

JTI-rapport

Lantbruk & Industri

389

Klorfria diskmedel för gårdsdisk

Studie av olika faktorerers inverkan på diskresultatet

Martin Sundberg
Cecilia Lindahl
Anders Christiansson
Carol Birgersson
Lotten Wahlund



JTI - Institutet för jordbruks- och miljöteknik

2009

Klorfria diskmedel för gårdsdisk

Studie av olika faktorerers inverkan på diskresultatet

Chlorine Free Detergents for Use on Dairy Farms

Study of the influence of different factors on cleaning effectiveness

Martin Sundberg
Cecilia Lindahl
Anders Christiansson
Carol Birgersson
Lotten Wahlund

© JTI – Institutet för jordbruks- och miljöteknik 2009

Citera oss gärna, men ange källan.

ISSN 1401-4963

Innehåll

| | |
|---|----|
| Förord..... | 5 |
| Sammanfattning | 7 |
| Summary | 8 |
| Bakgrund..... | 9 |
| Syfte | 11 |
| Metodik..... | 11 |
| Diskanläggning..... | 11 |
| Sporer som smuts | 13 |
| Metodutveckling | 13 |
| Använd metodik | 13 |
| Haltbestämning | 14 |
| Filmjök som smuts | 15 |
| Metodutveckling | 15 |
| Använd metodik | 15 |
| Kvantifiering av kvarvarande smuts..... | 15 |
| Huvudstudie | 16 |
| Reducerad vattenmängd | 16 |
| Växeldisk..... | 17 |
| Ökad lutkoncentration | 17 |
| Resultat | 17 |
| Korta/långa rör | 17 |
| Sporer | 18 |
| Reducerad vattenmängd | 20 |
| Växeldisk..... | 20 |
| Ökad lutkoncentration | 21 |
| Filmjök | 21 |
| Reducerad vattenmängd | 23 |
| Ökad lutkoncentration | 23 |
| Diskussion..... | 24 |
| Slutsatser | 28 |
| Referenser | 29 |

Förord

För att kunna producera en mjölk med god kvalitet är det av stor betydelse att mjölkanläggningen på gården kan hållas ren. Av miljöhänsyn går utvecklingen på mjölkgårdarna alltmer mot användning av diskmedel som inte innehåller klor. Det finns dock en osäkerhet om de klorfria diskmedlens effektivitet, och någon etablerad metod för att utvärdera och jämföra diskmedel för gårdsdisk finns ej. I detta projekt har en metod utarbetats för att kunna bedöma renheten efter diskning i mjölkningsanläggningar. I rapporten beskrivs denna metod samt resultaten från en serie diskningsförsök med bland annat ett antal klorfria diskmedel.

Projektet har genomförts som ett samarbete mellan JTI – Institutet för jordbruks- och miljöteknik, Svensk Mjök och Arla Foods. I projektgruppen medverkade Martin Sundberg, Cecilia Lindahl och Lotten Wahlund från JTI, Anders Christiansson, Svensk Mjök och Carol Birgersson, Arla Foods. En referensgrupp bestående av Kerstin Fredlund, Skånemejerier, och Lars-Åke Westman, Norrmejerier, har under projektets gång bidragit med värdefulla synpunkter.

Medel för projektets genomförande har ställts till förfogande från Stiftelsen Lantbruksforskning. Till alla som på något sätt bidragit till projektets genomförande framförs ett varmt tack.

Uppsala i december 2009

Lennart Nelson

VD för JTI – Institutet för jordbruks- och miljöteknik

Sammanfattning

Av miljöhänsyn går utvecklingen på mjölkgårdarna alltmer mot användning av klorfria medel för att diska mjölkkningsanläggningarna. Det finns dock en osäkerhet om de klorfria diskmedlens effektivitet, och någon etablerad metod för att utvärdera och jämföra diskmedel för gårdsdisk finns ej.

Syftet med detta projekt var att belysa den aktuella frågeställningen om klorfria diskmedels effektivitet. Som ett led i detta utarbetades en metodik för att kunna bedöma diskeffekt (renhet) baserat på sporer från *Bacillus cereus*. Denna metod användes sedan för att i en serie diskförsök prova ett antal klorfria diskmedel, där även disktemperaturens inverkan på diskresultatet undersöktes.

Diskförsöken utfördes i en testanläggning som konstruerats för att så långt möjligt efterlikna praktiska förhållanden på en gård. På en diskslinga finns två provriggar med vardera fyra demonterbara provtagningsbrickor. Brickorna är fästa i änden av T-rör som sticker ut 1,5 respektive 3 gånger diskledningens diameter för att återspegla olika svåra diskförhållanden.

I diskförsöken påfördes ”smuts” på brickornas mätyta. Genom att jämföra mängden ursprunglig ”smuts” på brickorna med mängden efter disk erhöles ett kvantifierbart mått på diskeffekten. Som ”smuts” användes dels sporer från *B. cereus*, dels filmjolk. I en och samma disk användes den ena provriggen för sporer och den andra för filmjolk.

Den största delen av de i projektet genomförda försöksdiskarna gjordes inom ramen för en *Huvudstudie*. Denna omfattade 10 olika disklösningar vid temperaturerna 35, 45, 55 och 65°C, vilket med tre upprepningar för varje kombination gav totalt 120 diskar. Utöver detta gjordes diskförsök av mer orienterande karaktär för att belysa effekter av *reducerad vattenmängd, ökad lutkoncentration* samt *växeldisk* med alkaliskt/surt diskmedel.

I huvudstudien ingick sex klorfria, alkaliska diskmedel; tre flytande och tre pulverdiskmedel. Utöver dessa användes även ett alkaliskt diskmedel *med* klor, en lutlösning, en lut/hypokloritlösning samt ”diskning” med enbart vatten.

Med den testanläggning och metodik som användes i dessa studier är de viktigaste slutsatserna från projektet följande:

- Alkaliska diskmedel utan klor gav betydligt lägre reduktion av *Bacillus cereus*-sporer än disklösningar som innehöll klor.
- Alla klorfria alkaliska diskmedel gav i princip likvärdigt diskresultat, således var det heller inga skillnader mellan pulvermedel och de i flytande form.
- Samtliga diskmedel gav för ögat rena ytor med filmjolk som ”smuts”.
- Under diskfasen bör disklösningens temperatur vara 55°C.
- En ökning av disklösningens temperatur från 55°C till 65° förbättrade inte diskresultatet.
- Det är viktigt att diskningen utförs med korrekt vattenmängd.
- Växeldisk med ett alkaliskt och ett surt diskmedel gav större reduktion av sporer än två diskar med alkaliskt diskmedel.

Det ska påpekas att den testmetod som användes, inte fullt ut återspeglar de hygienproblem som finns i praktiken. De resultat som framkommit i försöken kan därför inte direkt överföras till praktiska förhållanden. Den kunskap som erhållits i projektet utgör dock en bra grund för att kunna vidareutveckla metodik och modellsystem.

Summary

Environmental concern is driving development on dairy farms towards chlorine free detergents for internal cleaning of the milking system. There is however uncertainty about the effectiveness of the chlorine-free detergents, and currently no established method is available to evaluate and compare detergents for use on dairy farms.

The aim of this project was to establish a knowledge base on the effectiveness of chlorine-free detergents. Initially, a methodology for evaluation of cleaning effect based on *Bacillus cereus* spores was developed. This method was subsequently used in a series of cleaning-trials where the influence of the cleaning solution's temperature on cleanness was also investigated.

The cleaning trials were carried out on a test installation, as far as possible designed to correspond to on-farm conditions. On a milk line two test-rigs are mounted, each with four dismountable sampling plates. The plates are attached at the end of T-junctions protruding either 1.5 or 3 times the milk pipe diameter from the main loop in order to reflect different hard-cleaning conditions.

For each cleaning trial, *B. cereus* spores and soured milk were applied to the four sampling plates in each test rig respectively to simulate different kinds of "dirt". By comparing the original amount of "dirt" with that after cleaning, a quantifiable measure of cleaning effectiveness was obtained.

The main study comprised 10 different cleaning solutions at temperatures 35, 45, 55 and 65°C. For each mutually exclusive combination, three replicate cleanings were performed giving a total of 120 cleanings. In addition to this, further cleaning trials were carried out to illustrate the effects of *reduced water volume*, *increased lye concentration* and *alternated alkaline/acid cleaning*.

Six chlorine free, alkaline detergents were included in the main study; three liquid and three powder. In addition to these, one alkaline detergent *with* chlorine, one lye-solution, one lye/hypochlorite-solution and pure water were also tested.

The most important conclusions from the project are:

- Chlorine free, alkaline detergents gave a considerably lower reduction of *Bacillus cereus* spores than cleaning solutions containing chlorine.
- All chlorine free, alkaline detergents gave in general equal measured cleanness and as such there were no measured differences between the performance of detergents in powder form and those in liquid form.
- All detergents gave visually clean surfaces when using soured milk as "dirt".
- During the cleaning phase, temperature of the cleaning solution should be 55°C.
- An increase in cleaning solution temperature from 55°C to 65° did not improve cleaning effectiveness.
- It is important that the volume of water used in cleaning is correct.
- Alternate cleaning with one alkaline and one acid detergent gave higher reduction of spores than two cleanings with alkaline detergent

It should be noted that the test method developed does not exactly reflect the sanitary problems common in practise. Therefore, results from this these experiments cannot directly be transferred to practical conditions.

Bakgrund

Att värna om miljön är viktigt för den svenska mjölksektorn, och det finns en klar ambition att kemikaliehanteringen ska ske med stor miljöhänsyn. Utvecklingen på mjölkgårdarna går därför mot användning av mer miljövänliga och klorfria diskmedel, vilket också är bra ur arbetsmiljösynpunkt.

Vid disk och desinfektion av mjölkkningsanläggningar är det viktigt att organisk smuts som kan medföra tillväxt av mikroorganismer avlägsnas. Detta är dock inte tillräckligt, utan ytorna måste också vara mikrobiologiskt rena, d.v.s. att mikroorganismer avlägsnats eller avdödats. Det finns ett flertal diskparametrar som var för sig eller i kombination påverkar diskresultatet, tabell 1. Sporer är i detta sammanhang svårast att eliminera, eftersom de är mycket mera resistenta mot värme och kemikalier än vegetativa bakterieceller (Christiansson, 2001).

Tabell 1. Faktorer som påverkar disk- och desinfektionsresultatet (efter Christiansson, 2001).

| | |
|---------------------------------------|--|
| Disktemperatur | Bakteriestam/sporernas egenskaper hos stam |
| Lutkoncentration | Materialbeskaffenhet |
| Syrakoncentration | Materialtålighet (korrosionsbenägenhet) |
| Flöde/turbulens | Tensid |
| Tid | Komplexbildare |
| Vattnets hårdhet | pH |
| Nedsmutningsgrad | Typ av desinfektionsmedel |
| Formulerade diskmedels sammansättning | Hygienisk design |

Bakterien *Bacillus cereus*, bild 1, är en av de viktigaste orsakerna till försämrad hållbarhet på mjölk och mjölkprodukter (Christiansson et al., 1999). Den är vanligt förekommande i många miljöer och har isolerats från jord, vatten och vegetation. *Bacillus cereus*-sporer är motståndskraftiga mot yttre påverkan som värme, desinfektionsmedel, uttorkning och sura miljöer (Christiansson, 2001). Sporer överlever därför många av de värmebehandlingar som används i livsmedelsindustrin, t.ex. pastörisering, och har ofta en förmåga att gro till växande celler vid kylskåps-temperaturer (Andersson et al., 1995).

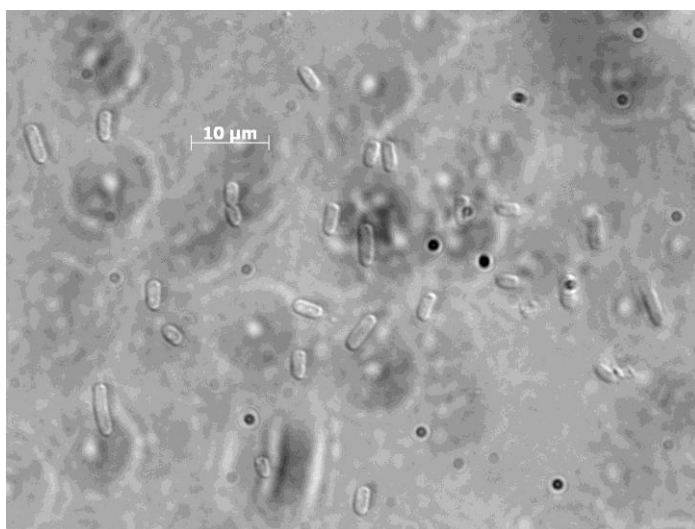


Bild 1. Vegetativa celler av *Bacillus cereus*.

Sporer av *Bacillus cereus* har en förmåga att fästa på ytor av många av de material som är vanligt förekommande i mjölkkningsanläggningar (Faille et al., 2002). När sporer fäst på en yta är de mindre känsliga mot desinfektionsmedel än sporer som är i en lösning (Kreske et al., 2006; Ryu & Beuchat, 2005). Detta beror på att sporer och bakterier som får sitta kvar på en yta, inom loppet av några dygn bildar en så kallad biofilm som gör cellerna mer motståndskraftiga.

Bildningen av biofilm 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, som omger och skyddar kolonin (Flint et al., 2001; Parkar et al., 2001; Marshall, 1992) och denna struktur gör att cellerna blir mer motståndskraftiga mot både 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). Flint et al. (2001) har också visat att föroreningar p.g.a. brister i diskning ökar förutsättningarna för bildning av biofilm. Biofilm bestående av termofila bakterier kan snabbt uppstå i sådan omfattning att mjölk som sedan passerar, kontamineras genom att celler släpper från biofilmen.

Wijman et al. (2007) upptäckte att en biofilm med *B. cereus* kunde, beroende på omständigheterna, till 90 % bestå av sporer. Detta tyder alltså på att biofilm med *B. cereus* kan fungera som en källa för sporbildning och kontinuerligt släppa sporer i t.ex. en mjölkledning. Sporbildning i biofilm skedde företrädesvis när biofilmen hade direkt kontakt med luftens syre i vattenmättad atmosfär (Ryu & Beuchat, 2005; Wijman et al., 2007). Detta motsvarar mycket väl situationen i en mjölkkningsanläggning.

Eliminering av biofilm och sporer underlättas av mekanisk påverkan samt oxid-erande ämnen, som hypoklorit och väteperoxid (Kumar & Anand, 1998). Klor-kombinerade diskmedel skulle därför kunna underlätta borttagandet av en biofilm. Som tidigare nämnts är dock sådana diskmedel mindre önskvärda av miljöskäl, och utvecklingen av diskmedel går idag mot klorfria diskmedel. Samtidigt är det svårt att utvärdera om denna utveckling kan leda till ökade hygienproblem.

Sveriges mejeriföreningar har ett branschgemensamt kemikalieråd som samarbetar kring gemensamma kemikaliefrågor. Kemikalier som används på mejerier och i lantbruket godkänds vid en bedömning som görs av en oberoende konsult (<http://www.brakemrad.se>). Bedömningen av kemikalierna görs ur såväl miljö- som hälsosynpunkt, och det finns också krav på funktionsdeklaration. Tillverkaren kan själv lämna dokumentation eller hänvisa till praktisk erfarenhet. Problemet med detta är att det är svårt att objektivt jämföra funktionen mellan olika diskmedel. För mejeridisk finns en standardmetod framtagen för att utvärdera och jämföra diskeffekt för till exempel olika diskmedel (SIKs funktionstest ”Utvärdering av rengöringseffekt i slutet system (CIP)”). De flesta försök som genomförts tidigare har fokuserat på mejeridisk, där man använder betydligt högre temperatur och koncentrationer av aktiva ämnen än vid diskning av mjölkkningsanläggningar på gårdar. Eftersom det dessutom föreligger en avsevärd skillnad i anläggningsutformning mellan mejeri- och gårdsdisk, är de erhållna resultaten inte direkt överförbara. Det finns därför önskemål från Kemikalierådet om att ta fram ett motsvarande system för gårdsdisk.

I början av 2000-talet byggde JTI upp ett hygienlabb i form av en testanläggning för gårdsdisk. Denna anläggning utformades för att så långt som möjligt efterlikna de verkliga förhållandena på en mjölkgård. Tidigare försök på JTI med diskning av biofilmer med termoresistenta bakterier har visat på svårigheterna att sätta upp ett modellsystem för att utvärdera diskning med hjälp av biofilm (Benfalk et al., 2008). Trots tydlig värmeresistens i laboriemiljö eliminerades biofilmen lätt även vid låg temperatur i JTI:s testanläggning och vid normal diskning i konventionell mjölkkningsanläggning. Detta tyder på att de biofilmer som bildas i en mjölkkningsanläggning inte kunde efterliknas i försöken.

Den bristande kunskapen om de klorfria diskmedlens effektivitet vid gårdsdisk är inte tillfredställande. Det är därför viktigt att kunna undersöka vilka diskbetingelser för klorfria diskmedel som krävs för att inte vegetativa celler och sporer finns kvar eller överlever, och därmed får chans att etablera biofilm i anläggningen. Mot bakgrund av *B. cereus*-sporens goda förmåga att fästa på ytor, skulle ett diskbedömningssystem baserat på användning av sådana sporer i JTI:s testanläggning kunna vara en framkomlig väg.

Syfte

Syftet med detta projekt var att belysa den aktuella frågeställningen om klorfria diskmedels effektivitet. Som ett led i detta utarbetas en metodik för att kunna bedöma diskeffekt (renhet) baserat på sporer från *Bacillus cereus*. Målet var att få en metod för att objektivt kunna jämföra diskeffekten mellan olika diskmedel för mjölkkningsanläggningar på gårdar. Denna metod används sedan för att i en serie diskförsök prova ett antal klorfria diskmedel, där även disktemperaturens inverkan på diskresultatet undersöks.

Metodik

Den största delen av de i projektet genomförda försöksdiskarna gjordes inom ramen för en *Huvudstudie*. Denna omfattade 10 olika disklösningar vid fyra disktemperaturer, vilket med tre upprepningar för varje kombination gav totalt 120 diskar. Utöver detta gjordes diskförsök av mer orienterande karaktär för att belysa effekter av *reducerad vattenmängd*, *ökad lutkoncentration* samt *växeldisk* med alkaliskt/surt diskmedel.

De statistiska analyserna av data utfördes med hjälp av blandade linjära modeller, "mixed models", se till exempel Littell et al. (2006). Metoderna finns beskrivna i Engstrand & Olsson (2003, kap. 10-12). Proceduren Mixed i SAS-paketet (SAS, 2008) användes för analyserna. De medelvärden som redovisas i resultatavsnittet avser *viktade* medelvärden beräknade i SAS. De LSD-värden (Least Significant Difference) som används i resultatredovisningen avser den minsta skillnad mellan två tal som måste föreligga för att skillnaden skall vara statistiskt signifikant ($p < 0,05$).

Diskanläggning

En central del för projektets genomförande var JTI:s testanläggning för diskning som finns installerad på SLU:s försöksgård på Kungsängen i Uppsala. Huvudkomponenterna i anläggningen är en ca 35 meter lång rostfri, isolerad mjölkslinga med provriggar, samt en konventionell diskmaskin (DeLaval C200), bild 2.

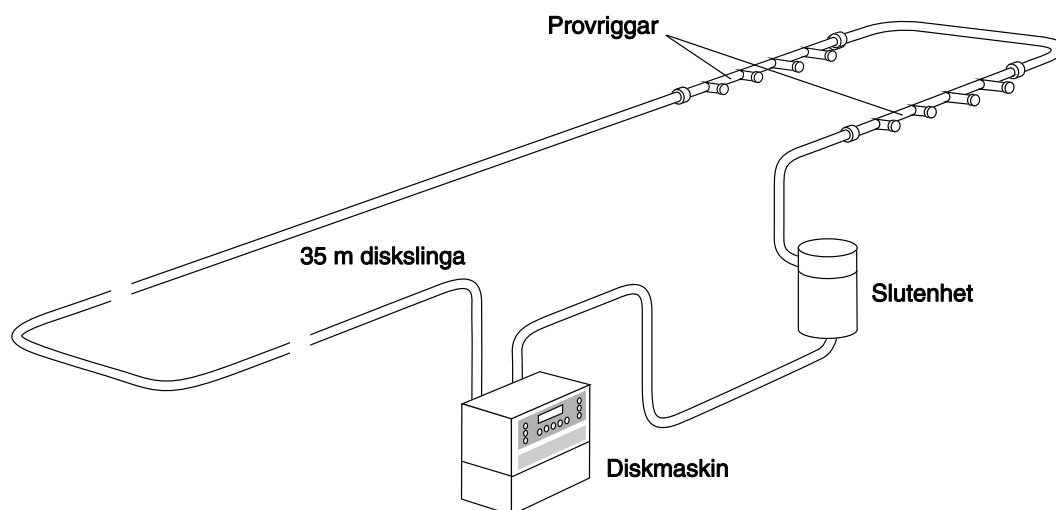


Bild 2. Principskiss över JTI:s testanläggning för diskning.

Testanläggningen har konstruerats för att så långt möjligt efterlikna praktiska förhållanden på en gård. Den invändiga rördiametern på diskslingan är 22 mm. På slingan finns två riggar med vardera fyra demonterbara provtagningsbrickor, som var och en är fästade på ett utstickande T-rör, bild 3. Två av T-rören har en längd av 33 mm och de andra två är 66 mm långa, motsvarande 1,5 respektive 3 gånger diskledningens diameter. De två olika längderna på T-rör används för att återspegla olika svåra diskförhållanden. I rör som utgör ”döda ändar” i systemet och som har en längd på max 1,5 gånger rørets diameter blir diskresultatet i ändpunkten inte sämre än i övriga delar av anläggningen (Gustafsson, pers. medd.) Avståndet mellan T-rören på diskriggen är 300 mm, vilket ska säkerställa att den störning i vätskeflöde som uppstår vid ett rör inte påverkar flödesförhållandena vid nästa rör.



Bild 3. Provrigg med två korta och två långa T-rör, i vars ändar de demonterbara provtagningsbrickorna (t.h.) skruvas fast.

Provtagningsbrickorna är tillverkade i rostfritt stål och den yta som utsätts för disklösningen (mätytan) är ca $2,8 \text{ cm}^2$ (19 mm diameter).

I dessa diskförsök påfördes ”smuts” på brickornas mätyta. Genom att jämföra mängden ursprunglig ”smuts” på brickorna med mängden efter disk erhålls ett kvantifierbart mått på diskeffekten. Som ”smuts” användes i dessa försök dels sporer från *B. cereus*, dels filmjolk. I en och samma disk användes den ena provriggen för sporer och den andra för filmjolk.

I huvudstudien utfördes diskningar vid temperaturerna 35, 45, 55 och 65°C. Dessa temperaturnivåer avser de som råder där provtagningsbrickorna är monterade i riggarna. Motsvarande temperaturer på vattnet när det lämnade diskautomaten och började pumpas runt i mjölkslingan (inställd vattentemperatur på maskinen) var 42, 54, 67 respektive 79°C. En disk innefattade en sköljning, huvuddisk med diskmedel samt en avslutande sköljning. Vattenmängden i huvuddisken var ca 30 liter. Tiden för huvuddisken var i försöken 5 min.

Sporer som smuts

Metodutveckling

Enligt den ursprungliga planen var det tänkt att sporsuspension skulle *sprayas* på provbrickorna i ett jämnt och tunt lager (Husmark et al., 1999). Målet var att på varje provbricka påföra ca en miljon sporer (kvantifierat med den nedan beskrivna metoden för mängdbestämning). Efter inledande försök med denna appliceringsmetod provades emellertid en alternativ metod som bedömdes kunna ge flera fördelar. En sporlösning med känd koncentration pipetterades då ut på provbrickorna, varefter den med ymnål ströks ut i ett jämnt skikt över hela ytan. Med denna metod kan man mer noggrant påföra det önskade antalet sporer på varje enskild bricka, samtidigt som man slipper det stora ”spill” av sporer som uppstår vid sprayning. Dessutom var metoden rent arbetsmässigt betydligt enklare.

Under utarbetande av metodiken provades inledningsvis att använda en blandning (50/50) av mjölk och sporsuspension på brickorna. Efter diskning i testanläggningen konstaterades dock att inga kvarvarande sporer kunde påvisas på brickorna. För att undersöka möjligheterna att få sporer att fästa bättre, provades därefter att applicera en ren sporsuspension *utan* mjölk. Detta konstaterades fungera bättre, såtillvida att sporer fanns kvar efter diskning.

Använd metodik

I försöket användes sporer från *Bacillus cereus*-stammen GR 214. Stammen, som är psykrotrof och representativ för de stammar som kan tillväxa i pastöriserad mjölk under kylförvaring, hade isolerats från silomjölk i ett svenskt mejeri (Svensson et al., 2004).

Innan diskförsöken påbörjades förökades sporer i sådan mängd att en och samma stamlösning kunde användas till alla diskarna i projektet. I förökningsprocessen tillsattes sporer i en näringslösning (tryptone yeast extract broth) och placerades i inkubatorskåp (30°C) över natten. Därefter ytspreddes lösningen med sporer på agarplattor för sporulering (nutrient broth (Difco) 8 g/l; KCl 1 g/liter; 1 mM CaCl₂; 10 µM MnCl₂; 1 mM MgSO₄; 10 µM FeSO₄, Bacto-Agar (Difco) 30g/l) och placerades i inkubatorskåp (30°C) under 7 dygn. Efter kontroll av att sporulering skett, skördades sporer från plattorna genom uppslamning i 0,9 % koksaltlösning. Sporsuspensionen samlades i provrör som centrifugerades i 7500 g under 10 minuter. Sporer tvättades sedan tre gånger genom att avlägsna vätskan, lösa upp pelleten i koksaltlösning, följt av centrifugering. Pelleten löstes sedan återigen och värmdes till 72°C under 5 minuter för att avdöda eventuellt kvarvarande vegetativa bakterieceller. Slutligen iordningställdes en stamlösning med känd sporkoncentration, vilken sedan användes för att bereda sporlösningar med önskad koncentration till försöksdiskarna (se nedan).

Innan diskning rengjordes provbrickorna genom diskning i konventionell diskmaskin, avtorkning av mätytan med sprit och därefter autoklavering. Alla lösningar och utrustning som användes under försöket var sterila.

Dagen innan diskning blandades en sporlösning med önskad koncentration, bestående av 50 ml sterilt vatten, 0,016 g Tween 80 samt stamlösning av sporer. Tween 80 är ett vätningsmedel som användes för att minska ytspänningen på lösningen. Brickor märktes upp och 40 µl av sporlösningen med känd koncentration pipetterades ut på varje bricka, varefter den försiktigt ströks ut i ett jämnt skikt över hela mätytan med en ympnål. Därefter placerades brickorna horisontellt i dragskåp över natten för att torka.

Inför varje diskdag påfördes på samma sätt sporlösning på två stycken kontrollbrickor som *inte* diskades. Mängden sporer på dessa fick sedan utgöra referensnivå vid beräkningen av sporreduktion på alla de brickor som diskades denna dag.

Direkt efter slutförd disk demonterades brickorna från diskriggen och placerades med mätytan i buffertlösning (0,1 % natriumtiosulfat, 0,1 % Tween 80) under 30 sekunder för att neutralisera eventuella rester av diskmedel. Därefter sköljdes brickorna av med sterilt vatten.

Haltbestämning

Efter torkning i dragskåp ca 5 minuter svabbades mätytan på varje provbricka noggrant av med två sterila bomullssvabbar fuktade i koksaltlösning. Svabbarna från varje bricka skakades sedan i ett separat provrör med koksaltlösning. En spädningsserie av varje lösning utfördes med efterföljande ingjutning i TGE-agar (tryptone-glucose extrakt, SVA) i petriskålar. För varje spädning gjordes två ingjutningar. Odlingsplattorna inkuberades därefter i 30°C under två dygn.

Antalet kolonibildande enheter (CFU) räknades, där i första hand resultatet för de plattor som innehöll mellan 15 och upp till 300 CFU användes för att bestämma antalet kvarvarande sporer på varje provbricka. I de fall antalet kolonier på båda plattorna från den första spädningen var under 15, men åtminstone någon koloni fanns på någon av plattorna, användes värdet 10 i den fortsatta resultatbearbetningen. Om inga kolonier konstaterades på någon av plattorna från en provbricka användes värdet 0. Eftersom mikroorganismer ofta förekommer i riklig mängd brukar antalet som regel anges i logaritmisk form ($^{10}\log$ CFU). Sambandet mellan faktiskt antal och logaritm värden framgår nedan.

| | | | | | | |
|-------------------------------------|-----|------|--------|---------|--------|---------------------------|
| 10 | 100 | 1000 | 10 000 | 100 000 | 1 milj | <i>faktiskt antal</i> |
| ----- ----- ----- ----- ----- ----- | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | <i>logaritm</i> |

All fortsatt bearbetning av mikrobiologiska data utfördes med logaritmerade ($^{10}\log$) värden för antal bakterier.

Diskeffekten är i resultatredovisningen uttryckt som reduktionen av antalet sporer (log-enheter) i förhållande till de odiskade kontrollbrickorna (medelvärde för två brickor) för respektive diskdag.

Filmjök som smuts

Metodutveckling

Inledande tester gjordes med mjök som på olika sätt påfördes brickan, varefter mjöken fick torka in både i rumsmiljö och i torkskåp vid olika temperaturer och tider. Oavsett behandling konstaterades emellertid att mjölskiktet satt mycket löst och släppte från brickan redan när det utsattes för bara ett lätt flöde av vätska.

Därefter provades att istället smutsa brickorna med filmjök, vilket konstaterades fästa betydligt bättre på brickorna.

Använd metodik

Innan diskning förbereddes brickorna genom diskning i konventionell diskmaskin samt avtorkning av mätytan med sprit. Dagen innan diskning pipetterades 50 µl filmjök (3 % fetthalt) ut på varje bricka, och fördelades sedan ut i ett så jämnt lager som möjligt med utsidan av en pipettspets. Därefter placerades brickorna i ventilerat värmeskåp där de torkades vid 80°C under 30 minuter.

På samma sätt som för sporer iordningsställdes till varje diskdag kontrollbrickor som inte diskades. Detta för att få en referensnivå på mängden pålagd smuts på brickorna.

Kvantifiering av kvarvarande smuts

Efter diskning torkades brickorna i ventilerat värmeskåp vid ca 60°C under ca 30 minuter. När brickorna svalnat sprayades de med Erythrosin B (Merck), vilket är ett rött färgämne som binder till protein. Överskottet av Erythrosin sköljdes av med destillerat vatten, varefter brickorna återigen torkades i värmeskåp. Kvarvarande rödfärgning indikerar att smuts i form av protein finns kvar på brickorna.

Kvantifiering av kvarvarande färg gjordes med en kolorimeter (Minolta Chroma Meter CR310). Detta instrument mäter enligt den så kallade tristimulusmetoden, där tre sensorer mäter sammansättningen av det reflekterade ljuset på ett sätt som ska motsvara receptionen av färg hos det mänskliga ögat. De härigenom uppmätta tristimulusvärdena X, Y och Z kan användas för att numeriskt definiera en färg.

Det finns flera olika system (färgrymder) för att beskriva färger, där matematiska samband kan användas för transformering mellan färgrymder. I denna studie räknades XYZ tristimulusvärdena om till färgrymde $L^*a^*b^*$, där L^* är en koordinat för ljushet (svart till vitt), a^* är koordinaten från grönt till rött och b^* koordinaten från blått till gult. Eftersom färgämnet som användes i denna studie var rött, användes här enbart värdet på a^* som ett mått på mängden kvarvarande smuts på brickorna. Medan odiskade kontrollbrickor hade a^* -värden kring 10, hade helt rena brickor efter disk värden nära 0. På grund av att strukturen på brickornas mätytor varierade något sinsemellan, varierade även a^* -värdet för helt rena brickor. Utifrån de visuella bedömningar som också gjordes av kvarvarande rödfärgning på brickorna, kunde a^* -värden på upp till åtminstone 0,5 förekomma utan att för ögat synlig smuts fanns kvar på mätytan.

Huvudstudie

I huvudstudien ingick sex alkaliska diskmedel utan klor; tre flytande och tre pulverdiskmedel. Diskmedlen var från tre olika tillverkare, med ett flytande och ett pulvermedel från varje tillverkare. Ett krav på de klorfria diskmedlen som ingick i studien var att de fanns medtagna på Svensk Mjök Kemikalieråds lista över godkända diskmedel (www.brakemrad.se). Alla diskmedel doserades enligt tillverkarnas rekommendationer, med hänsyn tagen till hårdheten på det vatten som användes i försöken (15-20 °dH).

I resultatdelen anges de tre diskmedelsfabrikaten med **A**, **B** och **C** och om de är i pulverform eller flytande anges med indexen p respektive f .

För att bättre kunna bedöma diskresultatet med de sex alkaliska diskmedlen, inkluderades utöver dessa även diskningar med följande disklösningar:

- **Lut** – Natriumhydroxid med en koncentration i disklösningen på 0,1 %. Denna koncentration valdes för att motsvara den koncentration som erhålls vid normal dosering av alkaliska diskmedel i mjölkkningsanläggningar.
- **Utan** – ”Diskning” helt utan diskmedel.
- **Alk/klor** – Ett välbeprövat alkaliskt diskmedel med klor.
- **Lut+hypo** – Lut och natriumhypoklorit. Lut och hypoklorit tillsattes var för sig under uppvärmningsfasen av vattnet för huvuddisken. Den natriumhypoklorit som användes hade en koncentration av aktivt klor på 7 % (± 2 %). Mängden tillsatt lut och klor avpassades så att koncentrationen i disklösningen blev 0,1 % lut och 0,05 % aktivt klor. Den sistnämnda koncentrationen valdes för att motsvara den klorkoncentration som erhålls vid normal dosering av klorhaltiga diskmedel i mjölkkningsanläggningar.

För var och en av dessa tio disklösningar utfördes diskningar vid fyra temperaturer, 35, 45, 55 och 65°C, vilket med tre upprepningar för varje kombination gav totalt 120 diskar.

Försöksdiskarna utfördes i omgångar med som regel 6 diskar på en dag. Varje diskdag avslutades med att rengöra anläggningen genom en disk med klorbaserat diskmedel vid 65°C, där diskmedlet överdosades med 50 procent.

Reducerad vattenmängd

Ett ”vanligt” fel i diskanläggningar på gårdar är att diskningen sker med för liten vattenmängd. Detta kan till exempel bero på att vatten läcker ut under diskningen eller att inte all disklösning släpps ut från diskautomatens vattenbehållare till mjölkkningsanläggningen. I båda dessa fall kommer diskningen att ske med reducerad mängd vatten, men med rätt koncentration av diskmedel.

För att i någon mån belysa hur diskresultatet påverkas av en för låg vattenvolym utfördes diskningar i tre upprepningar med halva mängden vatten, ca 15 liter, jämfört med de ca 30 liter som användes i huvudstudien. Diskningarna med reducerad vattenmängd gjordes vid 55°C och med 0,1 % lut i disklösningen.

Växeldisk

Vid användning av klorfria alkaliska diskmedel rekommenderas generellt s.k. växeldisk, vilket innebär att man diskar varannan gång med alkaliskt och varannan gång med surt diskmedel.

I en diskomgång undersöktes växeldisk med ett alkaliskt (diskmedel B_F) och ett surt diskmedel, båda från samma tillverkare. Följande försöksled innefattades:

- 1 disk med alkaliskt diskmedel
- 1 disk med surt diskmedel
- 2 diskar med alkaliskt diskmedel
- 1 disk med alkaliskt diskmedel + 1 disk med surt diskmedel

Alla ovanstående försöksled gjordes med tre upprepningar vid 55°C disktemperatur. I försöket med växeldisk innefattades inte smutsning med filmjolk utan endast brickor belagda med sporsuspension.

Ökad lutkoncentration

Vid normal dosering av alkaliska diskmedel i mjölkkningsanläggningar erhålls en lutkoncentration i disklösningen på i storleksordningen 0,1 %. Detta är betydligt lägre än vad som används vid mejeridisk, där man diskar med en lutkoncentration på 1-1,5 %.

För att undersöka vad en ökad koncentration av lut kan betyda för diskresultatet, gjordes försöksdiskar i tre upprepningar med 0,5 % lutkoncentration vid 55°C. Högre lutkoncentration än detta bedömdes av projektgruppen inte som realistiskt vid gårdsdisk av mjölkkningsanläggningar.

Resultat

Metoden för att påföra sporer på provtagningsbrickorna visade sig ge god repeterbarhet när det gäller antal sporer. Målet var att på varje bricka lägga på ett antal sporer som med den använda analysmetoden skulle ge ett resultat på i storleksordningen en miljon CFU (log CFU-värde = 6). Kontrollbrickornas sporantal, som för var och en av de 21 diskdagarna användes som referensnivå vid beräkningen av sporreduktion efter disk, var i medeltal log CFU = 6,10, med en standardavvikelse på 0,16.

Korta/långa rör

Hur stor reduktion av sporer som registrerats på brickor monterade på de korta respektive långa rören redovisas i tabell 2 för var och en av de fyra disktemperaturerna.

Tabell 2. Reduktion (log CFU) av *Bacillus cereus*-sporer för korta respektive långa rör vid olika disktemperaturer. Medelvärden för samtliga tio disklösningar.

| | Disktemperatur | | | |
|-----------|----------------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 65°C |
| Korta rör | 2,5 | 2,7 | 3,2 | 3,3 |
| Långa rör | 2,5 | 2,7 | 3,1 | 3,0 |

LSD=0,13 vid jämförelse mellan korta och långa rör vid samma temperatur.

Resultaten indikerar att det inte var någon skillnad i diskresultat mellan korta och långa rör för de tre temperaturnivåerna upp till och med 55°C. Vid 65°C däremot var skillnaden mellan rörlängderna signifikant. En djupare analys av data vid 65°C visar dock att skillnaden mellan korta och långa rör var signifikant endast för tre av de tio disklösningarna (A_P, B_F och Alk/klor).

I tabell 3 återfinns motsvarande resultat från diskarna där filmjök använts som smuts. Här framgår att det inte vid någon av disktemperaturerna förelåg någon signifikant skillnad mellan korta och långa rör.

Tabell 3. Uppmätta värden på a^* med kolorimeter för korta respektive långa rör vid olika disktemperaturer. Medelvärden för samtliga tio disklösningar.

| | Disktemperatur | | | |
|-----------|----------------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 65°C |
| Korta rör | 0,52 | 0,42 | 0,36 | 0,34 |
| Långa rör | 0,57 | 0,36 | 0,34 | 0,36 |

LSD=0,11 vid jämförelse mellan korta och långa rör vid samma temperatur.

Som framgår var skillnaden mellan korta och långa rör på det hela taget inte signifikant, varken för sporer eller för filmjök. För sporer vid 65°C var skillnaden visserligen signifikant, men nedbrutet på de enskilda disklösningarna kvarstod denna skillnad endast för ett fåtal. Mot denna bakgrund har vi därför i den fortsatta redovisningen valt att inte särredovisa resultat för korta respektive långa rör.

Sporer

Hur disktemperaturen påverkat reduktionen av sporer på provbrickorna redovisas i tabell 4, dels för de sex klorfria diskmedlen som grupp, dels för de två disklösningarna som innehöll klor.

Tabell 4. Reduktion (log CFU) av *Bacillus cereus*-sporer vid olika disktemperaturer. Medelvärden för de alkaliska diskmedel utan klor (A-C) samt de två klorhaltiga disklösningarna.

| | Disktemperatur | | | | LSD |
|-----------------------|----------------|------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 65°C | |
| Klorfria (A-C), 6 st. | 2,25 | 2,35 | 2,81 | 2,76 | 0,25 |
| Klorhaltiga, 2 st. | 3,59 | 4,54 | 5,31 | 5,38 | 0,44 |

När det gäller medelvärdet för de båda klorhaltiga disklösningarna var det en signifikant skillnad mellan temperaturnivåerna upp till 55°C. Diskresultatet förbättrades således successivt upp till 55°C, medan ökningen till 65°C inte gav någon ytterligare förbättring. För de sex klorfria diskmedlen var det endast temperatursteget från 45°C till 55°C som gav någon signifikant förbättring av diskresultatet.

I tabell 5 visas sporreduktionen vid olika temperatur för de enskilda disklösningarna. Samma resultat men i grafisk form återfinns i bild 4. Av tabellen framgår att ingen av de tio disklösningarna gav ett förbättrat diskresultat (större sporreduktion) vid en höjning av disktemperaturen från 55°C till 65°C.

Tabell 5. Reduktion (log CFU) av *Bacillus cereus*-sporer med de olika disklösningarna. Medelvärden för tre upprepningar med fyra provbrickor i varje upprepning.

| | Disktemperatur | | | |
|------------------|----------------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 65°C |
| A _P | 2,0 | 2,1 | 2,7 | 2,2 |
| B _P | 2,7 | 2,4 | 3,1 | 3,0 |
| C _P | 2,1 | 2,5 | 2,9 | 2,8 |
| A _F | 2,0 | 2,3 | 2,9 | 3,0 |
| B _F | 2,3 | 2,5 | 2,7 | 2,8 |
| C _F | 2,4 | 2,4 | 2,6 | 2,8 |
| Lut, 0,1 % | 2,3 | 2,0 | 2,6 | 2,6 |
| Inget diskmedel | 1,8 | 1,5 | 1,7 | 1,6 |
| Alkaliskt m klor | 3,3 | 4,2 | 5,4 | 5,3 |
| Lut+hypoklorit | 3,9 | 4,9 | 5,2 | 5,4 |

LSD = 0,6

En statistisk jämförelse av värdena i tabellen inom en och samma temperatur visar följande:

- Diskning utan diskmedel gav signifikant lägre reduktion av sporer än de klorfria diskmedlen (A-C) vid 45, 55 och 65°C. Vid 35°C var skillnaden signifikant endast i förhållande till diskmedlen B_P och C_F.
- De klorfria diskmedlen gav oftast större reduktion av sporer än diskning med 0,1 % lutlösning, men inte i något fall var skillnaden signifikant.
- Vid 55 och 65°C gav den 0,1-procentiga lutlösningen signifikant större sporreduktion än diskning med enbart vatten. Vid 35 och 45°C var dock skillnaden inte signifikant.
- De två klorhaltiga disklösningarna gav signifikant större reduktion än alla övriga disklösningar vid samtliga fyra temperaturnivåer.
- Med endast ett fåtal undantag fanns inga signifikanta skillnader mellan de klorfria diskmedlen. Följaktligen gav alltså de klorfria medlen i pulverform likvärdigt diskresultat som de i flytande form.

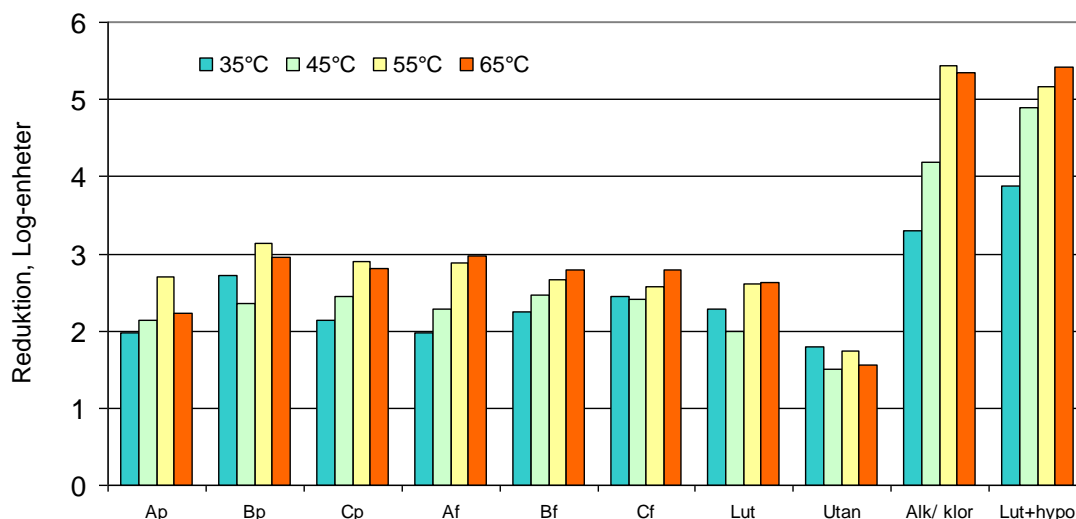


Bild 4. Reduktion (log CFU) av *Bacillus cereus*-sporer med de olika disklösningarna. Medelvärden för tre upprepningar med fyra provbrickor i varje upprepning.

Reducerad vattenmängd

Resultaten från diskningarna med reducerad vattenmängd redovisas i tabell 6, där de jämförs med normal vattenmängd i huvudstudien. Båda vattenmängderna avser diskning med 0,1 % lut vid 55°C.

Tabell 6. Reduktion (log CFU) av *Bacillus cereus*-sporer med normal respektive halverad vattenmängd. Medelvärden för tre upprepningar.

| | 30 liter | 15 liter |
|-----------|----------|----------|
| Korta rör | 2,7 | 1,8 |
| Långa rör | 2,5 | 1,6 |
| Alla rör | 2,6 | 1,7 |

LSD=0,46, utom vid jämförelse mellan 30 och 15 liter vatten för *Alla rör* då LSD=0,56

Även om reduktionen av antalet sporer var något större i de korta än de långa rören för båda vattenmängderna, var skillnaden inte i något fall signifikant. Däremot konstaterades en signifikant skillnad i diskresultat mellan de båda vattenmängderna, där den halverade mängden gav en signifikant lägre sporreduktion.

Växeldisk

Resultaten från försöken med växeldisk redovisas i tabell 7.

Av tabellen framgår att diskning med två alkaliska diskar inte gav signifikant större reduktion av sporer jämfört med enbart en alkalisk disk. I övrigt var alla skillnader mellan försöksleden signifikanta. Växeldisk gav således större reduktion av *B. cereus*-sporer än två alkaliska diskar, och även jämfört med enbart en alkalisk eller sur disk.

Tabell 7. Reduktion (log CFU) av *Bacillus cereus*-sporer. Medelvärden för tre upprepningar med vardera fyra provbrickor.

A: 1 disk med alkaliskt diskmedel.

S: 1 disk med surt diskmedel.

AA: 2 diskar med alkaliskt diskmedel.

AS: 1 disk med alkaliskt diskmedel + 1 disk med surt diskmedel.

| | A | S | AA | AS |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Reduktion, log-enheter | 2,6 | 1,9 | 2,7 | 3,1 |

LSD=0,2

Ökad lutkoncentration

Resultaten från diskningarna med ökad koncentration av lut redovisas i tabell 8, där de jämförs med den ”normala” lutkoncentrationen på 0,1 % som användes i huvudstudien. Disktemperaturen var för båda lutkoncentrationerna 55°C.

Då det inte förelåg någon signifikant skillnad mellan korta och långa rör, avser de redovisade värdena i tabellen medelvärden för båda rörlängderna.

Tabell 8. Reduktion (log CFU) av *Bacillus cereus*-sporer vid diskning med ”normal” respektive förhöjd lutkoncentration i disklösningen. Medelvärden för tre upprepningar med vardera fyra provbrickor.

| | 0,1 % lut | 0,5 % lut |
|------------------------|-----------|-----------|
| Reduktion, log-enheter | 2,6 | 2,2 |

LSD=0,6

Som framgår av tabellen var reduktionen av antal sporer något lägre med den högre lutkoncentrationen. Skillnaden mellan de båda koncentrationerna var dock inte statistiskt signifikant.

Filmjök

Hur disktemperaturen påverkat de uppmätta restmängderna av filmjök på provbrickorna redovisas i tabell 9, dels för gruppen av de sex klorfria diskmedlen, dels för de två disklösningarna som innehöll klor.

Tabell 9. Uppmätta värden på a^* med kolorimeter. Medelvärden för alkaliska diskmedel utan klor (A-C) samt de två klorhaltiga disklösningarna.

| | Disktemperatur | | | | LSD |
|----------------------|----------------|------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 65°C | |
| Klorfria (A-C), 6 st | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,31 | 0,12 |
| Klorhaltiga, 2 st | 0,23 | 0,25 | 0,17 | 0,20 | 0,21 |

Varken för de sex diskmedlen i gruppen *klorfria* eller för de två klorhaltiga disklösningarna hade temperaturen någon signifikant inverkan på diskresultatet med filmjök.

Av tabell 10, där resultaten redovisas separat för varje enskild disklösning, framgår att med undantag för diskning med enbart vatten fanns ingen temperatureffekt för någon av disklösningarna. Med enbart vatten blev diskresultatet avsevärt sämre vid 35 °C än vid de tre högre temperaturnivåerna.

Samma värden som i tabell 10 återfinns också i grafisk form i bild 5.

Tabell 10. Uppmätta värden på a^* med kolorimeter. Medelvärden för tre upprepningar exklusive diskmedel B_F vid 55°C som utfördes med två upprepningar.

| | Disktemperatur | | | |
|------------------|----------------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 65°C |
| A_P | 0,37 | 0,39 | 0,40 | 0,24 |
| B_P | 0,13 | 0,23 | 0,31 | 0,28 |
| C_P | 0,40 | 0,32 | 0,38 | 0,16 |
| A_F | 0,44 | 0,43 | 0,32 | 0,34 |
| B_F | 0,50 | 0,39 | 0,36 | 0,44 |
| C_F | 0,38 | 0,44 | 0,45 | 0,38 |
| Lut, 0,1 % | 0,52 | 0,44 | 0,29 | 0,36 |
| Inget diskmedel | 2,23 | 0,76 | 0,65 | 0,89 |
| Alkaliskt m klor | 0,23 | 0,31 | 0,18 | 0,20 |
| Lut+hypoklorit | 0,24 | 0,18 | 0,16 | 0,20 |

LSD=0,31, utom vid jämförelser med B_F vid 55°C då LSD=0,35.

I övrigt visade den statistiska jämförelsen av värdena i tabellen inom en och samma temperatur följande:

- Medelvärdet för disk *utan* diskmedel gav signifikant högre värden på a^* än alla övriga disklösningar vid 35, 45 och 65°C. Vid 55°C var skillnaden signifikant endast vid jämförelse med lutlösningen, de två klorhaltiga disklösningarna samt diskmedlen B_P och A_F .
- Inom samma temperatur fanns med endast ett undantag (B_P ; B_F vid 35°C) inga signifikanta skillnader mellan de klorfria diskmedlen A-C.
- De två klorhaltiga disklösningarna gav ofta något lägre värden på a^* än de klorfria diskmedlen och lutlösningen, men skillnaden var inte i något fall signifikant.

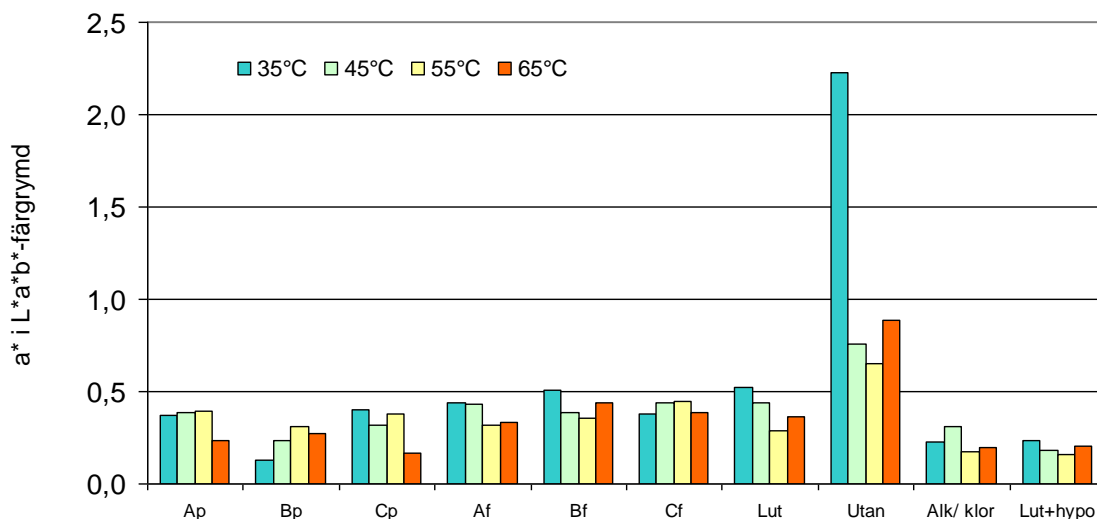


Bild 5. Uppmätta värden på a^* med kolorimeter. Medelvärden för tre upprepningar exklusive försöksled B_F vid 55°C som utfördes med två upprepningar.

Reducerad vattenmängd

Resultaten från diskningarna med reducerad vattenmängd redovisas i tabell 11, där de jämförs med normal vattenmängd i huvudstudien. Båda vattenmängderna avser diskning med 0,1 % lut vid 55°C.

Tabell 11. Uppmätta värden på a^* med kolorimeter på brickor diskade med normal respektive halverad vattenmängd. Medelvärden för tre upprepningar med vardera fyra provbrickor.

| | 30 liter | 15 liter |
|-----------|----------|----------|
| Korta rör | 0,40 | 0,25 |
| Långa rör | 0,18 | 0,02 |
| Alla rör | 0,29 | 0,13 |

LSD=0,25, utom vid jämförelse mellan 30 och 15 liter vatten för *Alla rör* då LSD=0,23

Vid båda vattenmängderna registrerades något lägre värden för de långa rören jämfört med de korta. Överlag var dock de uppmätta kolorimetervärdena mycket låga, och några signifikanta skillnader förelåg inte varken mellan korta och långa rör eller mellan de båda vattenmängderna.

Ökad lutkoncentration

Resultaten från diskningarna med ökad koncentration av lut redovisas i tabell 12, där de jämförs med den "normala" lutkoncentrationen på 0,1 % som användes i huvudstudien. Disktemperaturen var för båda lutkoncentrationerna 55°C.

Tabell 12. Uppmätta värden på a^* med kolorimeter på brickor vid diskning med "normal" respektive förhöjd lutkoncentration i disklösningen. Medelvärden för tre upprepningar med vardera fyra provbrickor.

| | 0,1 % lut | 0,5 % lut |
|-------|-----------|-----------|
| a^* | 0,29 | 0,33 |

LSD=0,19

Som framgår av tabellen var de uppmätta kolorimetervärdena låga för båda lutkoncentrationerna, och någon signifikant skillnad mellan medelvärdena fanns inte.

Diskussion

Det ska poängteras att den testanläggning och metodik som användes i dessa försök enbart ska betraktas som ett modellsystem som använts för att belysa de aktuella frågeställningarna. Även om vi så långt det varit möjligt försökt efterlikna de förhållanden som råder i praktiken, har detta inte varit fullt ut möjligt. Det som får betraktas som den viktigaste avvikelserna är att den "smuts" (intorkad sporsuspension och filmjolk) som användes, inte återspeglar den typ av hygienproblem som är vanliga i praktiken. I en mjölkkningsanläggning på en gård transporteras mjölk flera gånger varje dygn i rörsystemet. Om man vid diskningen inte lyckas fullständigt med att avlägsna kvarvarande mjölkrester på svåråtkomliga ställen, kan bakterier växa till och så småningom bildas, såsom beskrivits i bakgrundsavsnittet, en så kallad biofilm. Vi vet att det i detta sammanhang finns vissa betydelsefulla skillnader mellan en sådan biofilm och den "smuts" som användes i försöket, t.ex. att sättet att fästa på ytor är annorlunda. Att biofilmer är mer känsliga än sporer för höga temperaturer, diskkemikalier och desinfektionsmedel är välkänt, men kunskapen är bristfällig om var mer exakt de kritiska gränserna för biofilm går. Generellt sett ökar toleransen i ordning från bakterier i suspension, enskilda bakterier på yta, bakterier i biofilm och som sporer (Peng et al., 2002; Frank & Koffi, 1990), men biofilmer med eller utan sporer kan ibland uppvisa avsevärd resistens mot t.ex. lut och syra (Bremer et al., 2006). Även om både bildningen av biofilm och bildningen av sporer är ett sätt för bakterierna att skydda sig, är det i det enskilda fallet oklart vilka skillnader i tolerans mot kemikalier som finns mellan dessa båda former. Mot denna bakgrund kan därför inte de resultat som framkommit i försöken direkt överföras till praktiska förhållanden, eftersom vi inte kan relatera den rengöringseffekt som erhållits i försöken till vad som skulle krävas för att på längre sikt kunna upprätthålla en acceptabel hygien i en mjölkkningsanläggning.

De resultat som framkommit är ändå mycket intressanta, och har gett ny kunskap och insikt i grundläggande frågor om hur olika typer av diskmedel och kemikalier inverkar på diskresultatet. Den metodik som använts i försöken har fungerat, så tillvida att skillnader i diskeffekt har kunnat påvisas vid förändringar av olika diskparametrar. Erfarenheterna och kunskapen från projektet utgör således en bra grund för ett fortsatt arbete med att vidareutveckla metodik och modellsystem, där målet skulle vara att mer direkt komma åt problematiken med vad som krävs för att förhindra den långsiktiga uppbyggnaden av biofilm.

Skillnader mellan disklösningar

Diskning med enbart vatten återspeglar den rent *mekaniska* rengöringseffekten som uppstår genom vätskeflödet i anläggningen. Skillnaden i rengöringseffekt mellan enbart vatten och ett diskmedel återspeglar den *kemiska* effekten av de ämnen som medlet innehåller.

I tabell 13 visas hur stor mekanisk respektive kemisk effekt som erhållits i försöken med sporer. Den kemiska effekten redovisas här för lutlösningen, gruppen klorfria diskmedel samt de två klorhaltiga disklösningarna.

Tabell 13. Mekanisk och kemisk rengöringseffekt på sporer av Bacillus cereus, reduktion i log CFU-enheter.

| | Disktemperatur | | | |
|---|----------------|------|------|------|
| | 35°C | 45°C | 55°C | 65°C |
| <i>Mekanisk</i> effekt (vatten) | 1,8 | 1,5 | 1,7 | 1,6 |
| <i>Kemisk</i> effekt – differens mellan vatten och: | | | | |
| - Lutlösning, 0,1 % | 0,5 | 0,5 | 0,9 | 1,1 |
| - Klorfria diskmedel | 0,5 | 0,8 | 1,1 | 1,2 |
| - Klorhaltiga disklösningar | 1,8 | 3,0 | 3,6 | 3,8 |

Av tabellen framgår att den mekaniska effekten motsvarar en sporreduktion på mellan 1,5 och 1,8 log-enheter beroende på disktemperatur. Den kemiska effekten av lut var relativt måttlig och uppgick till mellan 0,5 och ca 1 log-enhet, vilket var i princip detsamma som den effekt som uppnåddes med de alkaliska klorfria diskmedlen. Betydligt kraftigare kemisk effekt erhöles med de två klorhaltiga lösningarna, där reduktionen uppgick till i storleksordningen 2-4 log-enheter. Resultaten för lutlösningen och de klorfria diskmedlen tyder på att den kombinerade effekten av temperatur och koncentration av aktiv substans inte varit tillräckligt hög för att ge någon direkt avdödande effekt på sporer. Detta till skillnad från de båda klorlösningarna, där den kraftigare reduktionen av sporer beror på en avdödningseffekt (Bloomfield & Arthur, 1994; Kreske et. al., 2006). Klor har en oxidativ effekt som påverkar de annars mycket kemikalieresistenta sporer. Det kan här påpekas att denna oxidativa påverkan gäller alla typer av organiskt material, således även filmjolk, vilket kan förklara den tendens till minskade restmängder filmjolk efter disk som i försöken noterats vid användning av klorhaltiga lösningar.

Sammanfattningsvis visade resultaten med sporer, att för lut och de klorfria diskmedlen var den mekaniska rengöringseffekten större än den kemiska. För de klorhaltiga disklösningarna däremot, var den kemiska effekten uttryckt i absoluta tal minst 100 gånger så stor som den mekaniska. Det sistnämnda gäller vid jämförelser inom samma temperatur, och med undantag av 35°C där den mekaniska och kemiska effekten var lika stor.

Det var genomgående en påfallande liten skillnad mellan de klorfria diskmedlen sinsemellan, med några få undantag fanns inom samma temperatur inga signifikanta skillnader. Något överraskande fanns heller inte några signifikanta skillnader mellan den rena lutlösningen och de klorfria diskmedlen. I modellsystemet har således inte någon effekt kunnat påvisas av de additiv som finns i de kommersiella

diskmedlen, t.ex. tensider och enzymer. Detta skall dock återigen ses med viss reservation för att det använda modellsystemet inte fullt ut återspeglar verkliga förhållanden. Med en termofil biofilm i ett modellsystem för mejeridisk fann Bremer et al. (2006) att disk med 1 % NaOH vid 65°C gav ungefär samma bakteriereduktion som flertalet lutbaserade disklösningar med tillsatser. Några diskmedel med detergent och komplexbildare gav dock bättre effekt än lutlösningen (Bremer et al., 2006).

Vid en eventuell vidareutveckling av metodik och modellsystem vore det önskvärt att få en mer känslig metod, så att även mindre skillnader mellan olika diskmedel går att påvisa.

Vattentemperatur

Enligt de rekommendationer som finns bör disklösningens temperatur under diskfasen hållas vid 60-70°C (Svensk Mjolk, 2003). I samma rekommendationer anges att disklösningens temperatur vid utloppet efter avslutad diskning inte bör understiga 42°C. I den testanläggning som användes var temperaturerna på det utgående vattnet efter disk i stort sett desamma som de disktemperaturer som användes i dessa försök (35, 45, 55 respektive 65°C).

När det gäller sporer gav en ökad disktemperatur generellt sett en större reduktion upp till 55°C. En ytterligare ökning till 65°C resulterade dock inte i något fall i en statistisk säkerställd ökad reduktion. För gruppen klorfria diskmedel samt lösningen med lut var diskeffekten inte signifikant bättre vid 45°C än vid 35°C. Detta kan bero på att klorfria alkaliska diskmedel ofta innehåller lut och andra aktiva ämnen som kräver en viss temperatur för att man ska uppnå önskad effekt. För optimal diskeffekt bör därför disktemperaturen under diskfasen inte understiga 55°C under fem minuters sammanhängande tid. I försöken kunde de olika temperaturerna hållas mer eller mindre konstanta på grund av att mjölkledningen var värmeisolerad. I vanliga oisolerade mjölkkningsanläggningar är det därför viktigt med en tillräckligt hög starttemperatur som leder till att temperaturkravet kan upprätthållas.

Vid diskning med enbart vatten uteblev temperatureffekten vad gäller reduktion av sporer helt och hållet. Detta beror sannolikt på att *Bacillus cereus*-sporererna fäster hårt på ytor (Rönner et al., 1990) och inte påverkas av värme i detta temperaturintervall (Stadhouders et al., 1980). Med filmjolk som smuts däremot, var 35°C disktemperatur med enbart vatten inte tillräckligt för att skölja bort protein och mjölkfett från brickorna. Vid denna temperatur befinner sig inte allt mjölkfettet i smält tillstånd. Disk utan diskmedel gav i allmänhet signifikant högre mätvärden än disk med diskmedel, men skillnaderna var relativt små utom vid 35°C. För alla de övriga disklösningarna som ingick i försöken fanns dock ingen påverkan av disktemperaturen på renheten vid användning av filmjolk. Detta kan bero på att den kombinerade mekaniska och kemiska effekten var tillräckligt stor för att ytorna skulle bli rena utan behov av ökad temperatur (Jennings et al., 1955).

Det är tänkbart att mätmetodens känslighet varit för låg för att tillförlitligt kunna mäta eventuella kvarvarande små mängder filmjolk efter disk med diskmedel. I andra undersökningar har analys av diskade ytor efter svabbning och infärgning med en mikrometod för protein visat sig vara för okänsligt (Faille et al., 2000). Med känsligare metoder, som t.ex. ellipsometri och andra metoder är det möjligt att mäta små mängder protein efter diskning (Karlsson et al., 1999; Verran et al., 2001)

Korta/långa rör

Varken för sporer eller filmjolk kunde någon tydlig skillnad i renhet påvisas mellan de båda längderna på rör där provbrickorna var monterade. De längre rören som användes i testanläggningen var dubbelt så långa än vad som anges som maximal längd i de riktlinjer som finns för hygienisk utformning av mjölkkningsanläggningar (Gustafsson, pers. medd.). Det var därför förväntat att dessa rör skulle ha större restmängder av smuts än de kortare rören. Det var också förväntat att det orienterande diskförsöket med halverad mängd vatten skulle få genomslag och ge betydligt sämre resultat för de långa rören, vilket dock inte blev fallet. En orsak till detta skulle kunna vara att den diskautomat som användes i testanläggningen arbetar med så kallade proppflöden, vilket innebär att vattnet samlas upp till proppar som trycks genom mjölkledningen med hög hastighet. Kraften som byggs upp i dessa vattenproppar kan ge dynamiska effekter som gör att man bättre klarar att rengöra svårdiskade delar av systemet. Det ska här påpekas att det är osäkert vilken diskprincip riktlinjerna för hygienisk utformning har utarbetats för.

Vattenmängd

När det gäller sporer gav en halvering av vattenmängden från 30 till 15 liter ett betydligt sämre diskresultat. I dessa försök användes lut, men med halva mängden vatten begränsades reduktionen av sporer till en nivå motsvarade en rent mekanisk rengöringseffekt, det vill säga vad som uppnåddes vid diskning med enbart vatten, se tabell 13. Man kan förmoda att man även med en betydligt mindre reduktion av vattenmängd än vad som användes i dessa försök, på lite längre sikt kan riskera att få en påbyggnad av beläggningar i praktiska mjölkkningsanläggningar. Resultaten indikerar således vikten av att säkerställa att diskautomaten arbetar med korrekt vattenmängd under hela diskfasen.

Växeldisk

Växeldisk är gynnsamt ur hygiensynpunkt eftersom sura diskmedel bidrar till att lösa upp beläggningar av mineraler och därmed minskar förutsättningarna för att mikroorganismer etablerar sig (Svensk Mjolk, 2003). Resultaten från dessa försök visade att en växeldisk med ett alkaliskt och ett surt diskmedel gav större reduktion av sporer än två konsekutiva diskar med alkaliskt diskmedel. En förklaring till detta kan vara att syra och lut påverkar sporer på principiellt olika sätt. Genom att tillämpa växeldisk med surt och alkaliskt diskmedel får man då en additiv effekt som resulterar i en större reduktion av sporer än om endast en typ av diskmedel används. Liknande effekter har påvisats i andra studier, t.ex. att effekten på sporer av ett desinfektionsmedel ökade kraftigt efter suboptimal disk med lut (Langsrud et al., 2000).

Slutsatser

Med den testanläggning och metodik som användes i dessa studier är de viktigaste slutsatserna från projektet följande:

- Alkaliska diskmedel utan klor gav betydligt lägre reduktion av *Bacillus cereus*-sporer än disklösningar som innehöll klor.
- Alla klorfria alkaliska diskmedel gav i princip likvärdigt diskresultat, således var det heller inga skillnader mellan pulvermedel och de i flytande form.
- Samtliga diskmedel gav för ögat rena ytor med filmjök som smuts.
- Under diskfasen bör disklösningens temperatur vara 55°C.
- En ökning av disklösningens temperatur från 55°C till 65° förbättrade inte diskresultatet.
- Det är viktigt att diskningen utförs med korrekt vattenmängd.
- Växeldisk med ett alkaliskt och ett surt diskmedel gav större reduktion av sporer än två diskor med alkaliskt diskmedel.

Referenser

- Andersson, A., Rönner, U. & Granum, P.E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* 28: 145-155.
- Benfalk, C., Lindahl, C., Gustafsson, M. & Christiansson, A. 2008. Pastöriseringsöverlevande bakterier – hur elimineras de i mjölkkningsanläggningen? Slutrapport till Stiftelsen Lantbruksforskning, projekt 0430008, www.lantbruksforskning.se.
- Bloomfield, S.F. & Arthur, M. 1994. Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides. *J. of Appl. Bact.* 76: 91S-104S.
- Bremer, P.J., Fillery, A. & McQuillan, A.J. 2006. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilm. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 254-262.
- Christiansson, A., Bertilsson, J. & Svensson, B. 1999. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J. Dairy Sci.* 82: 305-314.
- Christiansson, A. 2001. Avdödning av *Bacillus cereus*-sporer i suspension och på ytor. Effekt av olika diskmedel, diskparametrar och desinfektionsmedel. En sammanfattning av 3 hygienprojekt. Rapport nr 4996, Svensk Mjölksforskning, Lund.
- Davey, M.E. & O'Toole, G. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847-867.
- Engstrand, U. & Olsson, U. 2003. Variansanalys och försöksplanering. Lund, Studentlitteratur.
- Faille, C., Membre, J-M., Tissier, J-P, Bellon-Fontaine, M-N., Carpentier, B., Laroche, M-A. & Benezech, T. 2000. Influence of physicochemical properties on the hygienic status of stainless steel with various finishes. *Biofouling* 15: 261-274.
- Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M.N., Slomianny, C. & Benezech, T. 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* 48(8): 728-38.
- 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.
- Frank, J.F. & Koffi, R.A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactants sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53: 550-554.
- Husmark, U., Faille, C., Rönner, U., Benezech, T. 1999. *Bacillus* spores and moulding with TTC agar: a useful method for the assessment of food processing equipment cleanability. *Biofouling* 14; 15-24.
- Jennings, W.G., McKillop, A. A. & Luick, J.R. 1955. Circulation cleaning. *J. Dairy Sci.* 42: 1471-1479
- Karlsson, C., Wahlgren, M.C. & Trägårdh, A.C. 1999. Some surface-related aspects of the cleaning of new and reused stainless-steel surfaces fouled by protein. *Int. Dairy J.* 8: 925-933.
- Kreske, A.C., Ryu, J.H. & Beuchat, L.R. 2006. Evaluation of chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer for effectiveness in killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in suspensions, on the surface of stainless steel, and on apples. *J. Food Prot.* 69(8): 1892-1903.

- Kumar, G.C. & Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42: 9-27.
- Langsrud, S., Bardsen, B. & Sundheim, G. 2000. Potentiation of the lethal effect of peroxygen on *Bacillus cereus* spores by alkali and enzyme wash. *Int. J. Food Microbiol.* 56: 81-86.
- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. & Schonberrger, O. 2006. *SAS FOR Mixed Models*, Second ed. Cary, N. C., SAS Institute Inc.
- 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.
- 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.
- Peng, J-S., Tasi, W-C. & Chou, C-C. 2007. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* 77: 11-18.
- Ryu, J.H. & Beuchat, L.R. 2005. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J. Food Prot.* 68(12): 2614-2622.
- Rönner, U., Husmark, U. & Henriksson, A. 1990. Adhesion of bacillus spores in relation to hydrophobicity. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 550-556.
- SAS Institute Inc. 2008: *SAS/Stat 9.2 User's Guide*, Cary, N. C., SAS Institute Inc.
- Stadhouders, J., Hup, G. & Langeveld, L.P.M. 1980. Some observations on the germination, heat resistance and outgrowth of fast-germinating and slow-germinating spore of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Neth. Milk Dairy J.* 34: 215-228.
- 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.
- Svensk Mjölk. 2003. Mjölknings (T 2686-5). Häfte i serien: Kvalitetssäkrad mjölkproduktion.
- Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H., & Christiansson, A. 2004. Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different silo plants. *International Dairy Journal* 14: 17-27.
- Verran, J., Boyd, R.D., Hall, K. & West, R.H. 2001. Microbiological and chemical analyses of stainless steel and ceramics subjected to repeated soiling and cleaning treatments. *J. Food Prot.* 64: 1377-1387.
- Wijman, J.G., de Leeuw, P.P., Moezelaar, R., Zwietering, M.H. & Abee, T. 2007. Air-liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(5): 1481-1488.

Personligt meddelande

Gustafsson, Mats. Forskare, JTI, Uppsala.

Webbsidor

www.brakemrad.se

JTI – Institutet för jordbruks- och miljöteknik...

... är ett industriforskningsinstitut som forskar, utvecklar och informerar inom områdena jordbruks- och miljöteknik samt arbetsmaskiner. Vårt arbete ger dig bättre beslutsunderlag, stärkt konkurrenskraft och klokare hushållning med naturresurserna.

Vi publicerar regelbundet notiser på vår webbplats om aktuell forskning och utveckling vid JTI. Du får notiserna hemskickade gratis om du anmäler dig på www.jti.se

På webbplatsen finns även publikationer som kan läsas och laddas hem gratis, t.ex.:

JTI-informerar, som kortfattat beskriver ny teknik, nya rön och nya metoder inom jordbruk och miljö (4-5 teman/år).

JTI-rapporter, som är vetenskapliga sammanställningar över olika projekt.

Samtliga publikationer kan beställas i tryckt form. JTI-rapporterna och JTI-informerar kan beställas som lösnummer. Du kan också prenumerera på JTI-informerar.

*För trycksaksbeställningar, prenumerationsärenden m.m.,
kontakta vår publikationstjänst (SLU Service Publikationer):*

tfn 018 - 67 11 00, fax 018 - 67 35 00

e-post: bestallning@jti.se



JTI - Institutet för jordbruks- och miljöteknik

JTI - Swedish Institute of Agricultural and Environmental Engineering

Box 7033, 750 07 UPPSALA

Telefon: 018 - 30 33 00

Besöksadress: Ultunaallén 4

Telefax: 018 - 30 09 56

Webbplats: www.jti.se