilet. Det er behov for økt kunnskap om faktorer som begrenser holdbarhet. Kunnskap om hvilke mikroorganismer som er viktigste årsak til redusert holdbarhet og kvalitet vil være nyttig. Den hygieniske standarden på produksjonsanlegg er ofte gjenstand for omfattende tiltak fra bedriften. Kunnskap om betydningen av renhold, hygiene og produksjonsrutiner vil kunne gi en rasjonell tilnærming til viktige innsatsfaktorer for produksjon av ferske laksefileter med økt kvalitet. Dette kan samtidig bidra til lengre holdbarhetstid, mindre svinn og dermed økt fortjeneste.

Med dette som bakgrunn har prosjektet vært delt inn i arbeidspakker med tilhørende delmål:

Arbeidspakke 1 (Delmål 1):

State-of-the-art litteraturstudium: Avdekke kunnskapsstatus og –behov knyttet til betydningen av renhold, hygiene, råvarer, lagringsforhold, mikrobiologisk belastning og bakterieflora på kvalitet og holdbarhet til fersk laks. Delrapport levert 15. juni 2012. Se denne for detaljer og konklusjoner.

Arbeidspakke 2 (Delmål 2, 3, 4):

Delmål 2: Oversikt over parametere som kan ha betydning for kvalitet (prosess, råstoff og hygienenivå) fra ti norske fileteringsanlegg.

Delmål 3: Beskrivelse av nivå og type bakterieflora på fersk, islagret laksefilet fra norske anlegg med prøveuttak fra ulike tidspunkt i løpet av ett skift.

Delmål 4: Samling av bakterier fra pre-rigor laksefilet fra ulike anlegg etter 10 dagers lagring på is.

Arbeidspakke 3:

Delmål: Formulere innhold i et hovedprosjekt

Resultater på bakterienivå på laks fra ulike anlegg er blitt analysert og formidlet til det enkelte anlegg. Resultater er formidlet til prosjektets styringsgruppe i løpet av prosjektperioden via e-post og telefonmøter. Resultatene er blitt formidlet med innlegg og workshop på FHF samling Verdikjede Havbruk 26. nov. 2012.

4 Prosjektgjennomføring

Prosjektet er blitt gjennomført ved bruk av flere metoder for datainnsamling og analyser. Beskrivelse av metoder og analyser er gitt i Vedlegg 1. Arbeidet har vært delt i tre arbeidspakker (AP1-3; se også over for beskrivelse av AP 1-3). I første del av prosjektet ble det gjennomført et litteraturstudium. På bakgrunn av studien ble det utarbeidet en rapport på status for dagens kunnskapsnivå for bakteriesmitte og mikrobiologisk holdbarhet av laksefilet lagret på is. Kunnskapsbehov ble identifisert og spesifisert. Rapport («Hygiene og mikrobiologisk holdbarhet av laksefilet (pre-rigor filetert laks). State-of-the-art.») ble utarbeidet og levert 15. juni 2012. Se rapporten for detaljer og konklusjoner.

For gjennomføring av AP2 ble det i samråd med Styringsgruppen kontaktet anlegg som produserte pre-rigor filetert laks. Totalt bidro syv anlegg ved å gi informasjon om rutiner og prosess gjennom besvarelse av en spørreundersøkelse samt levering av fersk laksefilet og rund laks. Detaljert beskrivelse av gjennomføring/metoder er gitt i vedlegg 1 og inkluderte

- Uttak og forsendelse av laks (filet og håndsløyd laks) fra syv anlegg som produserer pre-rigor laksefilet til Nofima samt besvarelse av spørreskjema på rutiner, prosess og renhold
- Bestemmelse av bakterienivå og bakterieflora på laksefilet: Filet produsert tidlig på dagen, filet produsert sent på dagen og filet håndfiletert ved Nofima.
- Bestemmelse av bakterienivå og bakterieflora på laksefilet etter islagring 10 dager
 - o Dyrkingsavhengige analyser (bakterienivå)
 - o Dyrkingsuavhengige analyser (bakterieflora)
- Databearbeiding og sluttrapportering

I AP3 ble det utformet en prosjektbeskrivelse for evt videreføring av arbeidet fra dette forprosjektet i et hovedprosjekt.

Avvik i prosjektplanen: Prosjektet hadde opprinnelig sluttdato 31.10.2012. En konkret del av prosjektet ble forsinket og endelig sluttrapport foreligger derfor 15.03.2013. Forsinkelsen er knyttet til bestemmelse av bakterieflora i laks fra ulike anlegg vha såkalte dyrkingsuavhengige analyser. Leverandør av reagenser for gjennomføring av disse analysene var ikke i stand til å levere reagenser med jevn og tilstrekkelig kvalitet. Dette førte til data med dårlig kvalitet. Det tok mye tid og ressurser før årsaken til problemet ble identifisert. Problemet endte med at Nofima fikk hevet kjøpet av aktuelt instrument. Analysene ble deretter kjøpt fra eksternt institutt og deretter videre bearbeidet ved Nofima. Styringsgruppen og FHF er blitt holdt orientert om forsinkelsene dette har medført.

5 Resultater og konklusjon

Hovedvekt i denne rapporten er lagt på resultater fra Arbeidspakke 2. Forslag til videre arbeid (Arbeidspakke 3) er gitt i kapittel 5.9. For litteraturreporten (Arbeidspakke 1) henvises til separat delrapport «Hygiene og mikrobiologisk holdbarhet av laksefilet (pre-rigor filetert laks). State-of-the-art» levert 15. juni 2012.

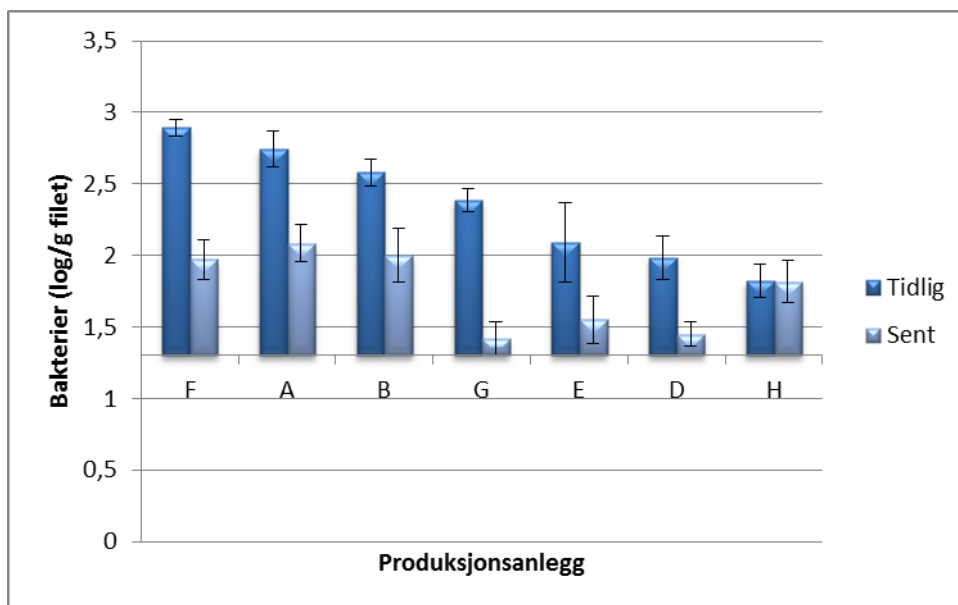
Det ble mottatt pre-rigor filetert laks fra totalt syv anlegg. Det var ett uttak fra hvert anlegg. Forsendelse av laks fra anleggene ble gjort i perioden 25. juni-24. september 2012 (Tabell 1). (Anlegg C: produserte ikke pre-rigor slaktet laks på avtalt uttaksdato. Laks ble derfor ikke mottatt og anlegg C er ikke med i oversikten.) Ved mottak hos Nofima ble innhold av is i kassene kontrollert og temperatur ble målt ved mikrobiologiske analyser Dag 1 og Dag 10. Nivå av is var tilfredsstillende i alle kassene.

Tabell 1 Slaktedato for pre-rigor produsert laks sendt fra anlegg A-H til Nofima for analyser

Anlegg	Slaktedato (Dag 0)
A	25.06.2012
B	25.06.2012
D	28.08.2012
E	28.08.2012
F	24.09.2012
G	24.09.2012
H	25.09.2012

5.1 Nivå av bakterier på filet av islagret pre-rigor slaktet laks ved Dag 1/Dag 2 etter slakt

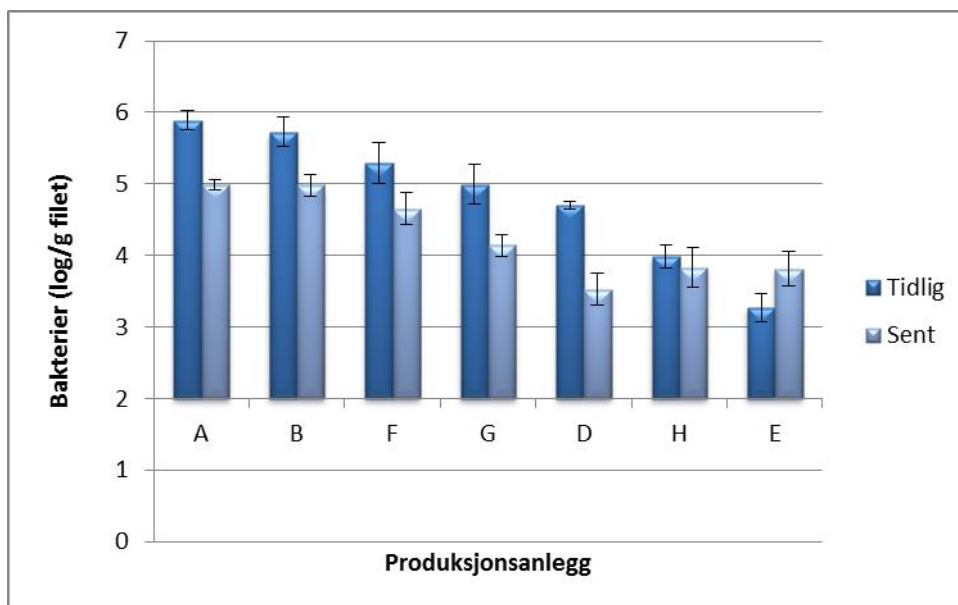
Ved Dag 1 (Dag 2 for anlegg F, G) var det lave bakterietall på alle fileter. Gjennomsnittsverdier fra hvert anlegg varierte fra log 1,4-log 2,9 (40-820) bakterier/g filet. Filet produsert tidlig på dagen hadde gjennomgående høyere totaltall av bakterier enn filet produsert sent på dagen. Bakterienivået varierte fra log 1,8-2,9 for filet produsert tidlig på dagen til log 1,4-2,1 for filet produsert sent på dagen. I kun ett anlegg (H) var det like lave nivåer av bakterier på filet produsert tidlig og sent på dagen. Resultater for hvert anlegg er vist i Figur 1.



Figur 1 Totalantall bakterier per g laksefilet (industrielt produsert) før start lagring (dag 1-2 etter produksjonsdag) i laksefilet produsert i 7 anlegg (A-H). Fra hvert anlegg ble det analysert laksefilet fra to produksjonstidspunkt på dagen; tidlig og sent. Dataene presentert i synkende rekkefølge mht antall bakterier/g filet. Deteksjonsnivå er log 1,3 bakterier/g (20 bakterier/g).

5.2 Nivå av bakterier på filet av islagret pre-rigor slaktet laks ved Dag 10 etter slakt

Ved andre prøveuttak (10 dagers lagring på is) varierte bakterietallet fra log 3,3-log 5,9 bakterier/g filet (om lag 1000 – 1 mill bakterier/g). For 6 av 7 anlegg var det høyere bakterietall på filet produsert tidlig på dagen enn filet produsert senere på dagen. Bakterietall i filet fra hvert anlegg er angitt i Figur 2.



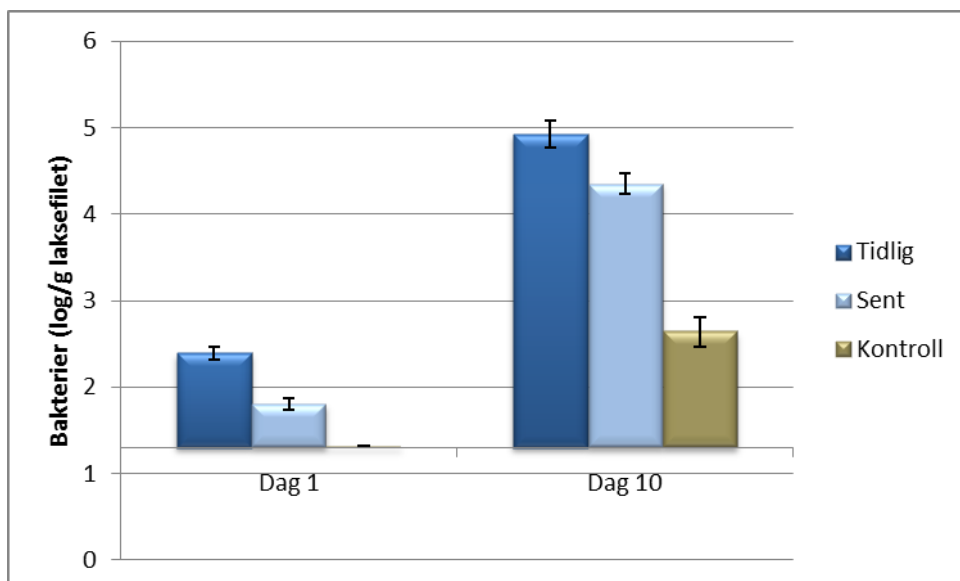
Figur 2 Totalantall bakterier per g laksefilet (maskinelt produsert) etter 10 dagers lagring på is (dag 0 = produksjonsdag). Laksefilet produsert i 7 anlegg (A-H). Fra hvert anlegg ble det analysert laksefilet fra to produksjonstidspunkt på dagen; tidlig og sent. Dataene presentert i synkende rekkefølge mht antall bakterier/g filet. Deteksjonsnivå er log 2 bakterier/g (100 bakterier/g).

Gjennomsnitt bakterietall på fileten fra alle anleggene viser at høyere bakterietall tidlig i lagring (prøveuttak 1) hovedsakelig også gir høyere bakterietall etter 10 dagers lagring.

5.3 Nivå av bakterier på håndsløyd og -filetert laksefilet og maskinelt produsert filet

Alle anlegg leverte separat kasse med håndsløyd laks. Denne ble videre håndfiletert ved Nofima etter mest mulig optimale hygieniske prinsipper og deretter lagret på is som øvrig laksefilet. Håndfileteringen ble foretatt samme dag som lagringsforsøket ble igangsatt. Laksen til kontrollfilet og industrielt produsert filet er fra samme produksjonsdag, men selve fileten som er maskinelt produsert har pga ovennevnte forhold blitt lagret 1 dag lenger på is (2 dager lenger for anlegg F og G) enn fileten fra kontrollaksen. Resultatene tyder ikke på at disse forskjellene er av betydning for lavere bakterietall i kontrollfilet enn i maskinelt produsert filet.

Bakterienivået i kontrollfilet var lavere enn i maskinelt produsert filet. Før man startet lagring, var det kun én kontrollfilet som inneholdt bakterier i nivå over deteksjonsgrensen på 20 bakterier/g. Etter 10 dagers lagring var det gjennomsnittlige bakterienivået i kontrollfilet log 3,1 bakterier/g filet. Tilsvarende tall for maskinelt produsert filet fra produksjon tidlig og sent på dagen var hhv log 4,9 og log 4,4 bakterier/g, dvs 10-100 ganger så høyt som håndsløyd fileten. Figur 3 viser sammenligning av kontrollfilet og maskinelt produsert filet før start lagring og etter 10 dagers lagring.



Figur 3 Sammenligning av totalantall bakterier på håndfiletert kontrollfilet (beste hygieniske standard) og maskinelt produsert filet fra 2 produksjonstider på dagen (tidlig og sent). Gjennomsnitt totalantall bakterier per g laksefilet fra de 7 anleggene før lagring (dag 1) og etter 10 dagers lagring på is (dag 0 = produksjonsdag). Deteksjonsnivå er log 1,3 bakterier/g (20 bakterier/g).

Figurer for bakterienivåer i laksefilet fra hvert anlegg er gitt i vedlegg 2

5.4 Temperatur og pH i fisk i kassene

Målt temperatur på fisk (overflater) i kassene ved Dag 1/Dag 2 lå mellom -1,8 og +1,1 °C og ved Dag 10 lå temperaturen på mellom -1,2 og + 1,3 °C. Det var tilstrekkelig med is i kassene ved mottak og is ble etterfylt i lagringsperioden ved behov. Det var ingen systematisk forskjell i temperatur på fisk fra ulike kasser. Temperturloggere som lå i kassene viste 0 °C i hele lagringstiden. pH ble målt ved Dag 1 og Dag 10. Ved Dag 1 lå pH i filet fra pre-rigor filetert laks i området 6,0-6,3. Ved Dag 10 var pH i området 6,2-6,4. pH i kontrollfilet (håndfiletert) var 6,1-6,4 (ved prøveuttak 1) og 6,2-6,3 ved prøveuttak 2. Det ble ikke gjennomført måling av kjernetemperatur i fisk ved produksjonsdag. Produksjonstiden fra merd til ferdig pakket filet i kasser er kort ved de ulike anleggene (1,5-3 timer, jfr spørreundersøkelsen Tabell 3). Ved små variasjoner i produksjonstid samt antatt effektiv kjøling av filet ved de ulike anleggene etter pakking forventes derfor evt forskjeller i kjernetemperatur på fisk fra ulike anlegg å ha liten betydning for de påviste forskjellene i bakterienivåene på filet fra anleggene.

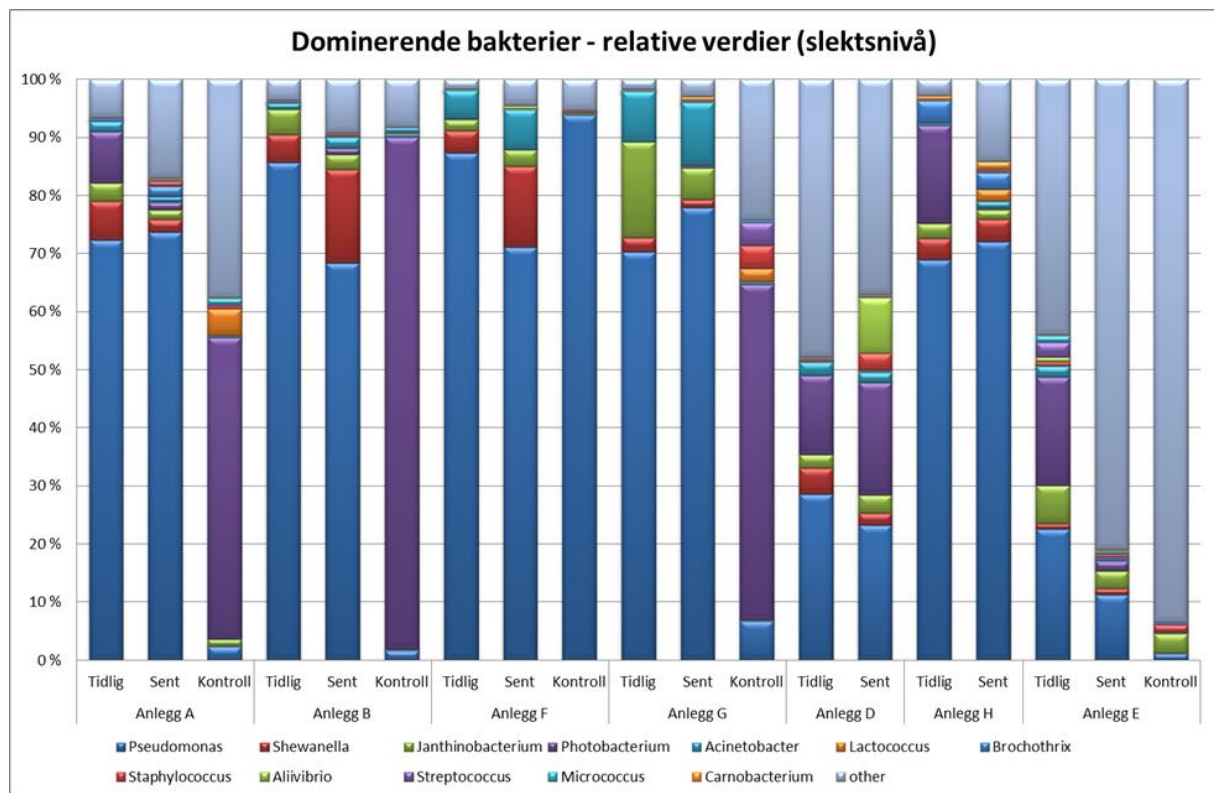
5.5 Bestemmelse av type bakterieflora på fersk islagret laksefilet

Prøver for dyrkingsuavhengige analyser ble utført på samme prøvemateriale som beskrevet under 5.3. Dvs fra filet produsert tidlig på dagen (T), sent på dagen (S) samt kontrollfilet (K) som var manuelt sløyd og filetert. Prøvene ble preparert som beskrevet under «Dyrkingsavhengig analyser for å bestemme bakterieflora» i vedlegg 1. Prøvene ble sendt til Ullevål sykehus for gen-sekvensering (MiSeq sekvensering; se kapittel 4 angående avvik i prosjektplanen). Sekvensdata ble analysert ved Nofima, Ås.

Oppsummert viste analysene:

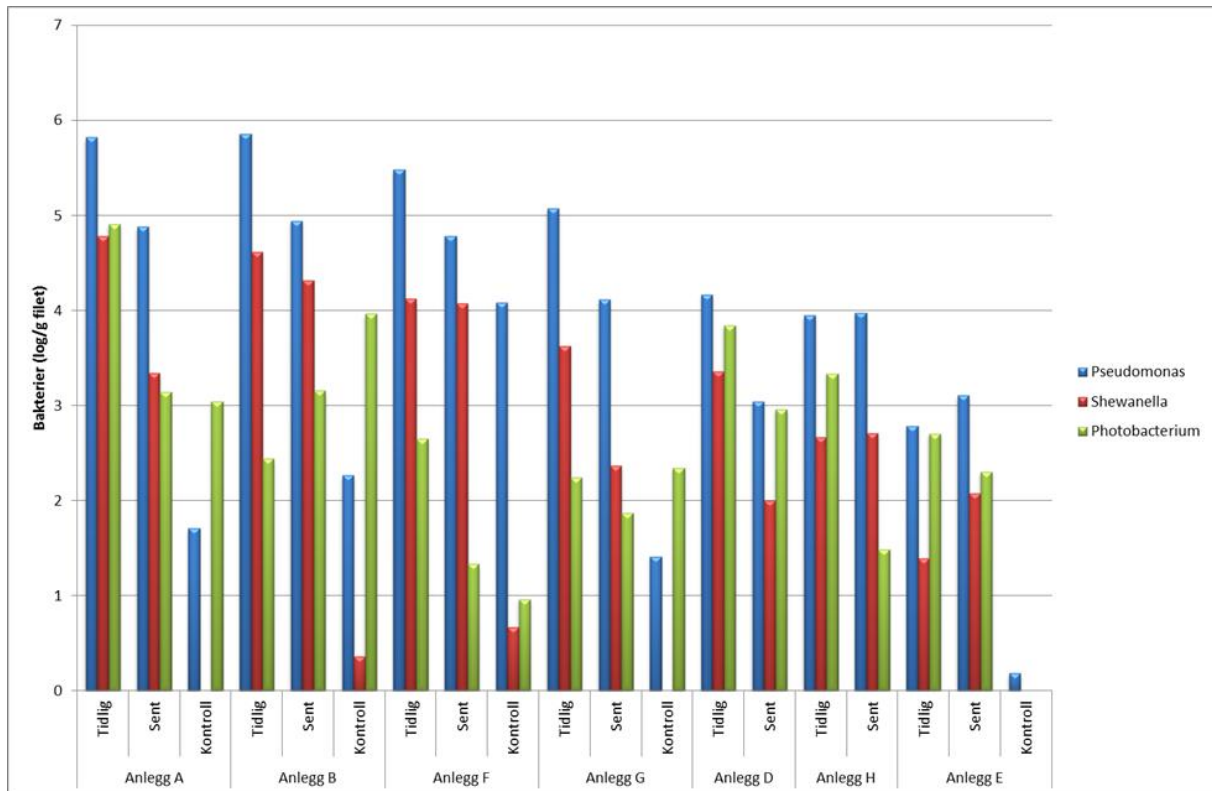
- På industrielt prosessert laks lagret 10 dager på is dominerer bakterier som tilhører slekten *Pseudomonas* etterfulgt av *Shewanella*
- *Photobacterium* dominerer i hovedsak på islagret kontrollfileter som ikke har vært i befatning med prosesseringsanlegg
- Det var et høyere nivå av bakterier av slekten *Pseudomonas* i laksefilet filetert tidlig på dagen (T) enn sent på dagen (S); data etter 10 dagers lagring
- Det ble påvist forskjeller i bakteriediversitet (antall forskjellige typer bakterier) mellom anleggene

Oversikt over de mest dominerende bakterieslektene i de ulike anleggene (A-H) på laks filetert tidlig og sent på produksjonsdagen er gitt i Figur 4 og Figur 5. Figur 4 angir %-vis andel av de ulike bakteriene i forhold til totaltallet.



Figur 4 Andel (% av totaltallet) av de mest dominerende bakterieslektene i de ulike anleggene (A-H) på laks filetert tidlig (T) og sent (S) på produksjonsdagen. Prøver merket K er kontrollfileter sløyd og filetert for hånd. Data etter 10 dagers lagring på is.

Figur 5 angir antall bakterier (log bakterier/g filet) i de ulike prøvene av de potensielt viktige forringelsesbakteriene tilhørende slektene *Pseudomonas*, *Shewanella* og *Photobacterium* basert på %-vis andel i forhold til totaltallet i prøvene.



Figur 5. Antall bakterier (log bakterier/g filet) av *Pseudomonas*, *Shewanella* og *Photobacterium* i fileter fra Anlegg A-H etter 10 dagers lagring på is. Antallet er beregnet på grunnlag av bestemt totaltall bakterier i prøvene og andel av de ulike bakterieslektene (gitt i Figur 4).

Figur 4 viser at de fleste filetene av laks filetert i anleggene domineres av *Pseudomonas*. Prøver slaktet i anlegg har også mer *Shewanella* enn kontrollfiletene. Prøver med lave nivåer av bakterier (eks. fra anlegg D, E) har også mange andre bakterieslekter («other»). Dette indikerer at bakteriefloraen i disse prøvene fortsatt er under utvikling. Kontrollfiletene er oftest dominert av *Photobacterium*. Det er uklart om forbedret produksjonshygiene i anleggene vil kunne gi endringer i dominerende bakterieflora under lagring som vil påvirke kvalitet og holdbarhet. Andelen (% av totaltallet) av de 5 hyppigst forekommende bakterieslektene er gitt i Tabell 2.

Tabell 2. Andel (% av totaltallet) av de fem hyppigst forekommende bakterieslektene i filetprøver fra de syv anleggene (A-H). Totaltallet bakterier i hver prøve (log cfu/g) er gitt i kolonne 2.

Anlegg	Prøvetype ¹	log bakterier/g	Pseudo- monas	Photo- bacterium	Shewa- nella	Janthino- bacterium	Acineto- bacter
A	Tidlig	6,0	72,4	8,8	6,6	3,2	1,8
A	Sent	5,0	73,8	1,3	2,1	1,6	0,9
A	Kontroll	3,3	2,4	51,8	0,0	1,3	0,4
B	Tidlig	5,9	85,7	0,0	4,9	4,3	1,1
B	Sent	5,1	68,4	1,1	16,1	2,6	1,8
B	Kontroll	4,0	1,8	88,2	0,0	0,1	0,6
F	Tidlig	5,5	87,3	0,1	3,8	1,9	4,9
F	Sent	4,9	71,1	0,0	13,9	2,9	6,9
F	Kontroll	4,1	93,9	0,1	0,0	0,0	0,1
G	Tidlig	5,2	70,3	0,1	2,5	16,4	8,7
G	Sent	4,2	77,9	0,4	1,4	5,4	10,8
G	Kontroll	2,6	6,8	57,8	0,1	0,0	0,5
D	Tidlig	4,7	28,6	13,6	4,5	2,3	2,3
D	Sent	3,7	23,3	19,3	2,1	3,1	1,7
H	Tidlig	4,1	69,0	16,9	3,7	2,6	0,4
H	Sent	4,1	72,0	0,2	3,9	1,7	1,2
E	Tidlig	3,4	22,6	18,7	0,9	6,6	1,9
E	Sent	4,1	11,3	1,8	1,1	3,0	0,1
E	Kontroll	2,1	1,2	0,3	0,0	3,3	0,0

¹ Prøvetype Tidlig og Sent angir prøve fra filet produsert hhv. tidlig og sent på produksjonsdagen. Kontroll er laksefilet som ikke har vært i produksjonsanlegget, men er tatt fra merd, sløyd og filetert for hånd.

Da sekvensene ble analysert i mer detalj, kom det frem at det var to ulike grupper av *Pseudomonas* som dominerte prøvene (basert på ulik DNA sekvens). Se figur i vedlegg 3. Den ene gruppen (*Pseudomonas* gr 1) representeres av arten *P. fragi* og den andre (*Pseudomonas* gr 2) av *P. veronii*/*P. fluorescens*. Tendensen er at i de anleggene med høyest bakterienivå dominerer *Pseudomonas* gr 1 i tidlig prøvene og *Pseudomonas* gr2 i seint prøvene. Dette kan indikere at *Pseudomonas* gr1 har spesielt god evne til å overleve renholdet i anleggene og derfor utgjør en dominerende flora på laksefilet produsert tidlig på dagen. Begge gruppene er kjente forringere fra kjøtt og fisk, men det er uklart hvilken av disse gruppene som har størst evne til å redusere holdbarheten til islagret laks.

5.6 Etablering av samling av bakterier fra pre-rigor laksefilet for evt senere forsøk med lagring/forringelse

Det er blitt opprettet en samling av bakteriestammer fra islagret laksefilet. Fra prøver av hver filet ble det plukket bakteriekolonier etter oppdyrking på Long & Hammer vekstmedium. Bakterier påvist før start lagring (Dag 1/Dag 2), etter endt lagring Dag 10 fra filet produsert tidlig på dagen, sent på dagen samt kontrollfilet er blitt samlet og oppbevart ved -80 °C. Denne stammesamlingen (om lag 1200 bakterieisolater) vil danne et godt grunnlag for å kunne påvise hvilke typer bakterier som dominerer i laksefilet før og etter lagring, identifisere potensielle bakterietyper knyttet til forringelse og benytte

utvalgte bakterier i belastningsforsøk hvor man undersøker sammenheng mellom bakterietype og holdbarhet/kvalitet. Dette vil kunne bli videreført i et evt. hovedprosjekt.

5.7 Spørreundersøkelse til anlegg om rutiner ved produksjon av pre-rigor laksefilet

Spørreskjemaet ble besvart av seks av de syv anleggene som deltok i forprosjektet. Svarene mottatt fra anleggene er oppsummert og kommentert i Tabell 3.

Tabell 3 Oppsummering av spørreundersøkelse om rutiner ved produksjon av pre-rigor laksefilet. Besvart av Anlegg A-H

Spørsmål	Svaralternativer	Kommentar
1. Størrelse på bedrift – antall årsverk på land?	1. <10 2. 10-50 3. >50	5 av 6 anlegg har mer >50 årsverk, mens ett anlegg (B) har mellom 10 og 50 årsverk.
2. Råvarer laks?	1. Én leverandør 2. Flere leverandører 1. Ekstern leveranse 2. Bedrifts-intern leveranse 1. Levende laks 2. Sløyd laks	To anlegg har kun én leverandør (F, G). To anlegg (A, B) har ekstern leveranse, mens fem anlegg har bedriftsintern leveranse, Anlegg A har både ekstern og bedrifts-intern leveranse av råvarer som er både levende og sløyd laks.
3. Antall skift?	1. Ett skift 2. 2-3 skift 3. Periodevis 2-3 skift	Ett anlegg (G) har ett skift, ett anlegg har 2–3 skift (H). Øvrige fire anlegg har periodevis 2-3 skift.
4. Det tas mikrobiologiske prøver (kimtall) etter renhold/før produksjonsstart?	1. Daglig 2. Ukentlig 3. Månedlig 4. Halvårlig 5. Sjeldnere 6. Aldri	Fire anlegg rapporterer å ta ukentlige prøver. Rett anlegg (A) tar daglige prøver og ett anlegg (H) månedlige prøver. Besvarelsene tyder på at ATP-måling anses som mikrobiologisk prøve.
5. Prøvetakingsmetode?	1. Svaber 2. Chiffonette 3. Andre (kommentarer)	Flere anlegg benytter ulike typer kontaktfilm (Hygicult, kontaktagar). Ett anlegg (H) bruker petrifilm. Ett anlegg (A) benytter svaber og ATP-måling.
6. Areal som prøvetas (hvis mulig å standardisere)?		Varierende fra 20 cm ² og oppover.
7. Er det satt grenseverdier i forhold til kimtall og gjennomføring av tiltak? Hvis ja – hvilke?	1. Ja 2. Nei	Fem anlegg rapporterer at de har grenseverdier for kimtall. Grensene baserer seg delvis på kimtall og ATP. Ett anlegg (A) gir beskjed om bedre renhold og foretar deretter ny prøvetaking.
8. Hvem foretar renhold?	1. Egne renholdere 2. Eksternt byrå	Fire anlegg har egne renholdere. To anlegg benytter eksternt byrå (F, H).
9. Det foregår renhold av kontaktflater mellom skift samme dag eller innenfor et skift?	1. Ja 2. Nei	Ett anlegg (H) foretar renhold mellom skift samme dag eller innenfor et skift. Øvrige 5 anlegg svarer nei på spørsmålet.
10. Det er visuelt rent etter renhold?	1. Ja 2. Nei	Alle anlegg sier at det er visuelt rent etter renhold. Ett anlegg (A) med kommentar om at det som oftest er rent.
11. Er det kontaktflater som er vanskelig å holde rene? Hvis ja – hvilke?	1. Ja 2. Nei	Tre anlegg (A, D, G) har kontaktflater som er vanskelig å holde rene (inni sløyemaskiner, bånd, Grader). Tre anlegg har ikke flater som er vanskelig å holde rene.
12. Temperatur i produksjonslokalene?		Fire anlegg har ca 10-12 grader. Ett anlegg (B) måler ikke temp i produksjonslokalet. Ett anlegg (H) rapporterer at temperatur i produksjonslokalene skal være <10 grader.
13. Hva er anslått holdbarhetstid på laksefilet? Hva vil holdbarhetstida være dersom grenseverdi ved 1 000 000 bakterier per g?		Anslått holdbarhetstid varierer fra 12 dager (B) til 17 dager (F).

14. Lagringsforhold filet?	1. Is 2. Fryst 3. Superkjøling 4. Annet	Fire anlegg lagrer på is/gelice. Ett anlegg (B) lagrer på kjølelager. Ett anlegg lagrer ikke filet (H).
15. Benyttes kjøletank for nedkjøling av fisk før slaktning? Hvis ja – hva er temperaturen i tank?	1. Ja 2. Nei	Fem anlegg benytter kjøletank med temperatur fra -0,5-4 °C. Ett anlegg (G) benytter ikke kjøletank.
16. Hvilken bedøvingsmetode benyttes ved slaktning?		Stunning, slagbedøvelse og CO ₂ + nedkjøling benyttes.
17. Registreres sjøtemperatur ved lagring? I så fall hvilken temperatur er registrert?	1. Ja 2. Nei	Tre anlegg (A, B, G) registrerer sjøtemperatur ved slaktning. Oppgitt temperatur ved slaktedato for laks levert i prosjektet var 11,5 °C (B) og 11,4 °C (G).
18. Hvor lang tid tar det fra fisken tas opp fra ventemerd til den ligger ferdig pakket som filet i kasse for transport?		Varierer fra 80-90 min (D) til 3 timer (G).

Kommentarene til besvarelsene: Spørreundersøkelsen viser at det er forskjeller i produksjonsrutiner mellom anleggene som kan danne grunnlag for videre undersøkelser knyttet til sammenheng mellom rutiner og holdbarhet laksefilet. Dette gjelder særlig besvarelser knyttet til renhold (spørsmål 8-11) og temperatur i lokalene. Betydningen av å ha flere leverandører og flere typer råvarer i produksjonen, samt rutiner for prøvetaking og evt. tiltak ved overskridelse av grenseverdier er også av interesse.

5.8 Konklusjoner

På bakgrunn av analyser utført på islagret pre-rigor filetert laks fra sju anlegg for å avdekke bakterienivå og bakterieflora samt gjennomført spørreundersøkelse for å kartlegge produksjonsforhold og –rutiner i produksjonsanlegg, kan vi konkludere med følgende:

- **Det er potensial for å oppnå økt mikrobiologisk holdbarhet på pre-rigor filetert, islagret laksefilet.** Det ble påvist lave bakterienivåer i kontrollfileter filetert under optimale hygieniske forhold. Etter 10 dagers lagring hadde alle kontrollfileter lave bakterietall, mens det var høyere bakterietall og variasjoner i bakterienivået i laks filetert i ulike anlegg (se Figur 1, 2, 3).
- **Laksefilet smittes med bakterier gjennom produksjonsprosessen, men graden av smitte varierer mellom ulike anlegg.** Pre-rigor filetert, fersk laks fra ulike anlegg har signifikant forskjellige nivåer bakterier, selv ved kontrollert lagring på is. Lave bakterienivåer ved start gir lave nivåer etter lagring på is (10 dager). Håndbløgget/ sløyd/filetert laks hadde signifikant lavere bakterietall enn laks som hadde gjennomgått en industriell prosess.
- **I anlegg med høyere smittenivå er mikrobiologisk kvalitet dårligere for fileter produsert tidlig på dagen enn senere på dagen.** Dette indikerer overlevelse og/eller oppvekst av bakterier i anlegget når det ikke er i produksjon, inkludert etter renhold.
- **Bakterier som assosieres med forringelse av islagret fisk (*Pseudomonas*, *Shewanella*) dominerer mer på fisk som er prosessert i anlegg tidlig på dagen enn fisk sløyet og filetert**

utenfor anlegget eller filetert sent på dagen. Basert på data fra 10 dagers lagring på is. Dette indikerer at potensielle forringere dominert av bestemte bakterieslekter er til stede i produksjonsutstyret etter renhold og smitter laksen ved prosessering.

- **Ved lagring vil bakteriefloraen på laksen bli dominert av et fåtall bakterieslekter.** Dominans avhenger trolig av nivå av den respektive bakterieslekten som er til stede på laksen før lagring og evne til vekst ved gitt temperatur og i konkurranse med øvrig bakterieflora på laksen.
- **Det er opprettet en unik samling bakterier fra norsk laksefilet, som kan brukes i videre studier.** Nofima har isolert og samlet bakteriestammer som kan benyttes i evt videre hovedprosjekt for å avklare betydningen av bakterieflora på kvalitet og holdbarhet til pre-rigor produsert laksefilet. Det unike ved samlingen er at den dekker flere laksebedrifter og er samlet inn på en standardisert måte.
- **Spørreundersøkelsen viste at det er forskjeller i produksjonsforhold og –rutiner mellom anleggene som kan ha betydning for mikrobiologisk holdbarhet til islagret laksefilet.** Betydningen av aktuelle forhold som bl.a. renhold og temperatur i produksjonslokalet bør undersøkes nærmere. Viktige smittekilder i produksjonsprosessen bør kartlegges.

5.9 Forslag til videre arbeid

På bakgrunn av resultater og kunnskapsbehov identifisert i dette forprosjektet samt momenter som har framkommet i diskusjoner med bransjen og styringsgruppa er det foreslått videreføring av arbeidet i et hovedprosjekt. En første versjon av foreslått videreføring er blitt formulert og diskutert i styringsgruppen. Denne versjonen er på bakgrunn av tilbakemeldinger fra styringsgruppen og prosjektresultater blitt bearbeidet og vil bli presentert for styringsgruppen om kort tid. Forslaget går i korte trekk ut på:

1. Finne ut hvilke bakterier som har størst påvirkning på holdbarhet islagret laksefilet
2. Finne potensiale for økt holdbarhet og ved hvilket nivå forbrukere ikke vil akseptere produktet
3. Finne ut hvor i produksjonsprosessen man vil ha størst effekt av å sette inn ekstra hygieniske tiltak
4. Utarbeide anbefalinger som gir mer målrettet overvåking av hygiene og mikrobiologisk kvalitet rettet mot holdbarhetsfastsettelse

6 Leveranser

Følgende leveranser er gitt/planlagt i prosjektet:

Leveranse	Status
1. Delrapport. Litteraturstudie. State-of-the-art	Lvert 15. juni 2012
2. Sluttrapport med resultater og anbefalinger fra forprosjektet	Lvert 16. april 2013 (denne rapporten)
3. Utarbeidelse av forslag til hovedprosjekt	Under utarbeiding. Forslag sendes FHF/Styringsgruppa innen 10. mai 2013
4. Møter i Styringsgruppa	Telefonmøter avholdt.
5. Innlegg FHF samling Verdikjede Havbruk	Lvert 26. nov. 2012
6. Workshop FHF samling verdikjede havbruk	Lvert 26. nov. 2012
7. Vitenskapelig artikkel	Under vurdering for skriving

7 Generelle kommentarer til forsøksoppsett, analyser og kvalitetssikring

Vi har mottatt laks fra én produksjonsdag fra hvert anlegg. Undersøkelsen vil derfor ikke si noe om variasjon i mikrobiologisk kvalitet over tid ved ulike anlegg. Vi har mottatt laks i perioden juni - september 2012 slik at mulige sesongvariasjoner i liten grad vil avdekkes. Ved å undersøke syv anlegg med stor geografisk utbredelse regner vi likevel med at dataene gir et representativt bilde av status i anlegg som produserer pre-rigor laksefilet.

Prosjektet har benyttet én dyrkingsbetingelse (Long & Hammer vekstmedium ved 15 °C aerob inkubering) for påvisning og kvantifisering av dyrkbare bakterier. Det er velkjent at ikke alle typer bakterier vokser på alle typer medier. Long and Hammer ble valgt da dette er et generelt medium som skal gi vekst av mange typer bakterier og er et ofte valgt standardmedium for analyser av dyrkbar total bakterieflora i fisk. Det kan imidlertid ikke utelukkes at enkelte bakterietyper som har betydning for holdbarhet av islagret laksefilet ikke har vokst opp under valgte betingelser. Analyser for å påvise sammensetningen av bakteriefloraen i fisk ved hjelp av DNA baserte analyser (dyrkingsuavhengige analyser) krever et visst nivå av bakterier i prøvene. Det er kjent problematikk for denne type analyser at både type mat og bakterienivå i prøvene kan vanskeliggjøre analysene. Data fra dyrkingsuavhengige analyser ble derfor oppnådd kun på prøver fra Dag 10. Noen prøver hadde veldig lave bakterieverdier også ved Dag 10 og falt ut av analysen samt at noen prøver var under optimale bakterieverdier. Prøver som falt ut av analysen var kontrollfilet prøver fra anlegg D og H (DK og HK). Prøver under optimale bakterieverdier var D seint (DS), G kontroll (GK) samt alle prøvene fra anlegg E (ET, ES og EK). Disse prøvene ble analysert, men ble ikke optimale grunnet de lave bakterieverdiene. Dette har blitt tatt hensyn til i tolkningen av dataene.

Denne rapporten er kvalitetssikret i henhold til interne rutiner ved Nofima.

Vedlegg

Vedlegg 1: Gjennomføring, oppsett og metoder

Delprosjektet er blitt gjennomført i perioden juni-november 2012. Prosjektet inneholdt følgende aktiviteter (se detaljert beskrivelse under):

- Kontakt med anlegg som produserer pre-rigor laksefilet
- Uttak og forsendelse av laks fra anlegg til Nofima + svare på spørreskjema
- Bestemmelse av bakterienivå og bakterieflora på laksefilet fra ulike anlegg
- Bestemmelse av bakterienivå og bakterieflora på laksefilet etter lagring
 - o Dyrkingsavhengige analyser
 - o Dyrkingsuavhengige analyser
- Databearbeiding og rapport

Kontakt med anlegg for deltagelse og forsendelse av laks

Oversikt over anlegg som produserer pre-rigor laksefilet ble mottatt Styringsgruppen. Åtte anlegg ble deretter kontaktet. Informasjon om bakgrunn, mål og hensikt med prosjektet ble gitt og anleggene ble forespurt om deltagelse i prosjektet. Syv av anleggene ønsket å delta, mens ett anlegg vurderte at de hadde nødvendig kunnskap om dette og dermed ikke viste stor interessert for deltagelse.

Uttak og forsendelse av laks fra anlegg

Fra hvert anlegg ble det tatt ut filet fra to produksjonstidspunkt i løpet av en produksjonsdag, i starten av produksjonen samt senere på dagen (ca kl. 12). (Det var opprinnelig et ønske om tre uttakstider, men dette var ikke praktisk gjennomførbart pga logistikk knyttet til produksjon og forsendelse av laks til Nofima). Fileter ble pakket på is i separate kasser. I tillegg ble laks tatt ut fra ventemerde, manuelt bløgget, avblødet og sløyd. Denne laksen ble ikke eksponert for prosessanlegget og fungerte som hygienisk optimal kontroll i forsøkene. Islagret laks ble sendt Nofima, Ås, og ble mottatt dagen etter produksjonsdag.

Lagringsforsøk og analyser

Ved mottak ble målinger og prøvetaking gjennomført. Temperatur ble målt på overflate filet og sløyd laks. Sløyd laks ble håndfiletert etter beste hygieniske standard. Fra hver filet (4-6 stk fra hvert produksjonstidspunkt per anlegg) + kontrollfileter ble det tatt ut 2 prøver for hhv mikrobiologiske analyser og pH-bestemmelse.

Dyrkingsavhengig analyse for å bestemme bakterieflora

- Fra hver filet ble det skåret ut en bit à 3x10x0,5 cm (dybde) fra halepartiet som tilsvarer NKS (norsk kvalitetssnitt). Det ble benyttet metodikk for å unngå krysskontaminering mellom håndterte fileter. Hver filet ble nummerert.
- Resterende filet ble lagt enkeltvis med plastfilm imellom, lagt tilbake på is i kasser og lagret til dag 10 ved 0-1 °C (Dag 0= produksjonsdag). Temperturlogger ble plassert i hver kasse. Under lagring ble kassen sjekket for is, smeltevann fjernet hvis nødvendig og evt ny is tilført hvis nødvendig.
- Ved dag 10 ble det tatt ut nye prøver fra hver islagret filet som beskrevet over
- Måling av pH (dag 1 og dag 10) av filet ble utført ved bruk av muskelelektrode på filet fra brystparti.
- Ved dag 1 og dag 10 ble totalantall bakterier bestemt. Hver filet ble tilsatt peptonvann og stomachet før ufortynnede og fortynnede løsninger av denne suspensjonen ble platet ut på valgt dyrkingsmedium (Long and Hammer agar). Bakterietall ble bestemt ved kolonitelling av bakterier på skåler etter inkubering av agarskålene ved 15 grader i 6 dager.

Isolering og lagring av bakteriekolonier for bruk i evt. senere lagringsforsøk

- Etter 5 dagers inkubering ble det plukket kolonier fra agarskålene. Dette ble gjort på filet fra alle anlegg, fra begge produksjonstidspunkter (tidlig/sent) og ved både dag 1 og dag 10. Tilsvarende ble gjort for kontrollfilet fra alle anlegg. Alle kolonier eller inntil 8 stk, innen en sone av skåla ble plukket og rendyrket. Disse ble videre lagret ved -80 i 20% glycerol for evt senere belastningsforsøk (se under). Fra hvert anlegg er om lag 200 bakterier blitt lagret.
- Det vil være aktuelt å 16S sekvensere en del av disse for identifisering og senere bruk i belastningsforsøk for å se på forringelse. 16S sekvensering vil primært bli utført etter dyrkingsuavhengig sekvensering og bli utført i et evt. hovedprosjekt.

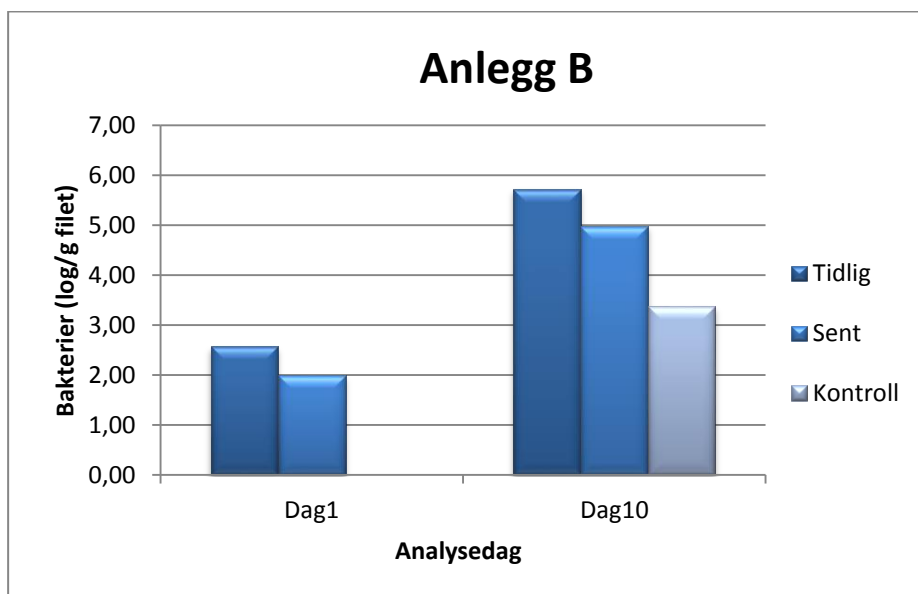
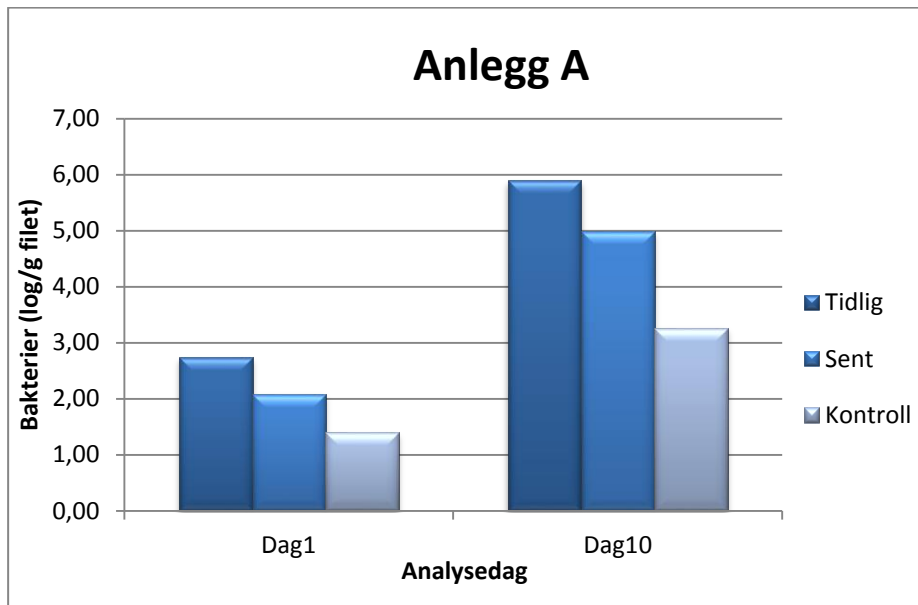
Dyrkingsuavhengige analyser

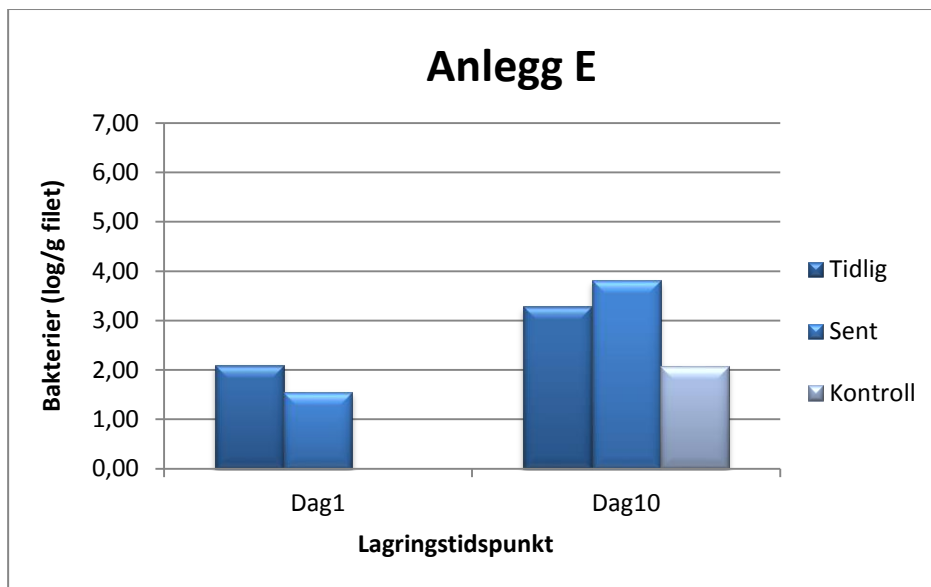
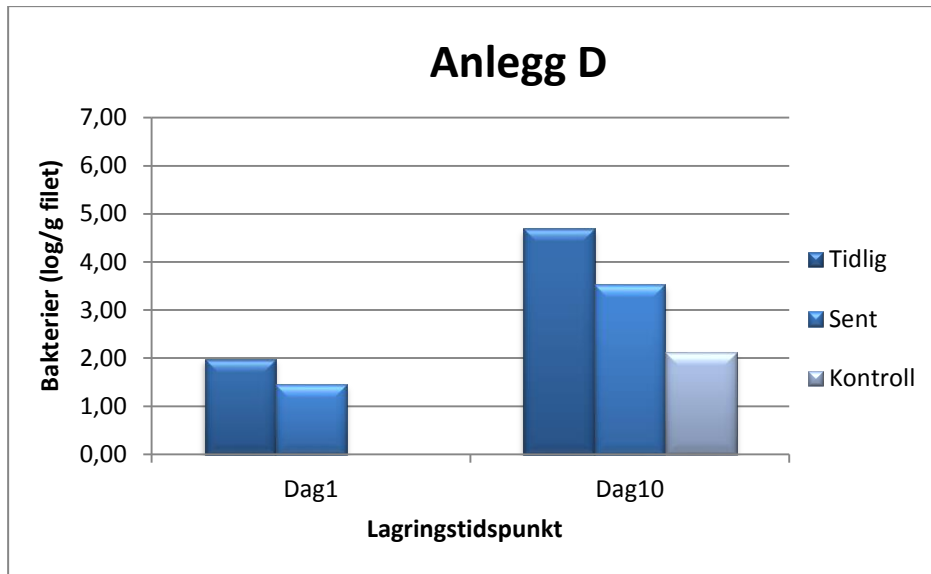
- Prøveuttak for dyrkingsuavhengige analyser ble gjort ved dag 1 og dag 10.
- Dag 1: Det ble benyttet samleprøver av de 4-6 filetene fra hvert uttakstidspunkt slik at filet produsert tidlig og sent på produksjonsdagen ble 2 separate prøver. For hver samleprøve ble det tatt ut og blandet 8-12 ml laksefiletsuspensjon fra hver stomacherpose slik at totalvolumet for hver samleprøve ble 48 ml. Suspensjonen ble filtrert for å fjerne laksematerie og filtratet med bakterier ble oppbevart ved -20 °C inntil senere analyser. Det ble ikke tatt prøve fra kontrollfilet da totaltall bakterier på denne fileten var lavere enn nødvendig antall for å gi prøvesvar.

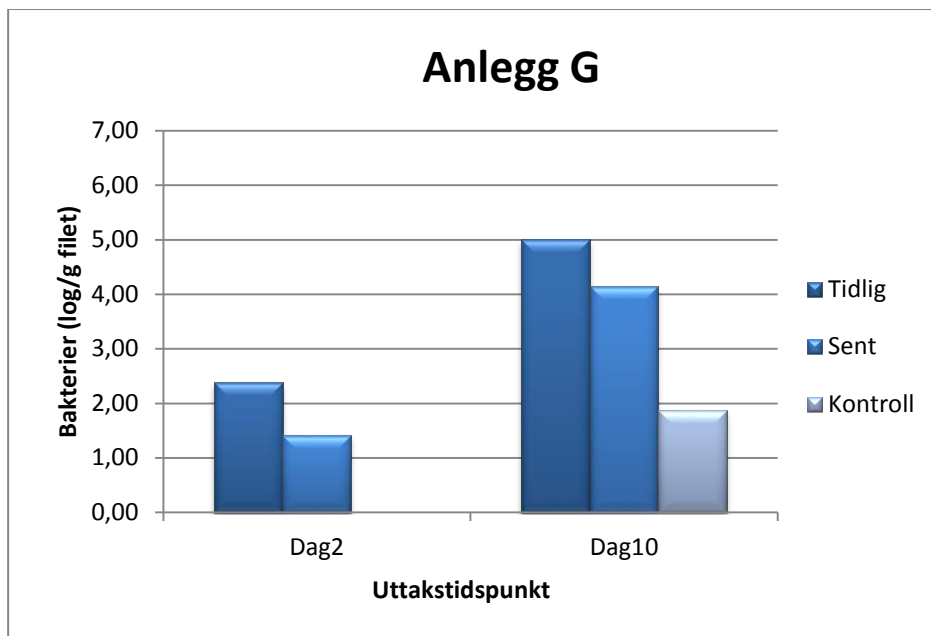
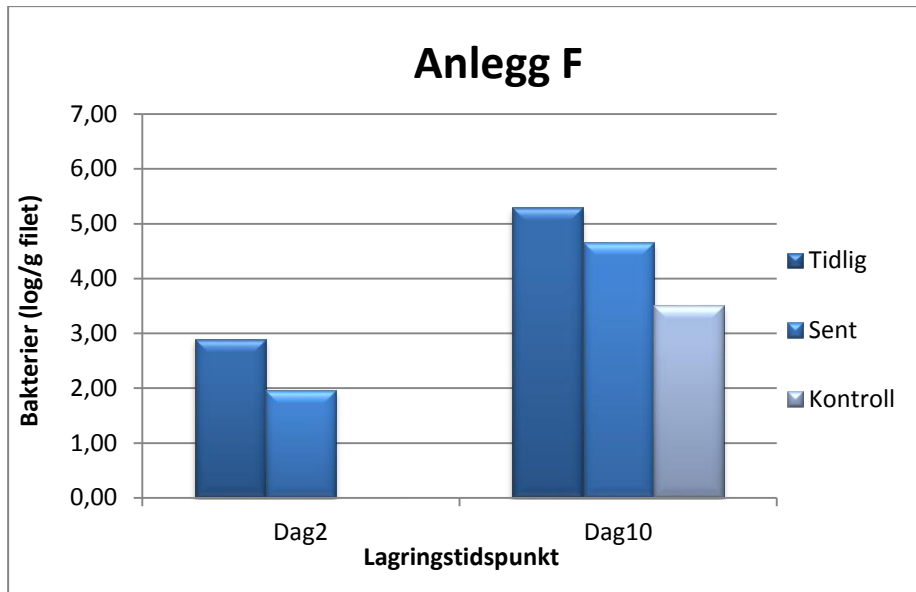
- Dag 10: Som ved dag 1 ble det benyttet samleprøver av de 4-6 filetene fra hvert uttakstidspunkt. I tillegg ble det tatt ut prøver fra kontrollfilet på tilsvarende måte. Dette ga 3 samleprøver (1 for hvert produksjonstidspunkt samt kontrollen) som ble filtrert. Fra hvert filtrat ble det tatt ut 6 ml som ble sentrifugert. Bakteriepelletene ble oppbevart ved -20 °C til seinere DNA rensing. Restfiltratet ble fryst ved -20 °C.
- DNA ble isolert fra bakteriepelletene (Dag 10 prøver) og fryselaagret før PCR og sekvensering for dyrkingsuavhengig bestemmelse av bakterieflora.
- Sekvensering (MiSeq) ble gjennomført på DNA isolert fra bakteriepelletene fra utvalgte prøver fra Dag 10. (Prøvebearbeiding og sekvensering av prøver fra Dag 1 ble forsøkt, men pga lavt celletall ble det ikke oppnådd data.

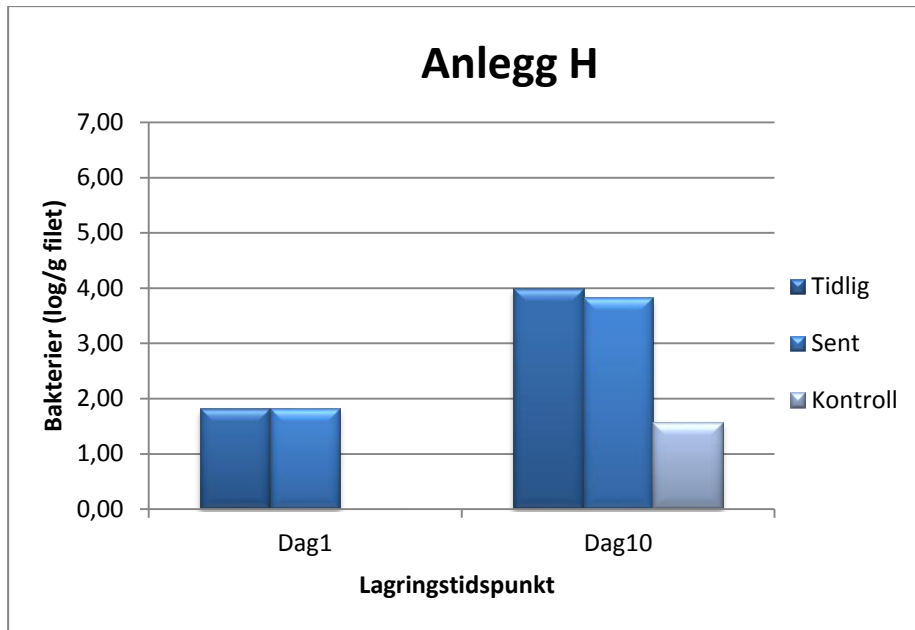
Vedlegg 2: Bakterienivåer i islagret pre-rigor produsert fersk laksefilet fra de ulike anleggene (A-H).

Analysene er utført ved dag 1/dag 2 og dag 10 etter produksjonsdag.









Vedlegg 3: Forekomst av ulike grupper *Pseudomonas* i de ulike prøvene

