



PX20099

Behandling av frö med väteperoxid

Delrapport i projekt: Mikrobiologisk riskbedömning -
grönsakskedjan

Pernilla Arinder

November 2013

Projektinformation

Studien är en del av projekt Dnr 19-666/12 - Mikrobiologisk riskbedömning – grönsakskedjan som delvis finansierats av Jordbruksverket.

Projekt påbörjat

September 2013

Projektledare

Pernilla Arinder

Projektgrupp

Lisbeth Märs
Pernilla Arinder

Nyckelord

Väteperoxid, frö, *E. coli*, Salmonella

Sammanfattning

I samband med odling, lagring och förädling av grönsaker har bakterier möjlighet att kontaminera, överleva och tillväxa i och på produkten. Flera olika typer av bakterier har orsakat sjukdom som kopplats till konsumtion av groddar. *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, verotoxinproducerande *Escherichia coli* (CCFRA 2004).

Kontaminerade fröer kan vara en smittkälla för grönsaker. Den tidiga smittan via frö är särskilt viktig för groddar där tillväxt kan ske under produktion och hela batcher kan kontamineras. Kontaminerade fröer i annan odling kan dels orsaka att växten från det enskilda fröet kontamineras, men kontamineringen kan även spridas via vatten i odlingen. Efter skörd kan bakterierna spridas vidare via korskontamination.

Väteperoxid är en metod som används för dekontaminering av fröer. Väteperoxid har en oxiderande effekt och det är detta som ligger till grund för väteperoxids antimikrobiella effekt. I denna studie har olika koncentrationer och behandlingstider som anses relevanta för behandling av frö utifrån att grobarheten inte skall påverkas för mycket undersökts avseende avdödande effekt av *E. coli* och *Salmonella* på solrosfrö, vitlöksfrö och rödbetsfrö.

Behandling med väteperoxid i de undersökta halterna, 0,2-5,0 % och behandlingstiderna, 5-60 minuter kan leda till minskning av halten *E. coli* och *Salmonella* på frö. Hur stor reduktionen som erhålls beror på frösor. Resultaten visade större reduktion på rödbetsfrö än på solrosfrö och vitlöksfrö. På solrosfrö var minskningen är maximalt 2 logenheter och på vitlöksfrö maximalt 1 logenhet beroende på koncentration och behandlingstid. Reduktionen var däremot ca 4 logenheter på rödbetsfrö. Vid behandling med 5 % väteperoxid i 60 minuter

Hur stor reduktion som är tillräcklig beror på hur höga halter som kan finnas på fröerna före tvätt och behandlingen. Det är viktigt att fröerna tillverkas under mycket goda förhållanden för att den reduktion som fås av behandlingarna skall räcka.

Om 100g frö används till en odlingsbädd så bör halten efter reduktion vara mindre än en sjukdomsframkallande bakterie per 100g. Det innebär att om reduktionen under behandling av frö är 1 logenhet så bör enbart 1 sjukdomsframkallande bakterier finnas per 10 g frö från början före behandlingen.

Det är viktigt att utvärdering av behandling görs på frön som ympats med aktuella bakterier och inte enbart i suspensionstester. Bakterierna reducerades betydligt mindre på frö än i suspension.

Studien är en del av projekt Dnr 19-666/12 -Mikrobiologisk riskbedömning – grönsakskedjan som delvis finansierats av Jordbruksverket.

INNEHÅLL

PROJEKTINFORMATION.....	2
SAMMANFATTNING.....	3
BAKGRUND.....	5
MÅL.....	5
PROJEKTUPPLÄGG OCH GENOMFÖRANDE.....	6
BAKTERIESTAMMAR.....	6
SUSPENSIONSTEST.....	6
TEST PÅ YMPADE FRÖ.....	6
RESULTAT OCH DISKUSSION.....	7
SUSPENSIONSTEST.....	7
TEST PÅ YMPADE FRÖ.....	9
HUR MYCKET BEHÖVER BAKTERIEHALTEN PÅ FRÅN REDUCERAS?.....	12
SLUTSATSER.....	12
REFERENSER.....	13

SR 869

Bakgrund

I samband med odling, lagring och förädling av grönsaker har bakterier möjlighet att kontaminera, överleva och tillväxa i och på produkten. Flera olika typer av bakterier har orsakat sjukdom som kopplats till konsumtion av groddar. *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, verotoxinproducerande *Escherichia coli* (CCFRA 2004).

Kontaminerade fröer kan vara en smittkälla för grönsaker. Den tidiga smittan via frö är särskilt viktig för groddar där tillväxt kan ske under produktion och hela batcher kan kontamineras. Kontaminerade fröer i annan odling kan dels orsaka att växten från det enskilda fröet kontamineras, men kontamineringen kan även spridas via vatten i odlingen. Efter skörd kan bakterierna spridas vidare via korskontamination.

Som ett steg för att minska sannolikheten för att sjukdomsframkallande bakterier kontaminerar odlingen av grönsaker såsom skott så behandlas fröer före odlingens start. I dag används olika metoder för att behandla fröer för framförallt för tillverkning av groddar. I USA behandlas groddar med 20 000 ppm kalciumhypoklorit i 15 minuter (CCFRA 2004). Fett et al 1998 rapporterade enligt CCFRA 2 logenheters reduktion av *E. coli* O157 då frö ympats med ca 6 log CFU/g då behandling i 10 minuter gjordes med 2 % natriumhypoklorit och med 4 logenheter då behandling gjordes med 2,5–3,0 %. Det finns många studier där effekten av olika klorföreningar undersökts avseende inaktiverande effekt. Andra tekniker för behandling av frö som studerats är: värme, ozon, strålning och kombinationer av olika behandlingar. Den avdödande effekten varierar mellan allt från en till sju logenheter (Ding et al 2013). Värmebehandling av fröer med 80°C i 2 minuter har lett till reduktion av salmonella med 6 logenheter (Weiss & Hammes 2003). Hur omfattande behandling som kan utföras för att reducera sjukdomsframkallande bakterier på frö beror dock på hur behandlingen påverkar grobarheten för fröna. Försök har även gjorts med tillsats av bakteriofager för att inaktivera salmonella. Studien visade att det finns en potential för bakteriofager, men vidare studier behövs för att verifiera detta (Björkehog 2012).

Väteperoxid är en metod som används för dekontaminering av fröer. Väteperoxid har en oxiderande effekt och det är detta som ligger till grund för väteperoxids antimikrobiella effekt. 2-3 logenheters reduktion av salmonella på olika frö har rapporterats vid behandlig 1-8% väteperoxid (Beuchat 1997; Piernas and Guiraud 1997; Weissinger & Beuchat 2000).

I denna studie har olika koncentrationer och behandlingstider som anses relevanta för behandling av frö utifrån att grobarheten inte skall påverkas för mycket undersökts avseende avdödande effekt av *E. coli* och *Salmonella* på solrosfrö.

Studien är en del av projekt Dnr 19-666/12 - Mikrobiologisk riskbedömning – grönsakskedjan som delvis finansierats av Jordbruksverket.

Mål

Utvärdera avdödande effekt av väteperoxid på *E. coli* och *Salmonella* som ympats in på solrosfrö, rödbetsfrö och vitlöksfrö.

Projektupplägg och genomförande

Bakteriestammar

I försöken studerades *E. coli* och *Salmonella*. *E. coli* ympades in som en mix av tre stammar (SIK 304, SIK 326 och SIK 586). *Salmonella* ympades in som enskild stam (*S. typhimurium* SIK 565). Före försöken odlades stammarna upp var för sig över natt i Nutrient broth vid 37°C. De olika stammarna av *E. coli* blandades i en mix innan de användes i försöket.

Suspensionstest

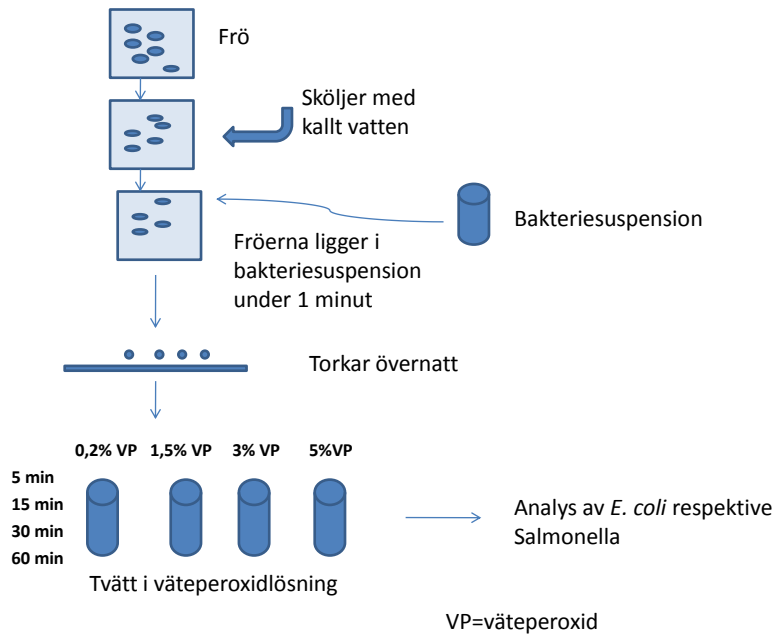
I ett förförsök med enbart bakterier och olika koncentrationer av väteperoxid ympades 1 ml av de upplade bakterierna till 21 ml med peptonvatten med väteperoxid i koncentrationerna 0,2, 1,5, 3 och 5%. Efter 5, 15, 30 respektive 60 minuter togs prov ut och halten bakterier analyserades med plattspridning (TSA, 37°C).

Test på ympade frö

Frö spolades i kallt vatten och fick torka i sterilbänk, varefter de fördelades i skålar, 150g frö per skål.

Fröerna ympades med *E. coli* respektive *Salmonella* (figur 1). Ympningsmetoden bygger på metod som beskrivits av Beauchat 1996. Bakterierna odlades på agar och slammades upp i fysiologisk koksaltlösning till 55 % transmittans.

Bakteriesuspensionen späddes 10 ggr. 225ml av den spädda bakteriesuspensionen hölls på 150g frö. De tre stammarna av *E. coli* tillsattes som en mix och *Salmonella* tillsattes för sig. Blandningen fick stå i 1 minut varefter fröerna hölls ut på gasväv i LAF-bänk där de fick torka över natt. Fröerna tvättades med kallt vatten och diskmedel. De fördelades därefter i burkar med olika koncentrationer av väteperoxid (0,2, 1,5, 3 och 5 %). 17-18g frö till 50ml väteperoxidlösning (25°C). Efter de olika tvättiderna, 5, 15 30 och 60 minuter hölls fröerna över i en tratt med gasväv och sköljdes med kallt vatten. Proverna homogeniserades med peptonvatten och bakteriehalten analyserades (TSA, 37°C).

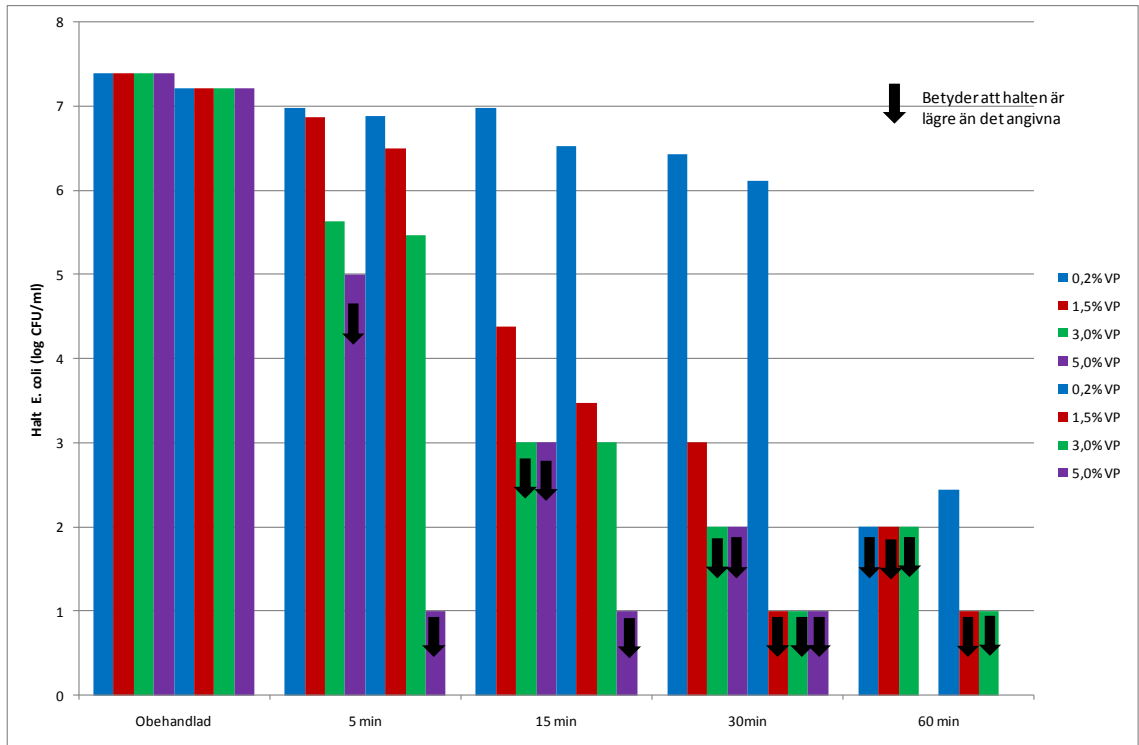


Figur 1. Illustration över försöksupplägg.

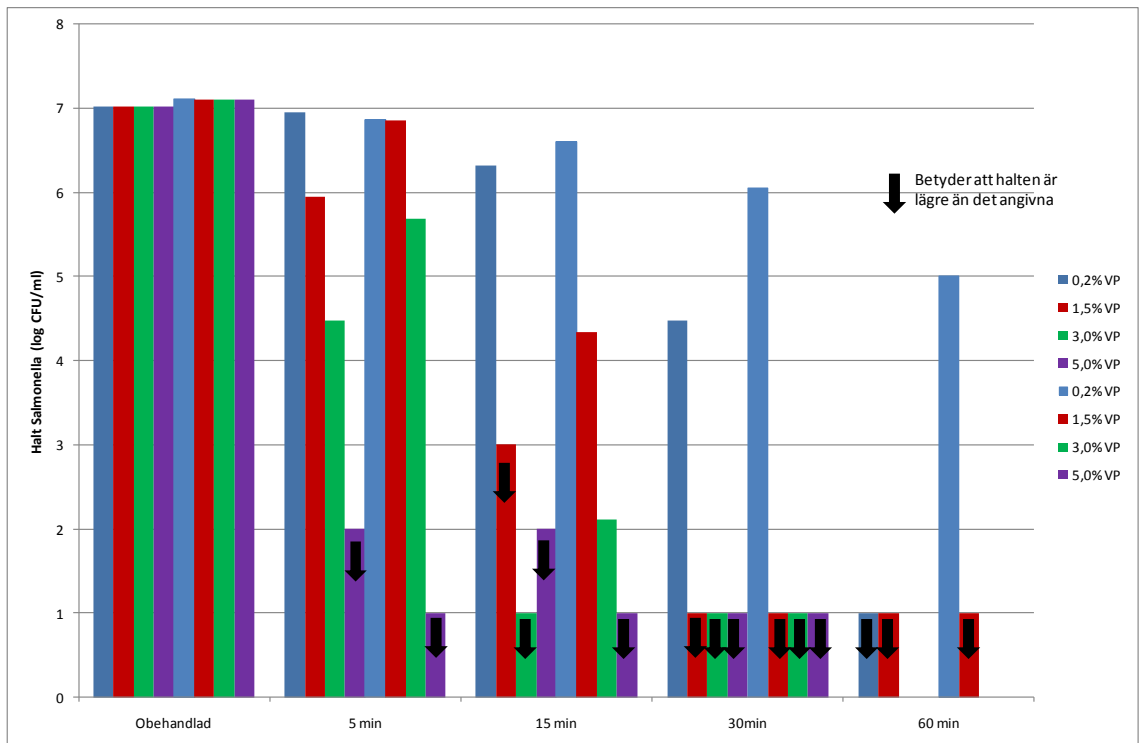
Resultat och diskussion

Suspensionstest

I det första försöket som gjordes tillsattes bakterierna till vattenlösningar av väteperoxid utan att först ha ympats på frö. Då väteperoxidkoncentrationen var 0,2 % skedde i princip ingen reduktion av varken *E. coli* eller *Salmonella*. Då koncentrationen var 1,5 % väteperoxid reducerades *E. coli* med ca 3 logenheter under behandling i 15 minuter och med mer än 3 logenheter av *Salmonella* (figur 2 och 3). Högre halt av väteperoxid och längre behandlingstid resulterade i större avdödning. Avdödningen varierar mellan de två försökstillfällena som illustreras som två olika staplar per behandlingstid och behandlingskoncentration.



Figur 2. Halt *E. coli* före behandling och efter behandling med 0,2, 1,5, 3,0 och 5,0 % väteperoxid i 5, 15, 30 och 60 minuter.



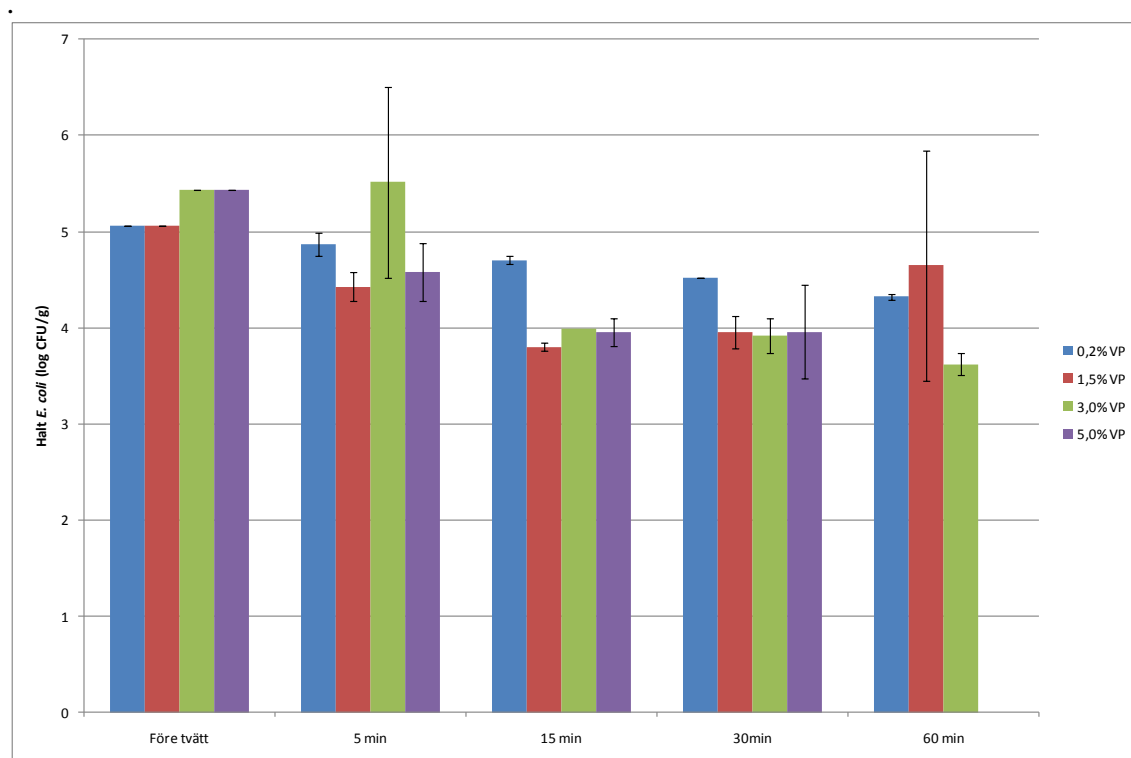
Figur 3. Halt *Salmonella* före behandling och efter behandling med 0,2, 1,5, 3,0 och 5,0% väteperoxid i 5, 15, 30 och 60 minuter.

Test på ympade frö

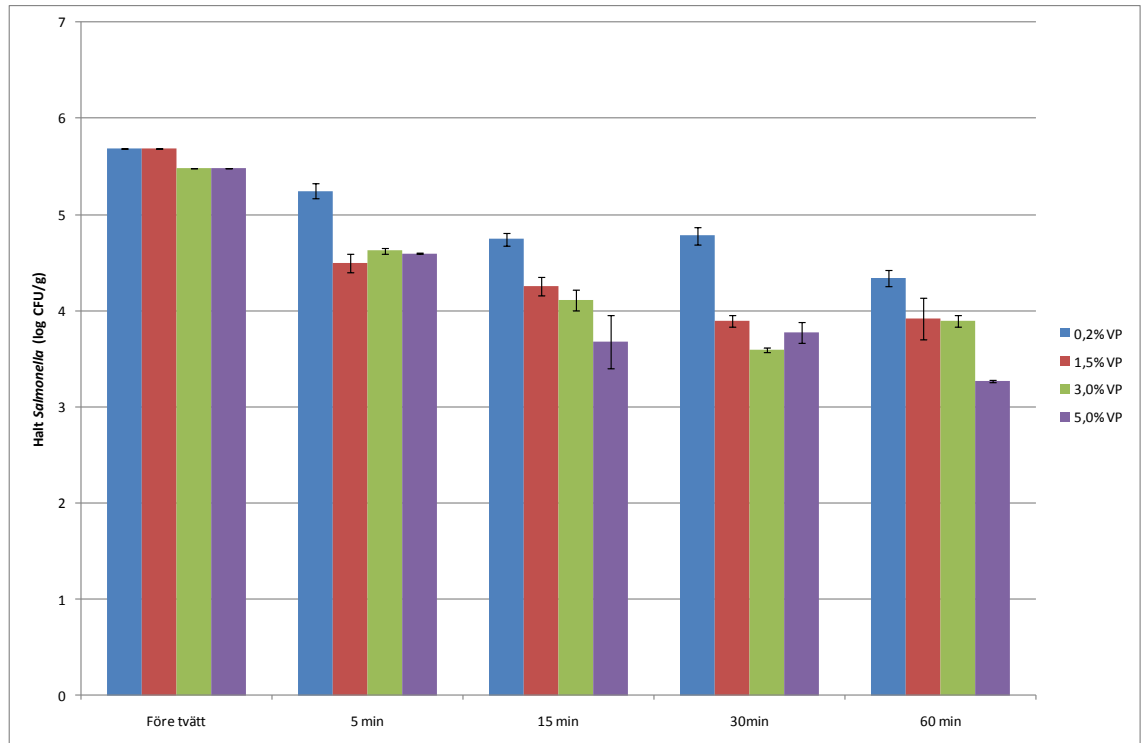
I det andra försöket där bakterierna ympades på fröerna och de ympade fröerna behandlades med väteperoxid reducerades antalet *E. coli* och *Salmonella* inte lika mycket som då bakterierna inte var fästa på frö i det första försöket (figur 4 och 5).

E. coli reducerades med 1 logenhet då solrosfrö behandlades minst 15 minuter med 1,5 % väteperoxid. Försöket är utfört två gånger och resultaten visas som medelvärde av dessa. Det kan dock förekomma större variation i verkligheten än vad som syns i försöken. Behandlingen med 1,5 % i 60 minuter visade stor variation och inte så mycket reduktion. Ingen av de undersökta behandlingarna av solrosför resulterade i mer än 1 logenhets reduktion av *E. coli*. 60 minuters behandling med 5 % undersöktes dock inte avseende avdödning av *E. coli*. *Salmonella* reducerades något mer än *E. coli* under försöket. 2 logenheters reduktion mättes upp då behandlingen var 60 minuter i 5 % väteperoxid.

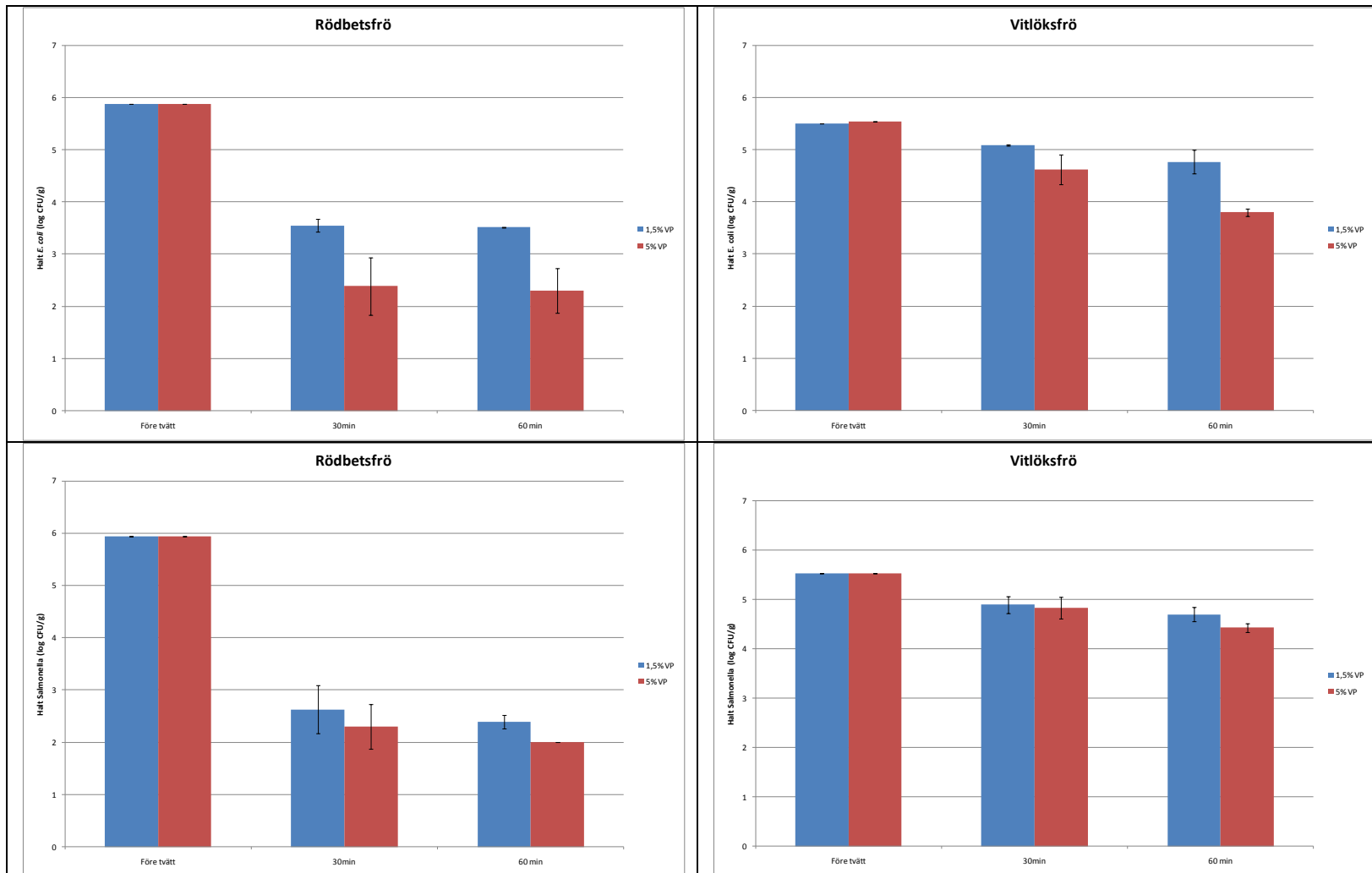
Då ympade vitlöksfrö behandlades med 5 % väteperoxid i 60 minuter mättes ca: 1 logenhets reduktion för *E. coli* och *Salmonella* (figur 6). Då rödbetsfrö behandlades mättes däremot en betydligt större reduktion. Reduktionen var ca 4 logenheter då fröna behandlades med 5% väteperoxid i 60 minuter (figur 6).



Figur 4. Halt *E. coli* på solrosfrö före behandling och efter behandling med 0,2, 1,5, 3,0 och 5,0% väteperoxid i 5, 15, 30 och 60 minuter.



Figur 5. Halt *Salmonella* på solrosfrö före behandling och efter behandling med 0,2, 1,5, 3,0 och 5,0% väteperoxid i 5, 15, 30 och 60 minuter.



Figur 6. Halt *E. coli* och *Salmonella* på solrosfrö före behandling och efter behandling med 1,5 och 5,0 % väteperoxid i 30 och 60 minuter.

Hur mycket behöver bakteriehalten på frön reduceras?

Totalantalet bakterier på de solrosfrön som användes i försöket var 4 log CFU/g. Vilken typ av bakterier det var undersöktes ej. Om vi antar att alla bakterierna skulle vara *E. coli* eller *Salmonella* och behandlingen med väteperoxidtvätt resulterar i 1 logenhets reduktion så skulle halten efter behandling vara 3 log CFU/g och om reduktionen var 4 logenheter så skulle halten efter behandling vara 1 CFU/g frö.

Hur stor reduktion som krävs beror på hur hög halt av den aktuella bakterien det finns från början i fröet och hur stor sannolikhet för kontaminerad produkt som kan accepteras. Om ingen korskontaminering i odlingsystemet finns utan enbart plantan till fröet kontamineras så är kontaminationen begränsad till den plantan. Om det i odlingsbetingelserna är risk för tillväxt av bakterien och spridning med vatten så kan bakterien spridas vidare till fler plantor. All reduktion av bakterierna på fröerna är positiv, men beroende på odlingsförhållandena så kan det vara lämpligt att reducera bakterierna så mycket att det är mindre än en sjukdomsframkallande bakterie som hamnar i ”batchen”. En batch kan vara en avgränsad odlingsbädd. Om 100g frö används till en odlingsbädd så bör halten efter reduktion vara mindre än en sjukdomsframkallande bakterie per 100g. Det innebär att om reduktionen under behandling av frö är 1 logenhet så bör enbart 1 sjukdomsframkallande bakterier finnas per 10 g frö från början före behandlingen. Vidare betyder det att om reduktionen under behandling av frö är 4 logenhet så bör enbart 100 sjukdomsframkallande bakterier finnas per gram frö från början före behandlingen, d.v.s. < 2 log CFU/g.

Slutsatser

Behandling med väteperoxid i de undersökta halterna, 0,2-5,0 % och behandlingstiderna, 5-60 minuter kan leda till minskning av halten *E. coli* och *Salmonella* på frö. Hur stor reduktionen som erhålls beror på frösört. Resultaten visade större reduktion på rödbetsfrö än på solrosfrö och vitlöksfrö. På solrosfrö var minskningen är maximalt 2 logenheter och på vitlöksfrö maximalt 1 logenhet beroende på koncentration och behandlingstid. Reduktionen var däremot ca 4 logenheter på rödbetsfrö. Vid behandling med 5 % väteperoxid i 60 minuter

Hur stor reduktion som är tillräcklig beror på hur höga halter som kan finnas på fröerna före tvätt och behandlingen. Det är viktigt att fröerna tillverkas under mycket goda förhållanden för att den reduktion som fås av behandlingarna skall räcka.

Om 100g frö används till en odlingsbädd så bör halten efter reduktion vara mindre än en sjukdomsframkallande bakterie per 100g. Det innebär att om reduktionen under behandling av frö är 1 logenhet så bör enbart 1 sjukdomsframkallande bakterier finnas per 10 g frö från början före behandlingen.

Det är viktigt att utvärdering av behandling görs på frön som ympats med aktuella bakterier och inte enbart i suspensionstester. Bakterierna reducerades betydligt mindre på frö än i suspension.

Referenser

Beuchat, L-R. 1997. Comparison of chemical treatments to kill *Salmonella* on alfalfa seeds destined for sprout production. *Food Microbiology*. Vol. 34, p. 329-333.

Björkehag, C 2012, Bakteriofager som biokontroll av salmonellakontaminerade groddar. Examensarbete 2012:23. ISSN 1652-8697.

CCFRA. 2004. Review of the microbiological risks associated with sprouted seeds. Review No. 41. Nikki Beales. Campden & Chorleywood Food Research Association

Ding, H., Fu, T-J., Smith, M.A. 2013. Microbial contamination in sprouts: How effective is seed disinfection treatment? *Journal of Food Science*. Vol 78, no 4 p R495-R501.

EFSA 2011. Scientific opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. *EFSA Journal* 2011; 9(11):2424,

Piernas V., and J.P. Guiraud. 1997. Disinfection of rice seeds prior to sprouting J. *Food Sci.* 62:611-615

Weiss, A., Hammes, WP., 2003. Thermal seed treatment to improve the food safety status of sprouts. *Journal of Applied Botany*, 77, 152-155

Weissinger W. R. and L.R. Beuchat. 2000. Comparison of aqueous chemical treatments to eliminate *Salmonella* on alfalfa seeds. *Journal of Food Protection*. 63:1475-1482.



Huvudkontor/Head Office:

SIK, Box 5401, SE-402 29 Göteborg, Sweden.

Telephone: +46 (0)10 516 66 00, fax: +46 (0)31 83 37 82.

Regionkontor/Regional Offices:

SIK, Ideon, SE-223 70 Lund, Sweden.

Telephone: +46 (0)10 516 66 00.

SIK, Forslunda 1, SE-905 91 Umeå, Sweden.

Telephone: +46 (0)10 516 66 00.

SIK, c/o Almi, Box 1224, SE-581 12 Linköping, Sweden.

Telephone: +46 (0)10 516 66 00.

www.sik.se