

Pastöriseringsöverlevande bakterier – hur elimineras de i mjölkkningsanläggningen?

Christel Benfalk¹, Cecilia Lindahl¹, Mats Gustafsson¹ & Anders Christiansson²

¹JTI – institutet för jordbruks- och miljöteknik, Uppsala

²Svensk Mjölk Forskning, Lund

Bakgrund

Termoduriska (pastöriseringsöverlevande) bakterier i mjölk

Termoduriska bakterier är ett samlingsnamn på grampositiva bakteriegrupper med värmeresistens i varierande grad, såsom mikrokokker, streptokocker, sporbildande bakterier och koryneforma bakterier (Murphy et al., 1999; Hull et al., 1992; Seiler et al., 1984). De tillväxer ofta vid höga temperaturer och kan överleva pastörisering (Flint et al., 2002).

De termoduriska bakteriearter som är vanligt förekommande i mjölkkningsanläggningar och i obehandlad mjölk är *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus* och *Clostridium*. Kontaminering av sporbildande bakterierna *Bacillus*, *Clostridium* och *Micrococcus* kan bero på förorening från jord eller foder. Kontaminering av *Microbacterium* och *Streptococcus* tros främst uppstå i mjölkkningsanläggningen eller på mejeriet (Kikuchi et al., 1996). Kikuchi et al. (1996) studerade bakterieförekomsten i olika delar av mjölkkningsanläggningen för att klargöra var kontamineringen av termoduriska bakterier sker. Studien visade att kontamineringen var påfallande hög på gummipackningen i spenkoppscentralen där det fanns en del mjölkrester p.g.a. bristfällig rengöring. Viss låg kontaminering observerades också i rörledningar och slutenheter innan desinfektion. Graden av kontaminering antas variera beroende på diskings- och desinfektionsrutiner (Kikuchi et al., 1996; Mackenzie, 1973).

Biofilm

En biofilm bildas när celler fäster vid, växer och bildar en koloni på en yta. Det är en typ av överlevnadsmekanism som skyddar och underlättar tillväxten under ogynnsamma förutsättningar, som t.ex. vid turbulenta flöden eller begränsad tillgång på näring (Davey & O'Toole, 2000). Ofta tillverkar cellerna ett slemlager av bl.a. polysackarider, som omger och skyddar kolonin (Flint et al., 2001; Parkar et al., 2001; Marshall, 1992). Denna struktur gör att cellerna blir mer motståndskraftiga mot rengöring och desinfektion jämfört med celler i suspension (Flint et al., 2001; Parkar et al., 2001; Mattila et al., 1990). Bildningen av biofilm beror på substratets sammansättning, tillgång på näring samt flöde, och biofilmens uppbyggnad är troligtvis unik för just den miljö där biofilmen uppkommit (Sutherland, 2001; Stoodley et al., 1997).

Biofilm bestående av termofila bakterier kan snabbt uppstå i sådan omfattning att mjölk som sedan passerar kontamineras genom att celler släpper från biofilmen. Detta är inte minst ett problem vid vidareförädling av mjölk, t.ex. vid tillverkning av mjölkpulver (Flint et al., 2001). Parkar et al. (2003) studerade tillväxtcykeln för biofilm av *Bacillus flavothermus* på rostfria stålbrickor. Resultaten visade att biofilmen tillväxte kontinuerligt till över 10^6 celler/cm² under första 18 timmarna. Efter 30 timmar hade mängden bakterier minskat till 10^2 celler/cm², följt av en ökning igen. Vid 66 timmar sågs ännu

en minskning med påföljande ökning några timmar senare. Troligtvis har varje bakteriestam sin egen tillväxtcykel, men detta har inte närmare studerats.

Flint et al. (2001) studerade bildningen av biofilmer av *Bacillus stearothermophilus* på rostfria ståltytor. Studien visade att sporer fäster vid en yta i högre grad än vad levande celler gör. Flint et al. (2001) visade också att det var upp till 100 gånger fler celler och sporer som fäste på ytan om den först blivit förorenad med mjölk (nedsänkt i pastöriserad mjölk och därefter autoklaverad) jämfört med en ren yta. Föroreningar p.g.a. brister i diskning ökar alltså förutsättningarna för bildning av biofilm.

Problem vid tillverkning av mjölkpulver

De mest värmeresistenta icke sporbildande bakterierna kräver mer än en hel timmes värmebehandling vid 73°C för att decimeras med 90 % (lågpastörisering av mjölk sker vid ca 73°C i 15 sekunder; Svensson et al., 2004). Vid låg temperatur tillverkning (low heat) av mjölkpulver är det omöjligt att höja pastöriseringstemperaturen tillräckligt för att avdöda dessa, eftersom pulveregenskaperna försämras (Kwee et al., 1986). Vid en analys av biofilm från en pastöriseringsanläggning hittades främst grampositiva värmeresistenta bakterier från familjerna *Bacillus*, *Micrococcus* och *Staphylococcus* (Carpentier et al., 1998).

En god bakteriologisk kvalitet på mjölkråvaran är avgörande för att kunna uppnå en acceptabel bakterienivå i mjölkpulver (Luck & Jordaan, 1978). Kvalitetskraven på pastöriserad mjölk i Sverige har ökat på senare tid och 10 000 bakterier/g är nu ett normalt kundkrav mot tidigare 50 000 bakterier/g. För att uppnå detta krav får mjölkråvaran inte innehålla mer än 1 000 pastöriseringsöverlevande bakterier/ml. Pastöriseringsöverlevande bakterier ingår i de bakterier som analyseras i bakterieräkningsprovet (totalantalet bakterier) vid mjölkens kvalitetsbedömning, men de kan inte urskiljas från andra typer av bakterier. För detta krävs en särskild analys som inte kan utföras med Bactoscan-instrumentet, som används vid bedömning av mjölken idag. Det innebär att det, även vid ett lågt totalantal, ändå kan finnas pastöriseringsöverlevande bakterier i nivåer som överstiger 1 000/ml utan att mjölkproducenten är medveten om det. I Skånemejeriers kvalitetsbetalning till leverantörerna har företaget valt att termoresistenta bakterier ska ingå. Valet av gränsvärde för industrimjölk är 5 000 cfu/ml.

Diskning

Pastöriseringsöverlevande bakterier har studerats ingående på 1960-talet och tidigare (Thomas et al., 1967). Då identifierades förhållandena vid diskning av mjölkkningsanläggningen som en viktig faktor (Thomas et al, 1967; Mackenzie, 1973). Det är dock först på 1990-talet som man insett biofilmernas egenskaper och konsekvenser i disk-sammanhang (Carpentier & Cerf, 1993). Termoduriska bakterier som överstiger $2 \cdot 10^2$ cfu/ml och koliforma bakterier som överstiger 10^3 cfu/ml indikerar bristfällig rengöring av utrustningen (Knappstein et al., 2002). Ökad diskningsfrekvens kan vara ett bra sätt att förhindra bildningen av biofilm (Carpentier & Cerf, 1993).

Det finns många olika diskkemikalier på marknaden. Några vanliga huvudkomponenter i dem är:

- Natriumhydroxid (NaOH) som löser protein till småmolekyler som i sin tur har en svag emulgeringseffekt.
- Silikater är ett alternativ till NaOH och ger höga pH.

- Polyfosfater komplexbinder salter så att de inte faller ut på ytorna. De har också en god emulgeringsförmåga och är bra dispergeringsmedel.
- Syror (t.ex. salpetersyra) löser salter men är aggressiva mot många material.
- Hypoklorit är ett utmärkt desinfektionsmedel som dödar sporer, jäst och mögel. (Borgström, 1989)

Eliminering av biofilm underlättas av mekanisk effekt samt oxiderande ämnen, som hypoklorit och väteperoxid (Kumar & Anand, 1998). Klorkombinerade diskmedel skulle därför kunna underlätta borttagandet av biofilm. Sådana diskmedel är dock mindre önskvärda av miljöskäl och utvecklingen går idag mot klorfria medel. Många streptokocker har visat sig vara mycket resistent mot NaOH (Carpentier et al., 1998).

Flint et al. (1999) undersökte ett antal rengöringsmedels förmåga att reducera värmeresistenta streptokocker från rostfritt stål. Studien visade att rengöringsmedel som påverkar proteiner, t.ex. proteolytiska enzymer (1 % trypsin), gav bäst resultat. Rengöring med en kombination av alkali (NaOH), syralösning (HNO₃) och vatten med en temperatur på ca 75°C var inte tillräckligt effektivt för att ta bort biofilmen helt. Testen utfördes både på laboratorium och i en försöksanläggning för pastörisering.

I en liknande studie (Parker et al., 2004) gav rengöring med alkali- och syralösning (NaOH, HNO₃ i 75°C) ett gott resultat på *B flavothermus* i biofilm. Diskningsresultatet är dock helt beroende av att rätt koncentration medel används och att en tillräcklig temperatur kan åstadkommas. Vid diskning av mjölkkningsanläggningen på gården är det praktiskt svårt att hålla samma höga temperatur genom hela systemet.

Parker et al. (2003) visade att ett effektivt sätt att döda och ta bort celler från biofilm var att behandla ytan med kemikalier som angriper biofilmens polysackaridlager. Lysoym avdödade effektivt celler i biofilm. Studien utfördes på termofila *Bacillus*-stammar.

Svensson et al. (2004) har undersökt värmeresistens och avdödnings effekt av diskmedel på ett representativt urval av olika pastöriseringsöverlevande bakterier från svensk leverantörmjolk. Resultaten visar att bakterierna avdödas med lätthet om de befinner sig i suspension, men att mjölkrester ökar överlevnaden. Även bakterier i biofilmer avdödas effektivt inom 10 minuter vid en disktemperatur på 65-70°C, medan effekten inte är tillräcklig vid 42°C. Om det finns mjölkrester kvar försämras avdödnings avsevärt för alkaliska klorkombinerade diskmedel även vid hög temperatur.

I en fältundersökning som gjordes på 46 svenska gårdar undersöktes förekomsten av pastöriseringsöverlevande bakterier och sambandet med diskförhållandena (Christiansson et al., 2003). Gårdar med äldre mjölkkningsanläggning och äldre diskautomat, eller som inte hade diskautomat, var överrepresenterade i gruppen med hög halt pastöriseringsöverlevande bakterier. Anmärkningsvärt nog fanns det även tre stora lösdriftsgårdar (70, 104 respektive 157 kor) med mjölkgrup, varav två med ny utrustning, som hade problem med pastöriseringsöverlevande bakterier.

Syfte

Syftet var att studera effekten av disklösningens sluttemperatur och tid vid diskning av mjölkledning för eliminering av pastöriseringsöverlevande bakterier i biofilm. Dessutom skulle effekten av klor i disklösningen utvärderas. Avsikten var att kunna ge rekommendationer hur en mjölkkningsanläggning bör diskas för att undvika förekomst av pastöriseringsöverlevande bakterier.

Material och metoder



Bild 1. Provtagningsutrustning med ändbrickor av stål.

JTI:s testanläggning, som är stationerad på SLU:s försöksgård Kungsängen, användes för de studier som inte gjordes på labb. I testanläggningen finns 2 riggar med vardera 4 provtagningsbrickor ($d=22\text{mm}$; se bild 1). Varje provtagningsbricka sitter längst ut på ett T-rör d.v.s. det finns 4 T-rör i varje rigg. Rörens längd är 1.0, 1.5, 2.0 och 2.5 x rörets diameter som då utgör i stigande grad svårigheten att rengöra provbrickan under diskning.

Anläggningsinställningar

I början gjordes en del testdiskningar för att ställa in rätt temperatur och diskningstid i anläggningen. Temperaturen mättes med loggrar (TinytagPlus TG 12-0020, Gemini Data Loggers) på olika mätpunkter, bl.a. vid en bricka i riggen och i diskmaskinens behållare. Diskmedlet SU51 användes i de diskstudier där inget annat angivits.

Bakterieodling

Principen för odling av biofilm på testbrickorna är följande: Infrysta bakterier väcks till liv och odlas upp i ett rikt odlingsmedium. Därefter överförs de till ett flytande medium som är rikt på sockerarter (Wirtanen-buljong; Wirtanen et al., 1996). En provbricka läggs i det flytande mediet i en petriskål, varefter bakterierna spontant fäster på ytan och växer till. Efter 4 dygns inkubering tas provbrickan med biofilmen upp, sköljs försiktigt varefter provbrickan placeras i testutrustningen och diskning sker. För att mäta diskeffekten placeras den diskade provbrickan i en neutraliseringsbuffert för att inaktivera disklösningen och därefter svabbas ytan av provbrickorna med en bomullssvabb doppad i peptonvatten. Provröret med svabblösningen värmebehandlas vid 74°C i 15 sekunder, varefter haltbestämning görs på TGA-plattor. Som kontroll svabbas provbrickor med biofilm som inte genomgått diskning. Som testorganism användes framför allt ett bakterieisolat, M95 (*Microbacterium/Celluomonas*), som isolerats av Svensk Mjolk från en gård med höga halter pastöriseringsöverlevande bakterier i mjölken. Denna bakterie hade tidigare fungerat väl i diskförsök i laboriemiljö hos Svensk Mjolk. Trots detta drabbades projektet av oförutsedda problem vid odling på brickorna, samt även vad gäller biofilmens förmåga att hålla sig kvar vid diskning.

Diskningsstudier

En studie kördes för att jämföra SU51 och ett klorfritt diskmedel för att se om resultatet blev samma med ett klorfritt diskmedel. Diskningstemperaturen var antingen 35°C eller 40°C . Två typer av nedsmutsning testades, vilket innebar att mjölk torkades in på brickorna alternativt att brickorna doppades i het mjölk. Dessutom användes olika rörlängder för att få olika långa döda ändar (standard, d.v.s. 1,5 * rörets diameter respektive 10 cm).

Resultat och Diskussion

Första omgången bakterier

Bakterierna var frysta i BHI (Brain Heart Infusion)-buljong med 20 % glycerol. De frysta bakterierna ympades till provrör med BHI-buljong och inkuberades i 30°C, men de första försöken att väcka upp bakterien gick inte bra. Bakterierna växte dåligt vilket visades i form av att rören med BHI-buljong inte blev tillräckligt grumliga. Efter en del experimenterande växte bakterierna ganska bra i BHI, men när de sedan ympades till Wirtanen-buljong (Wirtanen et al., 1996) blev det återigen en mycket svagare tillväxt. Försöken att få bakterierna att bilda biofilm misslyckades trots att försök gjordes att odla dem på brickor i petriskålar, direkt i disktriggen och i e-kolv i 30°C. Brickorna förblev rena och i petriskål sågs en svag film, men den gick lätt att spola bort under vanligt kranvatten.

En trolig förklaring till den svaga tillväxten är att det skett kemiska reaktioner mellan sockerarterna och peptiderna i W-buljongen vid autoklaveringen. W-buljongen mörknade något vid autoklavering vilket tydde på att en reaktion hade skett. Sockerarterna autoklaverades då var för sig och tillsattes när substratet (peptiderna) svalnat. Den nya W-buljongen gjorde ingen större skillnad på bakterietillväxten. Eftersom bakterierna hade bättre tillväxt i BHI-buljongen undersöktes möjligheten att istället använda denna, men med extra socker, som odlingsmedium vid odlingen av biofilm. Odlingen skedde på objektsglas och brickor. Biofilm bildades och försök gjordes att på labb spola med destillerat vatten, dels med mjuk stråle och dels med hård stråle. Med mjuk stråle blev det 10^6 cfu/ml kvar, med hård 10^5 cfu/ml. För att få ett bra resultat vid diskning i testtriggen borde biofilmen vara starkare och därför fortsatte utvecklingen av biofilmen.

Därefter testades en blandning av BHI och W-buljong samt BHI med 10 % extra socker med tanke att bakterierna behövde mer energi för att tillväxa tillfredsställande. En blandning av de två substraten verkade ge en bra tillväxt av biofilm. Försök gjordes därför att odla biofilmen på brickor i riggar som sedan diskades i 35°C i 5 min i JTI:s anläggning på Kungsängen. Olika andelar BHI och W-buljong i blandning testades samt att tillsätta mjölk till buljongen eftersom tidigare försök har visat att biofilmen fäste bättre till ytor om mjölkrester finns med. Efter diskning svabbades brickorna med tops och antalet bakterier bestämdes. Resultatet visade att alla brickor blev rena från bakterier.

Försök gjordes också att odla upp biofilm på olika material (glas, gummi och plexiglas) för att se om biofilmen fäste olika på olika material men detta gav inte heller något resultat.

För att säkerställa att det var en ren kultur och att det var rätt bakterier som växte i biofilmen studerades de i faskontrastmikroskåp. Proven innehöll termoduriska bakterier, så oren kultur kunde inte vara orsaken till att bakterierna inte bildade tillräckligt stark biofilm. Då proven innehöll rätt typ av bakterie kördes en jämförande test på om olika volymer bakteriesuspension tillsattes BHI-buljong - 5% bakteriesuspension jämfört med 1 %. Resultatet visade tyvärr ingen skillnad mellan behandlingarna.

Då erfarenheten och kunskapen säger att mjölk bidrar till en ökad överlevnad av bakterier gjordes tester på om intorkad mjölk eller filmjölk på brickorna före biofilmen

odlades ökade biofilmens styrka. Svaret blev dock att i detta fall gjorde det ingen skillnad.

Andra omgången bakterier

Till slut konstaterades att bakterierna troligtvis inte var tillräckligt livsdugliga längre. Därför skickade Svensk Mjolk upp nya fräscha bakterier, vilkas förmåga att bilda biofilm redan hade testats i labb för att ytterligare optimera odlingsproceduren för biofilmbildning. Bl.a. gjordes de första odlingsstegen på agarplatta och det rekommenderades att starta från fryst kultur vid varje försökstillfälle.

De nya bakterierna var mycket mer livsdugliga. Ytterligare en ny metod användes för att bereda W-buljongen som innebar att sterilfiltrera sockerlösningarna till autoklaverad lösning med LabLemco och nutrient broth. Dessutom tillsattes 1 % mjölk till buljongen. Med den nya blandningen av odlingsmedium bildades tjock biofilm på brickorna. Däremot verkade den inte vilja fästa ordentligt på de rostfria brickor som användes och det blev rent även vid diskning i testanläggningen vid låga temperaturer utan diskmedel.

För att få biofilmen mer tålig testades att, efter uppodlingen av biofilmen, låta brickorna torka i 30°C 2 dygn före diskning med följande variationer:

- öppet utan täckning
- i petriskål med lock
- med brickan i änden på en rörstump (ca 1 dm)

Till en början diskades brickorna i en vanlig diskmaskin i 5 minuter med en temperatur på 45°C utan diskmedel. Det fanns då bakterier kvar och flest bakterier fanns kvar på brickan som torkats öppet utan täckning (10^6 cfu/ml). De andra två behandlingarna resulterade i ett bakterietal på 10^5 cfu/ml vardera.

För att eliminera risken att JTI:s testrigg diskade för bra i jämförelse med de anläggningar som finns ute på mjölkgårdar testades att sätta in brickor med odlad biofilm i den konventionella mjölkansläggningen på Kungsängen, SLU:s försöksgård i Uppsala. Brickorna placerades i t-rör vid returen och i botten på slutenheten i anläggningen. Brickorna diskades i 35°C i 5 minuter med diskmedel. Brickorna blev rena från biofilm och bakterier.

Som konstaterats tidigare var den bästa behandlingen att efter uppodling av biofilm torka brickorna öppet, vilket innebar att odling direkt i riggen inte skulle vara så bra. Eftersom brickan sluter till en packning när den monteras i riggen kommer yttersta kanten på brickan förbli odiskad. Detta ställde till problem vid svabbing eftersom det är svårt att bara svabba den diskade ytan utan att vidröra den del av brickan som suttit mot packningen. För att lösa detta tillverkades nya brickor med en mindre upphöjd cirkel i mitten ($7,3 \text{ cm}^2$) av brickan där svabbing kunde ske.

Eftersom det visade sig att torka biofilmen innan diskning var bra, men tyvärr inte tillräckligt bra för att få till en hållbar biofilm, bestämdes att odla upp biofilmen i 2 omgångar och torka 2 dygn efter varje odling. Detta kunde kanske förstärka biofilmen och efterlikna det naturliga förloppet som de har ute i mjölkanläggningar. Vid diskningen testades två olika behandlingar nämligen, att köra genom mjölk före diskning som nedsmutning eller att bara diska. Diskningen gjordes i JTI:s testrigg i 35°C i 5 minuter med diskmedel SU51. Det visade sig att väldigt få bakterier överlevde.

De preparerade kvarvarande brickorna diskades då i diskmaskin ca 45 minuter med vanligt maskindiskmedel (ca 45°C) och då blev det synliga rester kvar på brickorna. Brickorna färgades in med kristallviolett för att kvalitativt se hur mycket bakterier som fanns kvar på ytan. Efter det gjordes försök att odla upp biofilmen i 4 omgångar och torka 2 dygn efter varje odling för att förstärka biofilmen ytterligare, men detta gjorde ingen skillnad. Ytterligare ett test gjordes där brickorna fick sitta kvar i JTI-riggen i två dygn och under tiden kördes mjölk igenom två gånger per dag för att efterlikna verkligheten i en mjölkkningsanläggning. Därefter diskades anläggningen i 35°C i 5 minuter och resultatet blev rena brickor.

Diskningsstudier

Behandling - brickor i het mjölk

Brickorna lades i mjölk som höll 85°C i 10 minuter och därefter tilläts de torka i 30°C under 2 dygn. Brickorna lades sedan i odlingsmedium i 4 dygn, togs upp och torkades i 2 dygn i rumstemperatur och lades sedan i odlingsmedium igen i 4 dygn och torkades i 2 dygn innan diskningsstudien startade. Följande behandlingar gjordes:

- Diskningstemperatur 35 °C i 5 minuter med SU51
- Diskningstemperatur 40 °C i 5 minuter med SU51
- Diskningstemperatur 35 °C i 5 minuter med det klorfria diskmedlet
- Diskningstemperatur 40 °C i 5 minuter med det klorfria diskmedlet

Resultatet visas i tabell 1 och slutsatsen är att det inte fanns några större skillnader i bakterieförekomst (termoduriska) när olika temperaturer, diskmedel eller rörlängder användes. Skillnaderna är helt enkelt för små.

Tabell 1. Antal termoduriska bakterier uppodlade på brickor för de olika behandlingarna.

SU51	35°C		40°C	
Rörlängd	cfu/ml	cfu/cm²	cfu/ml	cfu/cm²
Kort rör (standard1)	0	0	Fåtal	Fåtal
Kort rör (standard2)	2,2*10 ²	3,9*10 ²	1,9*10 ²	3,4*10 ²
Långt rör (10 cm)	0	0	3,4*10 ²	6,0*10 ²
Klorfritt diskmedel	35°C		40°C	
Rörlängd	cfu/ml	cfu/cm²	cfu/ml	cfu/cm²
Kort rör (standard1)	Fåtal	Fåtal	1,5*10 ²	2,7*10 ²
Kort rör (standard2)	5,6*10 ²	9,9*10 ²	7,5*10 ²	1,3*10 ³
Långt rör (10 cm)	0	0	1,3*10 ³	2,4*10 ³

Behandling - uppvärmda brickor i mjölk

Brickorna lades i mjölk i 15 minuter och därefter värmdes brickorna till 80°C under 2 timmar. Brickorna lades sedan i odlingsmedium i 4 dygn, togs upp och torkades i 2 dygn i 30°C och lades sedan i odlingsmedium igen i 4 dygn för att torkas 2 dygn innan diskningsstudien startade.

- Diskningstemperatur var 35 °C i 5 minuter med det klorfria diskmedlet.
- Diskningstemperatur var 35 °C i 5 minuter med SU 51.

Resultatet visas i tabell 2 och slutsatsen är att det inte fanns några större skillnader i antal termoturiska bakterier, varken när olika typer av diskmedel eller rörlängder användes. Det går inte säkert säga att det något högre antalet bakterier beror på det klorfria diskmedlet, eftersom de olika behandlingarna (typ av diskmedel) inte kördes vid ett och samma tillfälle (fler upprepningar behövs).

Tabell 2. Antal termoturiska bakterier på brickor efter disk med två olika diskmedel

	Rörlängd	cfu/ml	cfu/cm ²
SU 51	Kort rör (standard1)	6,2*10 ²	1,1*10 ³
	Långt rör (10 cm)	Fåtal	Fåtal
	"Jättelångt" rör (15 cm)	Fåtal	Fåtal
Klorfritt diskmedel	Kort rör (standard1) 1	3,3*10 ⁴	5,8*10 ⁴
	Långt rör (10 cm) 1	1,9*10 ⁴	3,4*10 ⁴
	"Jättelångt" rör (15 cm) 1	3,4*10 ⁴	6,1*10 ⁴

¹ Dessa prover kördes vid ett tidigare försök

Ytprover i mjölkningsanläggning från en skånsk gård

Biofilmsprover samlades från en mjölkningsanläggning på en gård med konstaterat högt antal termoturiska bakterier i mjölken. Prover togs på flera ställen i anläggningen: tankens bakre och främre vägg, omröraren, spenkoppscentralen samt toppen på slutenheten. Dessutom togs två mjölkprover vars innehåll av termoturiska bakterier konstaterats överstiga 100 000 bakterier/enhet. Proverna odlades ut genom ytstrykning på BHI-agar och ett flertal renstryk gjordes från kolonier med olika utseende och frystes sedan in.

Bakterierna väcktes upp och testades om de var grampositiva eller negativa med hjälp av KOH-test. De grampositiva bakterierna har en kraftigare cellvägg än de gramnegativa och har därför en högre motståndskraft mot t.ex. värme. Bakteriernas värmeresistens testades också för att säkerställa att de tålde pastörisering, d.v.s. en upphettning till 75°C.

Tre grampositiva bakteriekulturer plockades ut för biofilmsodling och diskning, en från tankens bakre vägg, en från omröraren och en från toppen på slutenheten. Bakteriekultureerna väcktes upp enligt samma förfaringssätt som tidigare. Därefter ympades bakterierna i Wirtanen-buljong med 1 % mjölk och buljongen hälldes i petriskålar med rostfria stålbrickor i. Petriskålarna inkuberades i 30°C i 4 dygn. Därefter tömdes buljongen ut och brickorna torkades i 30°C i 2 dygn. Biofilmsodlingen upprepades ännu en gång med påföljande torkning 2 dygn.

Brickorna med biofilm diskades sedan i diskanläggningen. Fyra diskningar samt en sköljning (kontroll) gjordes:

- 35°C, 5 min med klorfritt diskmedel
- 35°C, 5 min med SU51
- 45°C, 5 min med klorfritt diskmedel
- 45°C, 5 min med SU51

Två brickor per rigg användes vid varje diskning. I ena riggen satt brickorna i T-rör dels 1,5*diametern på röret (motsvarar samma disk som i röret) och dels i änden på ett 10

cm långt t-rör. I den andra riggen placerades brickorna i 1,5*diametern på röret samt 2,5*diametern på röret.

Brickorna såg, för ögat, rena ut både efter enbart sköljning och efter diskning, bortsett från några få undantag där det gick att ana enstaka rester. Ingen utav de utvalda bakteriernas biofilm verkade alltså tåla vare sig sköljning eller diskning och odling visade att det i princip inte fanns några levande bakterier kvar på brickorna.

Eftersom det inte finns några överlevande bakterier kvar ens efter sköljningen så går det inte att säga något om hur diskmedlet påverkat bakterierna. Den mekaniska påverkan av vattenflödet har gjort att bakterierna tappat taget. Likaså klarar bakterierna av den temperatur som de utsatts för eftersom i processen har ett pastöriseringssteg körts innan odling (75°C).

Slutsatser

Projektet har stött på betydande metodproblem som inte kunde förutses vid projektstarten. Tester har gjorts med olika diskmedel, olika bakterier, temperaturer, tider för att bygga upp en lämplig biofilm som placerats i mer eller mindre svåråtkomliga områden. En fin tjock biofilm etablerades på brickorna efter ett tidsödande optimeringsarbete, men tyvärr verkade den inte lyckas fästa tillräckligt hårt till underlaget. Det kan finnas flera orsaker till detta:

- Vi har helt enkelt inte använt oss av en bra bakteriestam. Det som talar emot detta är att ytterligare 3 isolat från en färsk biofilm i en mjölk tank gav samma resultat som teststammen M90. Samma stam fungerade också väl i laborieförsök och bedömdes som representativ.
- Vi har trots många försök inte lyckats reproducera en biofilm i samma fysiologiska tillstånd som den föreligger i verkligheten. Biofilmer byggs troligen upp under lång tid i en anläggning under påverkan av vätskeflöde och kan bestå av flera bakteriearter som samverkar. Detta kan påverka både hur lätt biofilmen släpper från underlaget och hur pass resistent den blir.
- Den turbulens och värmeöverföring som sker i testanläggningen såväl som i en konventionell anläggning var tillräcklig för att eliminera biofilmerna. Detta skulle kunna tyda på att biofilmen vid problem i en mjölkkningsanläggning sitter mera svåråtkomlig än i testsystemet. Hygienisk design och svåråtkomlighet/frånvaro av tillräckligt flöde skulle kunna förklara skillnaderna. Detta bör undersökas vidare i fältstudier.
- För att kunna utvärdera diskeffekt i en mjölkkningsanläggning krävs en mera robust bakterie som inte kräver lika komplicerade odlingsförhållanden. Ett alternativ skulle kunna vara att använda sig av *Bacillus cereus*-sporer som fäster väl på ytor och är kraftigt resistenta mot värme.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

Christiansson, A. Kärnfullt nr 4 (2005). Diska ofta.

Christiansson A. Kärnfullt nr 19 (2006). Disk och uttorkning hämmar sporer.

Hygiene workshop med JTI, Svensk Mjölk och DeLaval 25/5 2005 vid JTI. A) Presentation of a cleaning study made at different types of AMS installations (M. Gustafsson och C. Benfalk), B) Thermotolerant bacteria in milking installations (A. Christiansson)

Benfalk, C. & Gustafsson, M. Bakterier i mjölk överlever pastöriseringen. 2004. JTI Informerar nr 105.

Referenslista

- Borgström, U. 1989. Disk- och desinfektionsmedel i samband med mjölkproduktionen och i mejeriledet. Nordisk Mejeriindustri 16(9), 430-432.
- Carpentier, B.; Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. Journal of Applied Bacteriology 75, 499-511.
- Carpentier, B.; Wong, A.C.L.; Cerf, O. 1998. Bulletin/International Dairy Federation 329, 32-35.
- Davey, M.E.; O'Toole, G. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 64, 847-867.
- Flint, S.H.; Brooks, J.D.; Bremer, P.J.; Walker, K.; Hausman, E. 2002. The resistance to heat of thermo-resistant streptococci attached to stainless steel in the presence of milk. Journal of industrial microbiology and biotechnology 28, 134-136.
- Flint, S.H.; van den Elzen, H.; Brooks, J.D.; Bremer, P.J. 1999. Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonising stainless steel. International dairy journal 9, 429-436.
- Flint, S.H.; Palmer, J.; Bloemen, K.; Brooks, J.D.; Crawford, R. 2001. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. Journal of applied microbiology 90, 151-157.
- Hull, R.; Toyne, A.; Haynes, I.; Lehmann, F. 1992. Thermophilic bacteria: a re-emerging problem in cheesemaking. The Australian Journal of Dairy Technology 47, 91-95.
- Kikuchi, M.; Matsumoto, Y.; Sun, X.M.; Takao, S. 1996. Incidence and significance of thermophilic bacteria in farm milk supplies and commercial pasteurized milk. Animal science and technology (Jpn) 67 (3), 265-272.
- Knapstein, K.; Reichmuth, J.; Suhren, G. 2002. Influences on bacteriological quality in milk in herds using automatic milking systems and experiences from selected German farms. In: The first North American Conference on Robotic Milking. Toronto, Canada, sid. V:13-V:24.
- Kumar, G.C.; Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology 42, 9-27. 47, 91-94.
- Kwee, W.S.; Dommert, T.W.; Giles, J.E.; Smith, R.A.D.; Roberts, R. 1986. Microbiological parameters during powdered milk manufacture. 2. Relationships and predictability among counts. The Australian Journal of Dairy Technology 41, 6-8.
- Luck, H.; Jordaan, I. 1978. Bacterial content of milk powder. South African journal of dairy technology 10, 91-96.
- Mackenzie, E. 1973. Thermophilic and psychrotrophic organisms in poorly cleaned milking plants and bulk milk tanks. Journal of Applied Bacteriology 36, 457-463.
- Marshall, K.C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. ASM News 58(4), 202-207.
- Mattila, T.; Manninen, M.; Kyläsiurola, A.-L. 1990. Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. Journal of Dairy Research 57, 33-39.
- Murphy, P.M.; Lynch, D.; Kelly, P.M. 1999. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. International Journal of Dairy Technology 52, 45-50.
- Parkar, S.G.; Flint, S.H.; Brooks, J.D. 2003. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli – potential consequences for cleaning. J Ind Microbiol Biotechnol 30, 553-560.
- Parkar, S.G.; Flint, S.H.; Brooks, J.D. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. Journal of Applied Microbiology 96, 110-116.
- Parkar, S.G.; Flint, S.H.; Palmer, J.S.; Brooks, J.D. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. Journal of Applied Microbiology 90, 901-908.
- Seiler, H.; Stör, S.; Busse, M. 1984. Identification of coryneform bacteria isolated from milk immediately after heating and following refrigerated storage. Milchwissenschaft 39, 346-348.
- Stoodley, P.; DeBeer, D.; Lappin-Scott, H.M. 1997. The influence of electrical fields and pH on biofilm structure as related to the bioelectric effect. Antimicrob Agents Chemother 41, 1876-1879.
- Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147, 3-9.
- Svensson, B.; Ekelund, K.; Christiansson, A. 2004. Pastöriseringsöverlevande bakterier i leverantörsmjolk. Svensk Mjolk forskning. Rapport under utarbetande.
- Thomas, S.B.; Druce, R.G.; Peters, G.J.; Griffiths, D.G. 1967. Incidence and significance of thermophilic bacteria in farm milk supplies: a reappraisal and review. Journal of Applied Bacteriology 30, 265-298.
- Wirtanen, G.; Husmark, U.; Maatila-Sandholm, T. 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. Journal of Food Protection 59(7), 727-733.