MIKROBIOLOGISK UNDERSØGELSE AF MÆLK OG VAND I FORBINDELSE MED TEST I TANZANIA AF MÆLKEPASTEURISERINGSAPPARAT OG VANDPASTEURISERINGSAPPARAT VED ANVENDELSE AF SOLENERGI

Microbiological examination of milk and water in relation to test performed in Tanzania of two new devices for pasteurization using solar energy.

Flemming Boisen

Laboratoriechef, dyrlæge

Fødevareregion Fyn

Mikrobiologisk Laboratorium

Lille Tornbjerg Vej 24 B

5220 Odense SØ

Denmark

16.05.2000

INDHOLDSFORTEGNELSE

MIKROBIOLOGISK UNDERSØGELSE AF MÆLK OG VAND 1

Microbiological examination of milk and water 1

1. SAMMENDRAG 4

2. SUMMARY 5

3. INTRODUKTION 6

4. FORMÅL 6

5. PRINCIP 6

5.1 Mælk 6

5.2 Vand 6

5.3 Modermælk 7

6. DELTAGERE 7

7. TID OG STED 8

8. MATERIALER OG METODER 8

8.1. Materialer 8

8.2 Analysemetoder 8

8.3 Testbakterier 9

8.4 Fremgangsmåde og prøveudtagning 10

9. RESULTATER OG DISKUSSION 11

9.1 Resultater af feltundersøgelser, udført i Dar es Salaam 11

9.2 Resultater af undersøgelser af mælk, udført i Odense 20

9.3. Resultater af undersøgelser af vand, udført i Odense 27

9.4 Resultater af supplerende undersøgelser af vand, udført i Odense 29

9.5 Verifikationsundersøgelser på vandprøver, udført i Odense 31

10. KONKLUSION 33

10.1 Vedrørende apparat til pasteurisering af mælk i portioner 33

10.2 Vedrørende det bærbare vandpasteuriseringsapparat 33

11. REFERENCER 35

1. SAMMENDRAG

I februar-marts 2000 blev 84 prøver af mælk og 30 prøver af vand undersøgt mikrobiologisk i forbindelse med test af et nyt apparat til pasteurisering af mælk i portioner og et nyt bærbart vandpasteuriseringsapparat, der begge blev drevet af solenergi. Mælken blev leveret af to kvægfarme i Dar es Salaam og vandet blev opsamlet i Mlalakuwa River. Efter varmebehandlingen i mælkepasteuriseringsapparatet blev mælkeprøverne analyseret for kimtal og coliforme bakterier samt Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae og Salmonella Typhimurium (de 4 sidstnævnte tilsat som testorganismer i visse prøver). Der blev desuden udført en fosfataseprøve og en peroxydaseprøve. Vandet blev efter varmebehandlingen i vandpasteuriseringsapparatet analyseret for kimtal og coliforme bakterier samt Escherichia coli og Salmonella Typhimurium (de 2 sidstnævnte tilsat som testorganismer i visse prøver).

En række afprøvninger af apparatet til pasteurisering af mælk i portioner viste, at det var muligt gennem langtidspasteurisering at opnå en drabseffekt på bakterier svarende til lavpasteurisering. Kimtalsreduktionen var i størrelsesordenen 10^3-10^4. Varmebehandlingen af mælk bør ikke være under ca. 68°C i 30 min. En holdbarhedsprøvning viste, at mælken bør afkøles hurtigt for at hindre organoleptiske forandringer på grund af vækst af overlevende Bacillus bakterier. Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae og Salmonella kunne ikke påvises i prøverne efter varmebehandlingen ved 63°C.

Tilsvarende viste afprøvningerne af det bærbare vandpasteuriseringsapparat, at kimtallet kunne reduceres i størrelsesordenen 10^3-10^4 ,og Escherichia coli og Salmonella kunne ikke påvises efter varmebehandlingen. Vandprøverne indeholdt derimod en del Bacillus bakterier, som tilsyneladende gav reaktion i MPN-metoden for coliforme bakterier. Det er ikke muligt i denne undersøgelse at bestemme en eksakt tid-temperaturkombination, men de foreliggende analysedata peger på, at varmebehandlingen af vand bør gennemføres til ca. 70°C, målt som ventiltemperatur.

Laboratorieundersøgelserne blev udført dels i forbindelse med feltforsøgene i et temporært etableret laboratorium i Sonet Building, Dar es Salaam, Tanzania, og dels blev en række prøver transporteret under køl til Danmark og analyseret hos Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium, Odense.

De to testede typer af solenergi opvarmede pasteuriseringsapparater har vist sig virkningsfulde og har demonstreret en dekontamineringseffekt på henholdsvis mælk og vand med henblik på at forbedre den sundhedsmæssige kvalitet ud fra en mikrobiologisk vurdering.

2. SUMMARY

During February-March 2000 in Dar es Salaam, Tanzania 84 samples of milk and 30 samples of water were examined microbiologically in order to test of a new "Batch Milk Pasteuriser" and a new "Portable Water Decontaminator" using solar power for decontamination. The milk originated from two farms in Dar es Salaam and the water was sampled in Mlalakuwa River. Before heat treatment some of the milk samples were spiked with Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and Salmonella Typhimurium, and some of the water samples were spiked with Escherichia coli and Salmonella Typhimurium. After heat treatment in the devises samples of milk were microbiologically examined for total viable count (TVC), coliforms, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and Salmonella Typhimurium. Samples of water were microbiologically examined for TVC, coliforms, Escherichia coli and Salmonella.

After heat treatment at 63°C Escherichia coli, Staphyloccus aureus, Streptococcus agalactiae and Salmonella were absent. A TVC-reduction of approx. 10^3-10^4 was shown. However, thermophilic and mesophilic Bacillus sp. were not inactivated during the pasteurization. These bacteria may reduce the keeping quality of the milk. Furthermore, Bacillus sp. most likely interferred when MPN-method for coliforms was performed, but the level of positive reactions showed a contamination < 1/ml of water.

According to the data of analyses present, pasteurization of milk in the "Batch Milk Pasteuriser" should be performed not below 68°C. Pasteurization of water in the "Portable Water Decontaminator" should be performed not below 70°C.

The examination of samples was performed in the field in a temponary established laboratory in the Sonet Building, Dar es Salaam, Tanzania. Furthermore, chilled samples were transferred to Denmark and approx. 24 h. after the pasteurization examined at the Regional Veterinary and Food Administration, Microbiology Laboratory, Odense.

Heat treatment of milk in the "Batch Milk Pasteuriser" and of water in the "Portable Water Decontaminator" using solar energy has shown a decontamination effect in order to improve the health quality of milk and water from a microbiologically point of view.

3. INTRODUKTION

Forskningsleder, læge Anders Fjendbo Jørgensen, Brændekilde Væde Vej 36, 5250 Odense SV, har som rekvirent anmodet Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium om at udføre laboratorieundersøgelser i Tanzania af mælk og vand i forbindelse med test af nyudviklede apparater til pasteurisering af mælk og vand. Opgavens art og omfang er beskrevet i samarbejdsaftale af 28.01.2000. Aftalen indgår i et forskningsprojekt støttet af Rådet for Ulandsforskning under titlen:

"Pasteurization of Milk Using Solar Energy".

Der henvises til samarbejdsaftalens projektbeskrivelse som indeholder 3 moduler:

1. Forarbejde hos Fødevareregion Fyn,
2. Feltarbejde i Tanzania,
3. Undersøgelse af prøver udtaget under feltarbejdet i Tanzania og transporteret til analyse hos Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium.

4. FORMÅL

Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium har medvirket i forskningsprojektet med en konsulentfunktion. Formålet har været at gennemføre en række mikrobiologiske undersøgelser i Tanzania af apparaternes dekontamineringseffekt på bakterier i mælk og vand. Prøver af mælk og vand skulle undersøges såvel for naturligt indhold af bakterier som for indhold af tilsatte testbakterier, ligesom holdbarhedsundersøgelser også skulle indgå. På baggrund heraf skulle gives en mikrobiologisk vurdering af apparaternes ydeevne ved forskellige temperaturer. Undersøgelsen skulle foretages ved anvendelse af anerkendte metoder, afpasset de specielle forsøgsforudsætninger.

5. PRINCIP

5.1 Mælk

Apparatet til opvarmning af mælk i portioner består af et langovalt isoleret kar af rustfri stål med 20 liter vand (vandkappen) hvori placeres 6 rustfri cylinderformede beholdere á 2000 ml, der hver fyldes med den portion mælk, som ønskes pasteuriseret. Vandkappen opvarmes ved hjælp af varmt vand fremstillet i solpaneler og varmeeffekten overføres til mælken. Den ønskede pasteuriseringstemperatur i mælken (vandkappen) opretholdes over tid ved hjælp af et termostatstyret ventilsystem og to vandbeholdere (simtanke) til udligning af vand. I det følgende kaldes dette apparat for "Pasteurieringsapparat til mælk i portioner", (mælkepasteuriseringsapparat).

5.2 Vand

Apparatur til opvarmning af vand består af en sortmalet cylinder af rustfri stål, ca. 1000 ml. Heri påfyldes det vand som ønskes pasteuriseret og opvarmningen af vandet sker ved varmeveksling af lysstrålernes energi via et specielt spejlreflekssystem. Den sorte "råvandsbeholder" er via en ventil, der åbnes ved en specifik temperatur, forbundet med en flaske til opsamling af det varmebehand-

lede vand. Denne flaske kan f.eks. være en plastflaske på 0,5-1,5 liter af typen som er almindelig kendt og anvendt til mineralvand og Coca-Cola (PET-flasker). Disse flasker er meget almindelige i Tanzania. Efter opsamling af det pasteuriserede vand skrues plastflasken af, påsættes låg og efter passende afkøling er vandet klar til brug. I det følgende kaldes dette apparat for "Det bærbare vandpasteuriseringsapparatet" (vandpasteuriseringsapparat).

5.3 Modermælk

Termobeholder til pasteurisering af modermælk blev testet med anvendelse af prøver af komælk og vand. Dette apparat kaldes "Modermælkspasteuriseringsapparat" (se reference, afsnit 11.3).

6. DELTAGERE

Projektet er udført som et samarbejdsprojekt der involverer:

- Speciallæge i tropemedicin Anders J. Fjendbo Jørgensen (AFJ)(forskningsleder, rekvirent), ansvar for teknisk afprøvning af vandpasteuriseringsapparatet og termobeholderen til modermælk, endvidere for transport af supplerende vandprøver til Danmark.

- Smed, faglærer Henning Knudsen, Odense Tekniske Skole, teknisk rådgiver, med ansvar for konstruktion af mælkepasteuriseringsapparatet og for drift af dette under den praktiske afprøvning i Dar es Salaam, Tanzania.

- Jonas Nøhr Jørgensen, stud.mag. (antropologi), teknisk assistent og rådgiver.

- Morten Østergaard-Nielsen, stud.med., teknisk assistent og rådgiver.

- Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium.

    - Laboratoriechef, dyrlæge Flemming Boisen (FB), mikrobiologisk projektleder, med ansvar for valg af testmetoder, indretning af et temporært laboratorium og udførelse af de mikrobiologiske feltanalyser i Dar es Salaam, Tanzania, transport af prøver til Danmark, samt udarbejdelse af denne rapport.

    - Laboranterne Marie-Louise Schmidt-Nielsen, Anette Knudsen og Marianne Salling Lorentzen har udført forberedende test samt gennemført de mikrobiologiske analyser af mælke- og vandprøver, udtaget i Tanzania og transporteret til Danmark. Laboratoriets øvrige laboranter har endvidere deltaget i fremstilling af de nødvendige materialer.

- SONET, The Solar Network of Tanzania, en Non-Governmental Organization (chairperson Ruth Shija) i hvis bygning alle feltundersøgelser blev udført. Dansk medlem er bl.a. Kirsten Nørh, Advisor for Development Assistance for Women, Country Programme, Tanzania.

- Myndigheder, instituttet, firmaer og Den Kgl. Danske Ambassade i Dar es Salaam. Desuden er WHO og UNDP orienteret om projektet.

7. TID OG STED

Forundersøgelser og forberedelse blev udført i perioden oktober 1999 – februar 2000. Projektets mikrobiologiske feltundersøgelser blev gennemført i perioden 26.2.-7.3.2000 i SONET Building, Dar es Salaam, Tanzania. Transport af prøver fra Tanzania til Danmark blev foretaget 8.3.2000 og 15.3.2000. Mikrobiologiske analyser af prøver i Fødevareregion Fyn's Laboratorium, Odense blev udført i perioden 8.3.-3.4.2000.

8. MATERIALER OG METODER

8.1. Materialer

Undersøgelsen omfatter 64 prøver af mælk og 19 prøver af vand, der blev undersøgt på det temporære feltlaboratorium i SONET Building, Dar es Salaam. Endvidere blev 20 prøver af mælk og 11 prøver af vand analyseret efter transport fra Tanzania til Danmark hos Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium, Odense.

Pasteuriserede prøver til undersøgelse i feltlaboratoriet i SONET Building blev udtaget i specialdesignede sterile stomacherposer, i sterile 100 ml plastflasker med skruelåg, i plastflaske til omsamling af pasteuriseret vand, eller i en sutteflaske (glasflaske) til pasteurisering af vand/mælk i modermælkspasteuriseringsapparatet.

De 20 prøver af mælk og 6 prøver af vand til analyse hos Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium i Odense, blev 7.3.2000 udtaget i 100 ml sterile plastflasker med skruelåg, pakket i en special termocontainer med fryseelementer og transporteret heri med KLM til Amsterdam og Maersk Air til Billund. Ved åbning af containeren 8.3.2000 kl. 14 blev foretaget en kontrolmåling af temperaturen i en vandprøve, og analyserne blev straks igangsat.
Supplerende 5 vandprøver blev af Anders F. Jørgensen og Morten Østergaard-Nielsen udtaget 14.3.2000 i 100 ml sterile plastflasker og transporteret under køl med fly til Danmark, hvor prøverne blev modtaget hos Fødevareregion Fyn i Odense 15.3.2000 kl. 17:30, og analyserne blev straks igangsat.

8.2 Analysemetoder

Ved undersøgelse af mælk i Fødevareregion Fyn's laboratorium blev anvendt:

Kimtal ved 30°C: "Veterinærdirektoratet's cirkulære af 10.11.1993. Aerobe mikroorganismer i rå mælk og mælkeprodukter".

Coliforme bakterier: "IDF-standard nr. 73A:1985. Enumeration of Coliforms. Milk and Milk Products".

Staphylococcus aureus: "NMKL-metode nr. 66, 3. udgave, 1999. Koagulase positive stafylokokker. Bestemmelse i næringsmidler".

Streptococcus agalactiae: "Udsæd i Blod Agar, in-house metode".

Salmonella: "NMKL-metode nr. 71, 5. udgave, 1999. Salmonella. Bestemmelse i levnedsmidler".

Fosfataseaktivitet: "Veterinærdirektoratets cirkulære af 10.11.1993. Bestemmelse af fosfataseenzym i mælk og mælkeprodukter som kontrol på lavpasteurisering".

Peroxydaseaktivitet: "Veterinærdirektoratets cirkulære af 10.11.1993. Bestemmelse af peroxydaseenzym i mælk og mælkeprodukter som kontrol på højpasteurisering".

Ved undersøgelse af mælk ved feltundersøgelserne i det temporære laboratorium i Dar es Salaam samt ved supplerende analyse hos Fødevareregion Fyn's laboratorium blev anvendt:

Kimtal ved 37°C: "NMKL-metode nr. 146, 1993, modificeret (37°C/48 t.). Aerobe mikroorganismer. Bestemmelse i levnedsmidler ved Petrifilm".

Coliforme bakterier og Escherichia coli: "NMKL-metode nr. 147, 1993. Koliforme bakterier og Escherichia coli i levnedsmidler ved Petrifilm".

Ved undersøgelse af vand i Fødevareregion Fyn's laboratorium blev anvendt:

Kimtal ved 30°C: "DS-metode nr. 2251, 1. udgave, 1983, modificeret. Bestemmelse af aerobt kimtal".

Kimtal ved 37°C: "DS-metode nr. 2254, 1. udgave, 1983. Bestemmelse af aerobt kimtal".

Coliforme bakterier og Escherichia coli: "DS-metode nr. 2255, 1. udgave, 1983. (MPN). Vandundersøgelse. Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier".

Salmonella: Som beskrevet under mælk.

Ved undersøgelse af vand ved feltundersøgelserne i det temporære laboratorium i Dar es Salaam samt ved supplerende analyse hos Fødevareregion Fyn's laboratorium blev anvendt:

Kimtal ved 37°C: Bestemmelse ved Petrifilm som beskrevet under mælk.

Coliforme bakterier og Escherichia coli: Bestemmelse ved Petrifilm som beskrevet under mælk.

8.3 Testbakterier

For at teste mælkepasteuriseringsapparatets og det bærbare vandpasteuriseringsapparats varmebehandlingseffekt på forskellige testbakterier blev råmælksprøverne 7.3.2000 tilsat en kendt mængde af teststammer fra Mikrobiologisk Laboratoriums kultursamling, således:

- Escherichia coli, teststamme nr. 6 (oprindelse ATCC 10536), indikator på fækal forurening med patogene bakterier
- Salmonella Typhimurium, teststamme nr. 710 (oprindelse fjerkræ), patogen bakterie der kan forekomme i mælk

- Staphylococcus aureus, teststamme nr. 266 (oprindelse KVL), patogen bakterie der kan forekomme i mælk
- Streptococcus agalactiae, teststamme nr. 357 (oprindelse SVS), indikator på forekomst af yver-streptococcer, hvoraf nogle kan være patogene

Teststammerne blev opformeret i Brain Hearth Infusion (BHI) ved 37°C i ca. 21 t. og derefter tilsat i 2000 ml mælk i kendte niveauer.

For at teste det bærbare vandpasteuriseringsapparats varmebehandlingseffekt på forskellige testbakterier blev råvandsprøven 7.3.2000 tilsat kendte niveauer af Escherichia coli, teststamme nr. 6 og Salmonella Typhimurium, teststamme nr. 710.

8.4 Fremgangsmåde og prøveudtagning

8.4.1 Vandprøver

Flodvand og andet overfladevand er almindelig anvendt som råvand til drikkevand. Vi besluttede derfor daglig at udtage råvandsprøver direkte fra Mlalakuwa River i nordlige Dar es Salaam.

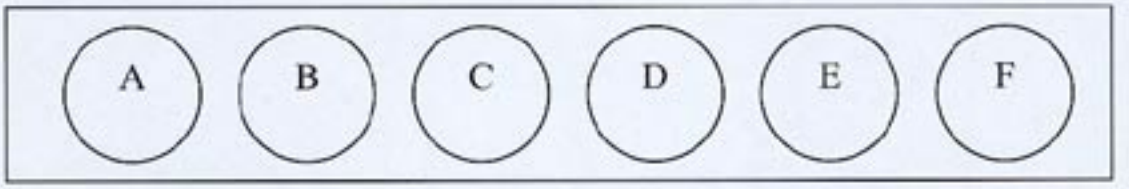
Der blev daglig udtaget 5-10 liter vand fra Mlalakuwa River i plastdunke. Vandet blev undersøgt for kimtal ved 37°C i 48 t. samt coliforme bakterier og Escherichia coli, alt ved brug af Petrifilm-teknikken. Denne råvandsprøve blev herefter anvendt til et eller flere varmebehandlingsforsøg i det bærbare vandpasteuriseringsapparat ved forskellige ventilåbningstemperaturer, normalt 64°- og 74°- ventil, men også ventilåbning på 43° blev afprøvet.

Alle vandprøver blev mærket "W" efterfulgt af løbenr.

8.4.2 Mælkeprøver

Komælk blev leveret daglig under feltarbejdet fra to forskellige farme, begge i Dar es Salaam. Besætningerne blev forinden godkendelse som mælkeleverandører til projektet kontrolleret sundhedsmæssigt af dyrlæge Flemming Boisen.

Der blev daglig leveret mælk fra 2 køer fra Odunga's Farm (Dichori og Mbinga) samt 3 køer fra Erica's Farm (Licho, Liche og Nice). Mælken blev leveret i plastdunke med mindst 2 liter pr. ko. Hver af de 5 råmælksprøver blev undersøgt for kimtal ved 37°C i 48 t. samt coliforme bakterier og Escherichia coli, alt ved brug af Petrifilm-teknikken. Der skulle daglig bruges 6 portioner á 2 liter til de 6 forskellige beholdere i mælkepasteuriseringsapparatet hvorfor råmælk fra visse køer blev fordelt i to forskellige mælkebeholdere. De 6 mælkebeholdere blev systematisk mærket A, B, C, D, E og F og opstillet hver dag i pasteuriseringsapparatets vandkar i samme rækkefølge.



Figur 1. Placering af de 6 mælkebeholdere

På visse dage hvor mælkeforsyningen svigtede blev 2 liter-beholderne fyldt med vand eller steriliseret mælk som blindprøver for at belaste apparatet ens under drift. Ved at holde mælkeprøverne adskilt pr. ko, fik vi således også flere råmælksvarianter før varmebehandlingen.

Alle mælkeprøver blev mærket "M" efterfulgt af løbenr.

8.4.3 Andre forsøg

Enkelte vandprøver og enkelte mælkeprøver blev desuden forsøgsmæssigt varmebehandlet i termobeholderen til pasteurisering af modermælk. Disse prøver blev også mærket med "M" eller "W".

8.4.4 Holdbarhedsprøvning

Under udførelse af feltundersøgelserne blev der foretaget en holdbarhedsprøvning af pasteuriseret mælk. To portioner blev opbevaret i 24 t. i kølebox, to portioner blev opbevaret ved 25°C og to portioner blev opbevaret ved ca. 30°C inden den laboratoriemæssige undersøgelse blev udført.

8.4.5 Prøver transporteret til Odense

Alle mælke- og vandprøver, der blev transporteret til laboratorieundersøgelse i Odense, blev analyseret straks efter modtagelsen. Endvidere blev resterende prøvemængder opbevaret ved +5°C i yderligere 24 t. og 48 t. og herefter analyseret for kimtal, svarende til analyse henholdsvis 24 t., 48 t. og 72 t. efter prøveudtagningstidspunktet.

9. RESULTATER OG DISKUSSION

I dette afsnit er undersøgelsesresultaterne vist og diskuteret i den rækkefølge hvert forsøg blev gennemført i felten.

9.1 Resultater af feltundersøgelser, udført i Dar es Salaam

Tabel 1. Resultater af varmebehandlingsforsøg udført 28.2.2000.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Coliforme bakterier pr.ml	Escherichia coli pr.ml
M1	Mælk, Dichori, A	14.000	50	2
M2	Mælk, Dichori, B	17.000	44	2
M3	Mælk, Mbinga, C	47.000	150	3
M4	Mælk, Mbinga, D	44.000	160	7
M5-M8	Mælkeprøverne blev ikke pasteuriseret p.g.a. apparatfejl			
M9	Mælk fra M1, varmebehandlet i termobeholder til modermælk, 62°C i 30 min.	27		
W1	Vand, Mlalakuwa River E, F	280.000	3	< 1
W2	Vand, Mlalakuwa River	290.000	2	< 1
W3-W4	Vandprøverne blev ikke pasteuriseret p.g.a. apparatfejl			
W5	Vand fra W2, behandlet i vand-pasteuriseringsapparatet ved 64°C	550		
W6	Vand fra W1, behandlet i termobeholder til modermælk, 60°-62°C i 30 min.	800		

I tabel 1 er vist resultaterne af de indledende undersøgelser af rå mælk fra Dichori og Mbinga, M1-M4 i pasteuriseringsapparatets position A-D, samt af rå vand fra Mlalakuwa River, W1 og W2, der blev tilsat beholder E og F af hensyn til belastningen. Det fremgår, at den rå mælk indeholdt både coliforme bakterier og E.coli, mens vandet ikke indeholdt E.coli på undersøgelsestidspunktet. Der blev denne dag ikke undersøgt prøver fra mælkepasteuriseringsapparatet p.g.a. apparatfejl. Vandet blev behandlet dels i det bærbare vandpasteuriseringsapparat (W5), dels i termobeholderen til modermælk (W6). I begge tilfælde ses ca. 1000 gange reduktion af kimtallet.

Tabel 2. Resultater af varmebehandlingsforsøg udført 29.2.2000.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Coliforme bakterier pr.ml	Escherichia coli pr.ml
M10	Mælk, Dichori, A	8.800.000	> 10.000	2.200
M11	Mælk, Mbinga, B	3.600.000	> 10.000	1.200
M12	Mælk, Licho, C	14.000	180	70
M13	Mælk, Liche, D	2.100.000	240	80
M14	Mælk, Nice, E	190.000	> 10.000	40
M15	Mælk, pasteuriseret fra M 10	5.200	< 1	< 1
M16	Mælk, pasteuriseret fra M 11	10.000	< 1	< 1
M17	Mælk, pasteuriseret fra M 12	18.000	< 1	< 1
M18	Mælk, pasteuriseret fra M 13	3.200	< 1	< 1
M19	Mælk, pasteuriseret fra M 14	7.600	< 1	< 1
W7	Vand, Mlalakuwa River	480.000	55	10
W8	Vand, pasteuriseret fra W7 F	820	< 1	< 1
W9	Vand, behandlet i vandpasteuriserings apparatet med 43°-ventil	1.000	3	1
W10	Vand, behandlet i vandpasteuriserings apparatet med 64°-ventil	110	< 1	< 1

29.2.2000 blev der påvist meget høje kimtal i flere af prøverne af rå mælk, se tabel 2. Der fandtes også højt indhold af coliforme bakterier og E.coli ligesom der denne dag var E.coli i vandprøven fra Mlalakuwa River. Behandlingen af mælken forløb p.g.a. vejrforholdene kun op til 58°C og varede ca. 4 t. Derfor blev der ikke opnået den tilstræbte kimtalsreduktion, mens coliforme bakterier og E.coli ikke kunne påvises. P.g.a. det lange tidsforløb med gunstige betingelser for bakterievækst konstateredes ved organoleptisk undersøgelse, at M15 var sur, M16 var syrlig, mens M17, M18 og M19 fandtes uden bemærkninger. Varmebehandlingen var generelt utilfredsstillende.

Vand behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 43°C-ventil indeholdt som forventet et højere kimtal, og der kunne påvises coliforme bakterier og E.coli. Ved brug af 64°-ventil reduceredes kimtallet 10 gange mere, og der kunne ikke påvises coliforme bakterier og E.coli.

Tabel 3. Resultater af varmebehandlingsforsøg udført 1.3.2000.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Coliforme bakterier pr.ml	Escherichia Coli pr.ml
M20	Mælk, Dichori, A	280.000	3.200	90
M21	Mælk, Mbinga, B	570.000	3.800	120
M22	Mælk, Licho, C	12.000	560	10
M23	Mælk, Liche, D	45.000	6.100	< 10
M24	Mælk, Mbinga, E	22.000	1.200	80
M25	Mælk, Dichori, F	130.000	5.300	90
M26	Mælk, pasteuriseret fra M 20	19	< 1	< 1
M27	Mælk, pasteuriseret fra M 21	27	< 1	< 1
M28	Mælk, pasteuriseret fra M 22	29	< 1	< 1
M29	Mælk, pasteuriseret fra M 23	45	< 1	< 1
M30	Mælk, pasteuriseret fra M 24	29	< 1	< 1
M31	Mælk, pasteuriseret fra M 25	16	< 1	< 1
W11	Vand, Mlalakuwa River	890.000	380	160
W12	Vand, behandlet i vandpasteuriserings apparatet med 74°-ventil	220	< 1	< 1

Det fremgår af tabel 3, at de rå mælkeprøver og vandprøver indeholdt kimtal i niveauet mellem 10^4 og 10^6 samt et betydeligt antal coliforme bakterier, herunder også E.coli. Pasteuriseringen i mælke-pasteuriseringsapparatet blev udført ved 69°C i 30 min. Varmevandet i apparatet var 72°C da de 6 portioner med mælk blev placeret og det tog 65 min. at opnå 69°C. Pasteuriseringstemperaturen skulle have været 62°C, men spærreventilen med kølevand fungerede ikke optimalt ved forsøget. Til gengæld var pasteuriseringen effektiv, medførende et lavt kimtal i mælkeprøverne og ingen coliforme bakterier kunne påvises. Den organoleptiske undersøgelser af mælken viste, at M26 havde en svag branket smag, mens prøver M27-M31 var uden bemærkninger. Mælkens pasteurisering var tilfredsstillende ud fra en mikrobiologisk vurdering, men behandlingen er på grænsen til at give sensoriske forandringer. Kimtallet i vandet blev reduceret >1000 gange, og coliforme bakterier samt E. coli kunne ikke påvises.

Tabel 4. Resultater af varmebehandlingsforsøg udført 3.3.2000.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Coliforme bakterier pr.ml	Escherichia Coli pr.ml
M32	Mælk, Dichori, A	23.000	50	< 10
M33	Mælk, Mbinga, B	66.000	120	30
M34	Mælk, Licho, C	55.000	270	20
M35	Mælk, Liche, D	390.000	11.000	60
M36	Mælk, Nice, E	74.000	3.200	60
M37	Mælk, Dichori, F	18.000	60	< 10
M38	Mælk, pasteuriseret fra M 32	51	< 1	< 1
M39	Mælk, pasteuriseret fra M 33	200	< 1	< 1
M40	Mælk, pasteuriseret fra M 34	140	3	< 1
M41	Mælk, pasteuriseret fra M 35	92	1	< 1
M42	Mælk, pasteuriseret fra M 36	96	< 1	< 1
M43	Mælk, pasteuriseret fra M 37	240	< 1	< 1
M44	Mælk, fra M32, behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 64°-ventil	14	< 1	< 1
M45	Mælk, fra M33, behandlet i termobeholder til modermælk ved 62°C i 30 min.	22	< 1	< 1
W13	Vand, Mlalakuwa River	2.300.000	5.800	180
W14	Vand, fra W13, behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 64°-ventil	300	< 1	< 1
W15	Vand, fra W13, behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 64°-ventil	320	< 1	< 1

Ved forsøgene 3.3.2000 blev mælkepasteuriseringen gennemført ved 61°-63°C i 30 min., hvorved kimtallene som forventet blev højere end kimtallene 1.3.2000. Tillige fandtes 1-3 coliforme bakterier i to af prøverne. Ved organoleptisk undersøgelse havde M38 en meget svag branket lugt mens prøverne M39-M43 ikke gav bemærkninger. Yderligere blev to mælkeprøver behandlet i det bærbare vandpasteuriseringsapparat samt i termobeholderen til pasteurisering af modermælk. Der fandtes herefter lave kimtal og ingen coliforme bakterier.

Det rå vand fra Mlalakuwa River indeholdt et meget højt kimtal tillige med coliforme bakterier og E.coli. Efter behandling i vandpasteuriseringsapparatet fandtes en kimtalsreduktion på 10^4 og ingen coliforme bakterier.

Tabel 5. Resultater af varmebehandlingsforsøg udført 4.3.2000. De mikrobiologiske undersøgelser blev udført 5.3.2000 efter opbevaring af mælkeprøverne i ca. 24 t.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Coliforme bakterier pr.ml	Escherichia coli pr.ml
M46	Mælk, pasteuriseret fra Dichori, A	19	< 1	
M47	Mælk, pasteuriseret fra Mbinga, B	76	< 1	
M48	Mælk, pasteuriseret fra Mbinga, C	> 1.000	< 1	
M49	Mælk, pasteuriseret fra Mbinga, D	> 1.000	< 1	
M50	Mælk, pasteuriseret fra Dichori, E	> 1.000	< 1	
M51	Mælk, pasteuriseret fra Dichori, F	> 1.000	< 1	

Forsøgene 4.3.2000 blev tilrettelagt som holdbarhedsundersøgelser. Mælk fra køerne Dichori og Mbinga blev anvendt, men den rå mælk blev ikke undersøgt. Varmebehandlingen blev udført ved 62°-63°C i 30 min. (kl. 15.45-16.15), men på grund af overskyet vejr blev vandet opvarmet ved hjælp af en dypkoger.

Prøve M46 og M47 blev herefter opbevaret i kølebox ved 2°-7°C, prøve M48 og M50 blev opbevaret ved 25°C og prøve M49 og M51 blev opbevaret ved 30°C. Ved laboratorieundersøgelsen efter ca. 24 t. var kimtallene lave i prøverne opbevaret på køl, mens kimtallene var meget høje i de øvrige 4 prøver opbevaret ved 25°-30°C. Ved organoleptisk undersøgelse fandtes prøve M46 og M47 at være uden bemærkninger, mens prøve M48 havde sur lugt og skillende konsistens, prøve M49 havde sur lugt og osteagtig konsistens, prøve M50 havde sur lugt og skillende konsistens og prøve M51 var tykmælksagtig.

Tabel 6. Resultater af varmebehandlingsforsøg udført 5.3.2000.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Coliforme Bakterier pr.ml	Escherichia coli pr.ml
W16	Vand, fra W13, behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 64°-ventil	360	< 1	< 1
W17	Vand, fra W13, behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 74°-ventil	240	< 1	< 1

Forsøgene 5.3.2000 blev udført ved behandling af vandprøve W13 fra Mlalakuwa River (opbevaret i 2 dage). I det ene forsøg blev anvendt et apparat med 64°-ventil og i det andet forsøg en 74°-ventil. I det første tilfælde fandtes som forventet det højeste kimtal p.g.a. mindre pasteuriseringseffekt. I begge tilfælde kunne der ikke påvises coliforme bakterier og E.coli.

Tabel 7. Resultater af varmebehandlingsforsøg udført 6.3.2000.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Coliforme Bakterier pr.ml	Escherichia coli pr.ml
M52	Mælk, pasteuriseret, A		< 1	
M53	Mælk, pasteuriseret, B		< 1	
M54	Mælk, pasteuriseret, C		< 1	
M55	Mælk, pasteuriseret, D		< 1	
M56	Mælk, pasteuriseret, E		< 1	
M57	Mælk, pasteuriseret, F		1	
M58	Mælk, behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 64°-ventil	100 (efter 24 t. inkubering)	< 1	

Ved forsøgene udført 6.3.2000 (tabel 7) var der god sol og pasteuriseringen foregik ved 63°-65°C i 30 min. (kl. 13-13.30). Den rå mælk i de 6 beholdere bestod af en blandingsprøve af de 3 køer fra Erica's besætning (Licho, Liche og Nice). Den rå prøve blev af tidsmæssige grunde ikke undersøgt mikrobiologisk, mens de pasteuriserede prøver blev undersøgt for coliforme bakterier. Der fandtes ikke coliforme bakterier i M52-M56 (position A-E), mens der blev påvist 1 coliform bakterie/ml i prøve M57 (position F).
En del af den rå blandingsmælk blev desuden behandlet i vandpasteuriseringsapparatet med 64°-ventil. Kimtallet ved 37°C var 100/ml efter 24 t. og der blev ikke påvist coliforme bakterier (M58).

7. TID OG STED

Forundersøgelser og forberedelse blev udført i perioden oktober 1999 – februar 2000. Projektets mikrobiologiske feltundersøgelser blev gennemført i perioden 26.2.-7.3.2000 i SONET Building, Dar es Salaam, Tanzania. Transport af prøver fra Tanzania til Danmark blev foretaget 8.3.2000 og 15.3.2000. Mikrobiologiske analyser af prøver i Fødevareregion Fyn's Laboratorium, Odense blev udført i perioden 8.3.-3.4.2000.

8. MATERIALER OG METODER

8.1. Materialer

Undersøgelsen omfatter 64 prøver af mælk og 19 prøver af vand, der blev undersøgt på det temporære feltlaboratorium i SONET Building, Dar es Salaam. Endvidere blev 20 prøver af mælk og 11 prøver af vand analyseret efter transport fra Tanzania til Danmark hos Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium, Odense.

Pasteuriserede prøver til undersøgelse i feltlaboratoriet i SONET Building blev udtaget i specialdesignede sterile stomacherposer, i sterile 100 ml plastflasker med skruelåg, i plastflaske til omsamling af pasteuriseret vand, eller i en sutteflaske (glasflaske) til pasteurisering af vand/mælk i modermælkspasteuriseringsapparatet.

De 20 prøver af mælk og 6 prøver af vand til analyse hos Fødevareregion Fyn, Mikrobiologisk Laboratorium i Odense, blev 7.3.2000 udtaget i 100 ml sterile plastflasker med skruelåg, pakket i en special termocontainer med fryseelementer og transporteret heri med KLM til Amsterdam og Maersk Air til Billund. Ved åbning af containeren 8.3.2000 kl. 14 blev foretaget en kontrolmåling af temperaturen i en vandprøve, og analyserne blev straks igangsat.
Supplerende 5 vandprøver blev af Anders F. Jørgensen og Morten Østergaard-Nielsen udtaget 14.3.2000 i 100 ml sterile plastflasker og transporteret under køl med fly til Danmark, hvor prøverne blev modtaget hos Fødevareregion Fyn i Odense 15.3.2000 kl. 17:30, og analyserne blev straks igangsat.

8.2 Analysemetoder

Ved undersøgelse af mælk i Fødevareregion Fyn's laboratorium blev anvendt:

Kimtal ved 30°C: "Veterinærdirektoratet's cirkulære af 10.11.1993. Aerobe mikroorganismer i rå mælk og mælkeprodukter".

Coliforme bakterier: "IDF-standard nr. 73A:1985. Enumeration of Coliforms. Milk and Milk Products".

Staphylococcus aureus: "NMKL-metode nr. 66, 3. udgave, 1999. Koagulase positive stafylokokker. Bestemmelse i næringsmidler".

Rå mælk fra Licho (M63) og fra Liche (M64) blev tillige behandlet i det bærbare vandpasteuriseringsapparat med henholdsvis 64°-ventil og 74°-ventil. Fra hver pasteuriseret prøve blev udtaget 2 delprøver á 100 ml i plastflasker, henholdsvis M83+M84 og M85+M86.

Tabel 9. Skematisk oversigt over pasteuriseringsforsøg udført 7.3.2000. Af disse prøver blev udtaget delprøver, som blev transporteret til analyse i Odense.

Prøvens Lab.nr.	Prøvens Identifikation	Kimtal 37°C pr. ml	Delprøver udtaget efter varmebehandling i det bærbare vandpasteuriserings-apparat
W18	Vand, Mlalakuwa River	2.200.000	W22-W23-W24
W19	Vand, Mlalakuwa River	Som W18	W25-W26-W27

7.3.2000 blev der også hentet vand fra Mlalakuwa River, og prøven blev delt i to råvandsprøver á 500 ml, W18 og W19. W18 blev undersøgt for kimtal. Hver prøve blev herefter tilsat testbakterier på følgende måde:

- Escherichia coli; tilsat 20.000/ml
- Salmonella Typhimurium; tilsat 2.000/ml

Prøverne blev begge behandlet i det bærbare vandpasteuriseringsapparat med 64°-ventil. Varmebehandingen af prøve W19 blev dog af vejrmæssige grunde ikke afsluttet, men det skønnes at temperaturen har været i området 60°-64°C.

Fra hver behandlet prøve blev udtaget 3 delprøver á 100 ml i plastflasker således:

- W18: 3 delprøver, mærket W22, W23 og W24
- W19: 3 delprøver, mærket W25,W26 og W27

Alle delprøver af mælk: M67-M86 og af vand: M22-W27 blev nedkølet i køleboks i ca. 6 timer og derefter pakket i en transportabel kølecontainer ,
og transporteret til Danmark.

9.2 Resultater af undersøgelser af mælk, udført i Odense

Kølecontaineren blev transporteret af FB fra Dar es Salaam via Amsterdam og Billund til Fødevare-region Fyn's laboratorium i Odense, ankomst 8.3.2000 kl. 13.45, hvor temperaturen i en vandprøve blev målt til 2,5°C, hvilket var tilfredsstillende for videre undersøgelse.

Tabel 10. Resultater af undersøgelser af 4 delprøver fra M59, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.	**M67**	**M68**	**M69**	**M70**
Prøvens Identifikation	Delprøve 1	2	3	4
	af mælk pasteuriseret fra M 59 i mælkepasteuriseringsapparatet			
Kimtal ved 24 t.	420	43	1.200	410
30°C/ml 48 t.	100	18	270	190
72 t.	27	16	46	39
Coliforme bakterier/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Staphylococcus aureus/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Streptococcus agalactiae/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Salmonella/25 ml	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm	480	10	1.400	360
Coliforme bakterier/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Fosfataseaktivitet	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Peroxydaseaktivitet	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.

Tabel 11. Resultater af undersøgelser af 4 delprøver fra M60, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.	**M71**	**M72**	**M73**	**M74**
Prøvens identifikation	Delprøve 1	2	3	4
	af mælk pasteuriseret fra M 60 i mælkepasteuriseringsapparatet			
Kimtal ved 24 t.	29.000	3.400	2.100	10.000
30°C/ml 48 t.	620	6.100	500	750
72 t.	300	220	180	350
Coliforme bakterier/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Staphylococcus aureus/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Streptococcus agalactiae/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Salmonella/25 ml	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm	4.800	6.000	2.400	10.000
Coliforme bakterier/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Fosfataseaktivitet	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Peroxydaseaktivitet	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.

Tabel 12. Resultater af undersøgelse af 4 delprøver fra M61, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.	**M75**	**M76**	**M77**	**M78**
Prøvens Identifikation	Delprøve 1	2	3	4
	af mælk pasteuriseret fra M 61 i mælkepasteuriseringsapparatet			
Kimtal ved 24 t.	460	3.000	1.300	110
30°C/ml 48 t.	230	1.400	750	71
72 t.	220	630	500	30
Coliforme bakterier/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Staphylococcus aureus/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Streptococcus agalactiae/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Salmonella/25 ml	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm	470	4.400	1.300	120
Coliforme bakterier/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Fosfataseaktivitet	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Peroxydaseaktivitet	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.

Tabel 13. Resultater af undersøgelse af 4 delprøver fra M62, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.	**M79**	**M80**	**M81**	**M82**
Prøvens identifikation	Delprøve 1	2	3	4
	af mælk pasteuriseret fra M 62 i mælkepasteuriseringsapparatet			
Kimtal ved 24 t.	76	2.200	5.600	4.200
30°C/ml 48 t.	50	120	2.200	130
72 t.	36	66	280	98
Coliforme bakterier/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Staphylococcus aureus/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Streptococcus agalactiae/ml	< 1	< 1	< 1	< 1
Salmonella/25 ml	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm	75	3.200	4.800	4.200
Coliforme bakterier/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm	< 1	< 1	< 1	< 1
Fosfataseaktivitet	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Peroxydaseaktivitet	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.

I det følgende diskuteres resultaterne i tabel 10, 11, 12 og 13 samlet. I hver tabel ses resultaterne af 4 delprøver udtaget fra samme portion pasteuriseret mælk á 2000 ml. Alle undersøgelser blev udført ca. 24 t. efter pasteuriseringstidspunktet. Derefter blev kimtallene igen undersøgt efter 48 t. og 72 t. Det fremgår heraf, at kimtallene efter 24 t. varierede således at der kan være en forskel på mere end 10 gange. Dette skyldes, at beholdernes indretning umuliggjorde en regelret homogenisering af prøven inden ophældning i prøveflaskerne. Kimtallene afspejler til gengæld de variationer, der er i bakterieindholdet i portionerne. Det er endvidere karakteristisk, at kimtallene ved opbevaring ved 5°C i 48 t. og 72 t. har en samstemmende faldende tendens. Dette skyldes formentlig, at bakteriefloraen var domineret af termoresistente Bacillus bakterier, som ikke kan vokse ved køleskabstemperatur. Prøvernes konsistens var normal efter holdbarhedstidens udløb, men der blev ikke foretaget yderligere sensorisk vurdering.

I samtlige prøver blev ikke påvist coliforme bakterier, E.coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae og Salmonella. Fosfataseaktiviteten var negativ, hvilket viser at mælkeportionerne blev varmebehandlet svarende til lavpasteurisering. Den positive peroxydaseaktivitet i alle prøverne viser, at mælken efter hensigten ikke har været behandlet svarende til højpasteurisering.

Kimtallene ved 37°C undersøgt efter Petrifilm-teknikken var på samme niveau som kimtallet undersøgt ved 30°C. Dette viser, at den i mælken værende bakterieflora trives lige godt ved begge temperaturer, samt at det var muligt at homogenisere mælken i plastprøveflasken inden udtagning af mælk til kimtalsundersøgelse.

Der var altså markant forskel på kimtallet mellem de 4 delprøver fra samme 2.000 ml portion, mens der var overensstemmelse mellem metoderne indenfor samme delprøve.

De tilbageværende bakterier i mælken, bestående overvejende af termoresistente Bacillus, må formentlig accepteres som det opnåelige ved den anvendte varmebehandlingsteknik, og det vurderes at mælken ikke kan blive kimfri.

Til sammenligning er de danske normer for kimtal i mælk således:

Kimtallet ved 30°C skal være < 200.000/ml for blandingsmælk til fremstilling af pasteuriseret konsummælk.
Kimtallet ved 21°C skal være < 50.000/ml i konsummælk ved holdbarhedstidens udløb, efter ca. 8 dage, ved opbevaring på køl.

Hertil bemærkes, at bakteriefloraen i mælk fra Danmark og fra Tanzania er meget forskellig og at holdbarhedsforsøg udført i Tanzania, se tabel 5, viser at den pasteuriserede mælk ikke er holdbar i 24 t. uden for køl.

Kimtallet i de rå mælkeprøver varierer gennemsnitlig i størrelsesordenen $5x10^4 - 5x10^6$ pr. ml. Efter varmebehandlingen falder kimtallet til ca. $2x10^1 - 10^4$ pr ml. alt efter temperaturforløbet. Derefter stiger kimtallet igen, idet de overlevende termoresistente bakterier vokser i den varme mælk, og alt efter opbevaringstemperaturen indtræder betydelige organoleptiske forandringer i løbet af de kommende 24 t. Såfremt mælken afkøles hurtigt kan bakterievæksten hæmmes markant, således at kimtallet atter falder ved opbevaring af mælken i op til 72 t. ved max. 5°C. En hurtig afkøling og opbevaring af mælken på køl medfører en større mælkekvalitet og forbedrer mulighederne for at opbevare mælken.

Tabel 14. Resultater af undersøgelser af 2 delprøver fra M63, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.	**M83**	**M84**
Prøvens Identifikation	Delprøve 1	2
	af mælk pasteuriseret fra M 63 i det bærbare vandpasteuriseringsapparat med 64°-ventil	
Kimtal ved 30°C/ml 24 t.	91	1.700
48 t.	49	290
72 t.	55	110
Coliforme bakterier/ml	< 1	< 1
Staphylococcus aureus/ml	< 1	< 1
Streptococcus agalactiae/ml	< 1	< 1
Salmonella/25 ml	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm	31	2.400
Coliforme bakterier/ml Petrifilm	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm	< 1	< 1
Fosfataseaktivitet	Neg.	Neg.
Peroxydaseaktivitet	Pos.	Pos.

Tabel 15. Resultater af undersøgelse af 2 delprøver fra M64, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.	**M85**	**M86**
Prøvens Identifikation	Delprøve 1	2
	af mælk pasteuriseret fra M 64 i det bærbare vandpasteuriseringsapparat med 74°-ventil	
Kimtal ved 24 t.	80	80
30°C/ml 48 t.	76	82
72 t.	75	110
Coliforme bakterier/ml	< 1	< 1
Staphylococcus aureus/ml	< 1	< 1
Streptococcus agalactiae/ml	< 1	< 1
Salmonella/25 ml	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm	44	39
Coliforme bakterier/ml Petrifilm	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm	< 1	< 1
Fosfataseaktivitet	Neg.	Neg.
Peroxydaseaktivitet	Pos.	Pos.

I det følgende diskuteres tabel 14 og 15 samlet. Forsøgene drejede sig om at afprøve det bærbare vandpasteuriseringsapparats effekt på varmebehandling af mælk. Da den pasteuriserede mælk blev udledt i en plastflaske med skruelåg var der bedre mulighed for homogenisering af prøven hvilket specielt fremgår af kimtallene vist i tabel 15. Kimtallene var som forventet i gennemsnit lavest i prøverne fra forsøget med brug af 74°-ventil. Herudover kan der drages de samme betragtninger og vurderinger som afgivet for prøve M67-M82.

9.3. Resultater af undersøgelser af vand, udført i Odense

Tabel 16. Resultater af undersøgelse af 3 delprøver fra W18, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.		W22	W23	W24
Prøvens identifikation		Delprøve 1	2	3
		af vand pasteuriseret fra W18 i det bærbare vandpasteuriseringsapparat med 64°-ventil		
Kimtal ved 30°C/ml	24 t.	660	700	560
	48 t.	530	500	490
	72 t.	520	560	570
Kimtal ved 37°C/ml	24 t.	410	420	270
	48 t.	590	400	430
	72 t.	460	350	530
Coliforme bakterier ved 37°C, MPN/ 100 ml		< 2	< 2	< 2
Fækale coliforme bakterier ved 44°C, MPN/100 ml		< 2	< 2	< 2
Salmonella/25 ml		ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm		410	510	540
Coliforme bakterier/ml Petrifilm		< 1	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm		< 1	< 1	< 1

Tabel 17. Resultater af undersøgelse af 3 delprøver fra W19, påbegyndt 8.3.2000.

Prøvens lab.nr.		W25	W26	W27
Prøvens identifikation		Delprøve 1	2	3
		af vand pasteuriseret fra W19 i det bærbare vandpasteuriseringsapparat med 64°-ventil		
Kimtal ved 30°C/ml	24 t.	5.000	8.600	6.800
	48 t.	5.400	5.900	5.000
	72 t.	2.500	3.400	7.400
Kimtal ved 37°C/ml	24 t.	9.000	7.200	6.000
	48 t.	3.800	5.400	5.300
	72 t.	5.400	5.000	4.600
Coliforme bakterier ved 37°C, MPN/ 100 ml		79 *	33 *	49 *
Fækale coliforme bakterier ved 44°C, MPN/100 ml		< 2	< 2	< 2
Salmonella/15 ml		ikke påvist	ikke påvist	ikke påvist
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm		4.000	5.000	5.000
Coliforme bakterier/ml Petrifilm		< 1	< 1	< 1
Escherichia coli/ml Petrifilm		< 1	< 1	< 1

* Colilignende reaktion i visse af MPN-glasrørene

I det følgende diskuteres tabel 16 og 17 samlet. Der er tale om to tidsforskudte varmebehandlingsforsøg med brug af 64°-ventil. På grund af opsamling af det pasteuriserede vand i en plastflaske med skruelåg var det muligt at foretage en homogenisering inden udtagning af delprøver. Det fremgår af kimtallene, at disse var på samme niveau såvel mellem ens delprøver som mellem kimtalsmetoderne inden for samme prøve. Som i mælken var der dominans af termoresistente Bacillus bakterier, hvilket blev vist ved en supplerende undersøgelse, herunder ved mikroskopi. Kimtallet i delprøverne W25-W27 var ca. 10 gange højere end i delprøverne W22-W24. Dette skyldes, at pasteuriseringen af W19 ikke blev fuldendt på grund af tiltagende skydække, og det skønnes at temperaturen har været i intervallet 60°-64°C, men tydeligvis med en ringere effekt. Det ses også ved, at der blev påvist reaktion med syredannelse og luftudvikling i glassene for MPN-metoden med coliforme bakterier. Coliforme bakterier blev derimod ikke påvist ved Petrifilm-metoden, da der er tale om en forekomst på < 1/ml. I ingen af prøverne W22-W27 blev påvist E.coli, hverken ved Petrifilm-metoden eller ved subkultivering til 44°C fra positive glas, der reagerede på coliforme bakterier. De tilsatte E.coli testbakterier kunne således ikke genfindes i W25-W27. Der blev ikke påvist Salmonella i prøverne. Bemærk at Salmonella kun er undersøgt i 15 ml fra prøve W25-W27 på grund af en mindre prøvemængde i plastflaskerne.

Den resterende prøvemængde blev opbevaret ved 5°C i 48 t. og 72 t. efter tidspunktet for pasteurisering og derefter undersøgt igen for kimtal. Det fremgår heraf, at kimtallet stort set forblev uændret i opbevaringsperioden. Kimtallet udgøres primært af Bacillus bakterier.

9.4 Resultater af supplerende undersøgelser af vand, udført i Odense

Tabel 18. Resultater af undersøgelse af vand pasteuriseret fra W28, påbegyndt 15.3.2000. Endvidere er vist resultatet af undersøgelse af råvandet fra Mlalakuwa River (W28) udtaget 14.3.2000 og undersøgt i Dar es Salaam.

Prøvens lab.nr.		**W28**	**W29**	**W30**
Prøvens Identifikation		Vand, fra Mlalakuwa River udtaget 14.3.2000	Vand, pasteuriseret fra W28, udtaget fra vand-pasteuriseringsap-paratet med 64°-ventil, efter udløb	Vand, pasteuriseret fra W28, udtaget fra vand-pasteuriseringsap-paratet med 64°-ventil, inden udløb
Kimtal ved 30°C/ml	24 t.		2.600	1.200
	48 t.		1.500	1.000
	72 t.		1.400	1.200
Kimtal ved 37°C/ml	24 t.		4.400	1.200
	48 t.		2.100	1.300
	72 t.		1.500	990
Coliforme bakterier ved 37°C, MPN/ 100 ml			22 *	33 *
Fækale coliforme bakterier ved 44°C, MPN/100 ml			<2	<2
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm		2.300.000 (e-mail fra AFJ)	4.900	980
Coliforme bakterier/ml Petrifilm			<1	<1
Escherichia coli/ml Petrifilm			<1	<1

* Colilignende reaktion i visse af MPN-glasrørene

Tabel 19. Resultater af undersøgelse af vand pasteuriseret fra M28, påbegyndt 15.3.2000.

Prøvens lab.nr.		W31	W32	W33
Prøvens identifikation		Vand, pasteuriseret fra W28, udtaget fra vand-pasteuriserings-apparatet ved 70°C, inden udløb	Vand, pasteuriseret fra W28, udtaget fra vand-pasteuriserings-apparatet ved 74°C, inden udløb	Vand, pasteuriseret fra W28, udtaget fra vand-pasteuriserings-apparatet med 74°-ventil, efter udløb
Kimtal ved 30°C/ml	24 t.	1.000	1.100	930
	48 t.	1.200	1.000	980
	72 t.	930	910	1.000
Kimtal ved 37°C/ml	24 t.	1.000	1.100	960
	48 t.	920	1.000	1.000
	72 t.	810	970	830
Coliforme bakterier ved 37°C, MPN/ 100 ml		14 *	<2	<2
Fækale coliforme bakterier ved 44°C, MPN/100 ml		<2	<2	<2
Kimtal 37°C/ml, 24 t. Petrifilm		1.500	1.400	1.000
Coliforme bakterier/ml Petrifilm		<1	<1	<1
Escherichia coli/ml Petrifilm		<1	<1	<1

* Colilignende reaktion i visse af MPN-glasrørene

I det følgende diskuteres tabel 18 og 19 samlet. Prøverne W29-W33 blev (oplyst af AFJ) udtaget med stigende temperatur i det bærbare vandpasteuriseringsapparat, enten efter udløb i plastflasken (W29 og W33) eller udtaget med slangeanordning i apparatets sorte solopvarmningscylinder. Der blev påvist et faldende kimtal ca. 24 t. efter pasteuriseringstidspunktet i forhold til stigende pasteuriseringstemperatur. Endvidere var kimtallene inden for samme vandprøve og mellem de anvendte kimtalsmetoder ikke væsentlig forskellige. Ved bestemmelse af kimtallet efter opbevaring af resterende prøvemængde i 48 t. og 72 t. fandtes et nogenlunde stabilt kimtal. Dette viser en overlevelse af termoresistente bakterier i vandet i mindst 72 t. efter pasteuriseringstidspunktet.

Der blev ikke påvist coliforme bakterier og E.coli i 1 ml vand ved Petrifilm-metoden. Ved undersøgelse efter MPN-teknikken, hvor der beregnes pr. 100 ml vand, fandtes ikke coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier (fækale coliforme bakterier) i prøve W32 og W33, der blev pasteuriseret ved 74°C. Derimod fandte en reaktion for coliforme bakterier ved 37°C i prøverne W29, W30 og W31, pasteuriseret ved 64°-70°C, men i en mængde svarende til < 1/ml, henholdsvis 22, 33 og 14 pr. 100 ml vand.

9.5 Verifikationsundersøgelser på vandprøver, udført i Odense

Reaktionen for forekomst af coliforme bakterier ved 37°C i prøverne W25, W26, W27, W29, W30 og W31 ved anvendelse af MPN-metoden, antyder på grund af syre- og luftudvikling i glassene, at pasteuriseringen ikke har været tilstrækkelig effektiv til at inaktivere coliforme bakterier. Reaktionen i glassene var tydelig, men ret sen, og en subkultivering til 44°C viste ingen reaktion på tilstedeværelse af E.coli. Denne var på forhånd tilsat som testbakterie i prøverne W25-W27, og på baggrund af viden om naturlig forekomst af E.coli i råvand fra Mlalakuwa River må det vurderes som overvejende sandsynligt, at E.coli ikke har overlevet pasteuriseringen i de nævnte prøver, hvorfor reaktionen ved 37°C må skyldes andre bakterier.

Til nærmere belysning af dette fænomen har laboratoriet foretaget forskellige verifikationsundersøgelser med henblik på at undersøge om coliforme bakterier havde overlevet pasteuriseringen i prøverne W25-W27 og W29-W31. Ved mikroskopi fra positive glasrør samt ved udsæd på selektive og non-selektive dyrkningsmedier kunne der ikke påvises forekomst af gram-negative stavbakterier og ingen forekomst af coliforme bakterier på dyrkningspladerne. Derimod fandtes ved alle disse undersøgelser en markant vækst af Bacillus spp. (gram-positive, store sporedannende stavbakterier).

Bacillus cereus var blandt de dominerende bakteriefund ved dyrkning på blodagar. En tilbagepodning i glasrørene og dyrkning ved 37°C i vandbad i 48 t. viste imidlertid ingen vækst, hvilket også bekræfter at Bacillus cereus ikke kan forgære laktose. Tilsvarende verifikationsforsøg med andre bakteriekolonier viste samme mangel på vækst.

Yderligere undersøgelser af resterende vand fra prøveflasken (W29-W31) viste efter opformering i BHI atter en colilignende reaktion i glasrørene, og mikroskopi samt dyrkning viste dominans af Bacillus cereus.

Laboratoriet har tillige udført forskellige kontrollerede varmebehandlingsforsøg. Således blev de primære, positive "coliglas" opvarmet i vandbad til 64°C i 30 min. Efter denne varmebehandling var der ingen reaktion ved subkultivering i nye glas, men der fandtes reaktion i nogle glas efter subkultivering udført før varmebehandlingen. Dette tyder på at de bakterier, der giver reaktionen i "coliglassene", er blevet inaktiveret ved 64°C med en holdertid på 30 min.

Testbakterien E.coli (nr. 6) blev undersøgt for varmeinaktivering ved behandling af en renkultur af bakterien i mængde ca. 10.000/ml. Glasrør af 10 ml blev opvarmet i vandbad og ved 15 udvalgte temperaturer i området 44°-75°C blev der sat en holdertid på 5 min. Herefter blev overlevelse af E.coli afprøvet ved udsæd i nye "coliglas" og PCA. Forsøget viste at kombinationen af temperaturer og tider gav vækst af E.coli i alle glasrør op til 60°C, en enkelt prøve viste vækst ved 64°C på PCA, og to prøver viste vækst i rørene ved henholdsvis 67°C og 69°C, mens der ikke var vækst ved 70°C og derover. Dette forsøg viser, at en temperatur i området > ca. 60°C i kombination med holdertiden er kritisk for overlevelse af coliforme bakterier, afhængig af antallet af colibakterier, idet der decimeres et bestemt antal pr. tidsenhed. Denne observation stemmer rimelig godt overens med, at der var colireaktion i prøverne W25-W27, der ikke blev varmebehandlet så effektivt (60°-64°C) som prøverne W22-W24 (mindst 64°C). Derimod stemmer disse observationer ikke overens med fund af "colireaktion" i prøverne W29-W31, der blev varmebehandlet op til 70°C. Kun prøverne pasteuriseret ved 74°C (W32 og W33) viste ingen "colireaktion" ved MPN-metoden.

Det er værd at bemærke, at vi taler om bakterier med en "colireaktion" på < 1/ml, altså en meget lavgradig forekomst. Hvis der kan være tale om patogene bakterier er dette selvfølgelig i sig selv utilfredsstillende, men det forhold at testbakterierne Salmonella og E.coli ikke kunne påvises i nogle af de pasteuriserede prøver antyder, at der sker en inaktivering af såvel fækale indikatorbakterier som egentlige patogener. Dette er pasteuriseringens hovedformål.

De udførte verifikationsundersøgelser antyder overvejende, at de bakterier der overlevede pasteuriseringen og gav positiv reaktion i "MPN coli-metoden" ikke er sande coliforme bakterier (falske positive), men kan være mesofile Bacillus sp., som inaktiveres i området 65°-70°C, afhængig af den anvendte holdertid. Endvidere kan synergistiske og antagonistiske reaktionsforhold ikke udelukkes. Dette indtryk forstærkes af, at reaktionen i MPN-glasrørene kun blev positiv, når der også blev podet med en vis mængde af selve vandprøven.

Efter varmebehandling af mælk i det bærbare vandpasteuriseringsapparat og i apparat til pasteurisering af mælk i portioner blev der ikke påvist coliforme bakterier, svarende til < 1/ml. Mælken blev således (i overensstemmelse med normal international standard) ikke undersøgt efter MPN-metoden, hvorfor denne undersøgelse ikke kan besvare spørgsmålet om en evt. lignende overlevelse af mesofile bakterier i mælk.

10. KONKLUSION

10.1 Vedrørende apparat til pasteurisering af mælk i portioner

- Ved undersøgelse af en række prøver af mælk fra to forskellige kvægfarme i Dar es Salaam i forbindelse med konkret test af et apparat til pasteurisering af mælk i portioner blev det vist, at det var muligt gennem langtidspasteurisering med krav til temperatur og holdertid at opnå en drabseffekt på bakterier svarende til lavpasteurisering.

- De til testen anvendte råmælksprøver indeholdt et kimtal i størrelsesordenen $5x10^4 - 5x10^6$, samt coliforme bakterier og Escherichia coli, og ved tid- og temperaturstyret varmebehandling gennem solenergi kunne opnås en kimtalssreduktion på niveauet 10^3-10^4.

- Kimtalsreduktionen var utilfredsstillende ved 58°C i 30 min., mens den var tilfredsstillende ved 69°C i 30 min. Imellem disse varmebehandlingseffekter kunne der sporadisk påvises coliforme bakterier. Ved behandlingen ved 69°C fandtes en svag branket smag i én af seks prøver.

- De tilsatte testbakterier Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae og Salmonella Typhimurium kunne ikke påvises i prøver, langtidspasteuriseret ved 62°-65°C i 30 min., ved undersøgelse ca. 24 t. efter varmebehandlingen.

- Undersøgelserne har vist, at kimtallet i den pasteuriserede mælk, der dominores af Bacillus bakterier, stiger efter varmebehandlingen indtil en effektiv køling kan iværksættes. Efterfølgende holdbarhedsprøvning af mælken ved opbevaring ved 5°C i op til 72 t. efter pasteuriseringstidspunktet viste et faldende kimtal på grund af inaktivering af de termoresistente bakterier.

- Såfremt den varmebehandlede mælk ikke konsumeres samme dag er der kun mulighed for opbevaring til næste dag, såfremt mælken afkøles hurtigt og opbevares ved max. 5°C.

- Denne afprøvning af apparatet til pasteurisering af mælk i portioner har ved de mikrobiologiske analysedata vist, at behandlingstemperaturen er meget vigtig for den samlede varmeeffekt i kombination med holdertiden 30 min. Det må på grundlag af denne test anbefales at behandle mælken ved en temperatur ikke under ca. 68°C i 30 min. Undersøgelsen indeholder ikke tilstrækkelige data i dette temperaturområde til at kunne drage yderligere konklusioner, ligesom der kun er gennemført sporadiske sensoriske analyser af mælkens kvalitet.

10.2 Vedrørende det bærbare vandpasteuriseringsapparat

- Ved undersøgelse af en række prøver af vand i forbindelse med konkret test af et bærbart vandpasteuriseringsapparat blev det vist, at det var muligt gennem en varmebehandlingseffekt med solenergi at opnå en kimtalsreduktion.

- De til testen anvendte vandprøver fra Mlalakuwa River indeholdt et kimtal i størrelsesordenen $0,5x10^6 - 2,5x10^6$, samt et betydeligt antal af coliforme bakterier og Escherichia coli, og ved temperaturstyring af et ventilsystem for varmebehandling kunne der opnås en kimtalsreduktion i niveauet 10^3-10^4.

- Kimtalsreduktionen var utilfredsstillende ved anvendelse af en 43°-ventil, mens der var en betydelig bedre effekt med anvendelse af 64°-ventil og 74°-ventil i pasteuriseringsapparatet.

- Der blev ikke påvist de tilsatte testorganismer Escherichia coli og Salmonella Typhimurium i vandprøver varmebehandlet i apparat med 64°-ventil og undersøgt ca. 24 t. efter tidspunktet for varmebehandlingen.

- I vandprøver varmebehandlet i temperaturområdet 60°-70°C og undersøgt 24 t. efter varmebehandlingstidspunktet blev der i visse prøver påvist en reaktion for coliforme bakterier i størrelsesordenen 14-79/100 ml vand, d.v.s. < 1/ml. Reaktionen var imidlertid ikke helt typisk for coliforme bakterier, og supplerende verifikationsundersøgelser pegede på en dominerende tilstedeværelse af mesofile Bacillus bakterier, som inaktiveres i temperaturområdet 60°-70°C, meget afhængig af holdertiden for den samlede temperaturpåvirkning. Det er dog ikke muligt i denne undersøgelse og med de foreliggende data at belyse forekomsten af bakteriefloraen nærmere.

- Da varmebehandlingen i det bærbare vandpasteuriseringsapparat kun er temperaturstyret med specifik ventilåbning og ikke tidsstyret kan den samlede holdertid og dermed den samlede varmebehandlingseffekt være forskellig afhængig af vejrforholdene/solstrålingen. Det er derfor ikke muligt ved denne undersøgelse at bestemme en eksakt tid-temperaturkombination, men de foreliggende analysedata peger på, at vandbehandlingen bør gennemføres til ca. 70°C, målt som ventiltemperatur.

11. REFERENCER

1. *Boisen, F.*: Rapport 07.12.1995. "Mikrobiologisk undersøgelse af varmebehandlet drikkevand fra solenergidrevet dekontamineringsanlæg i Dar es Salaam, Tanzania, uge 35-37, 1995".

2. *Boisen, F.*: Rapport 10.01.1997. "Undersøgelse af steriliseringseffekten i modificeret solkomfur til sterilisering af instrumenter, Dar es Salaam, Tanzania, august-september 1996.

3. *Boisen, F.*: Rapport 15.05.2000. "Mikrobiologisk undersøgelse af modermælk i forbindelse med test af et nyt modermælkspasteuriseringsapparat".