

U.S.MIKKELSEN OG O. BENNETZEN

VÆKSTFORHOLD I UBEHANDLET OG TERMOFILT STABILISERET

BIOMASSE AF EVT. PATOGENER BELYST VED

FÆKALE STREPTOKOKKERS VÆKSTBETINGELSER

DEL-RAPPORT TIL

SMITSTOFREDUKTION I BIOMASSE

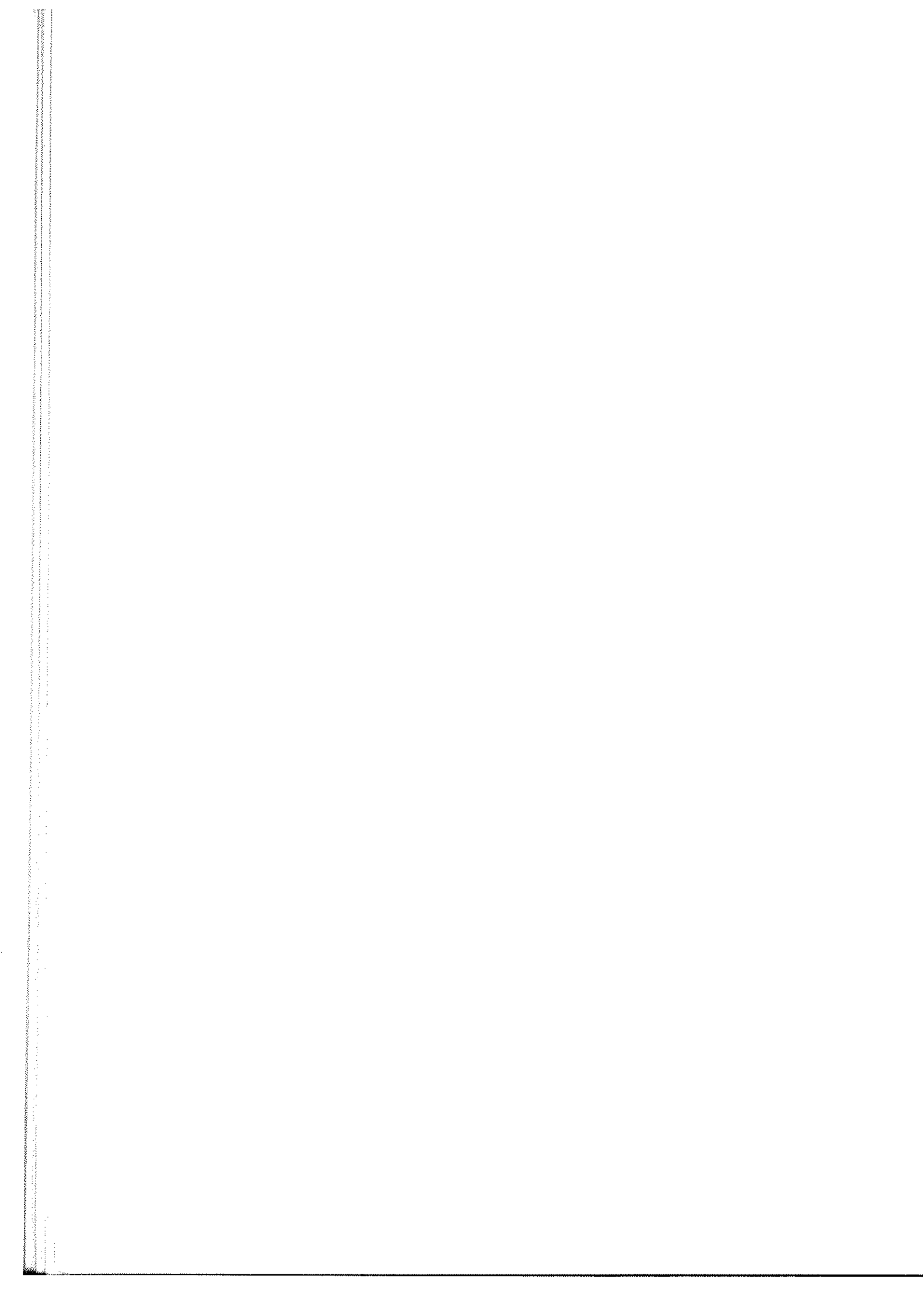
RAPPORT VEDRØRENDE

DET VETERINÆRE FORSØGSPROGRAM

I

BIOGASFÆLLESANLÆG

BIND II: DEL-RAPPORTER OG BILAG 1995



FORSØGETS FORMÅL:

1. at undersøge, om der i ubehandlet biomasse (gylle-organisk affald) findes biokemiske/biologiske bestanddele, der hæmmer fækale streptokokkers vækst under lagring ved forskellige temperaturer.
2. at undersøge, om ovennævnte bestanddele elimineres ved udrådningprocesserne i den termofile reaktortank.
Dette forsøges vurderet ved at måle, om der er signifikant forskel på fækale streptokokkers evt. persistens eller eftervækst i ubehandlet biomasse i forhold til behandlet biomasse ved forskellige temperaturbehandlingsniveauer under anaerobe forhold.
3. Supplerende udføres der kvalitative Salmonella-undersøgelser af materialet ved forsøgets afslutning.

Forsøgsdeltagere: MLKE'erne i Ribe og Haderslev.

Forsøgets afvikling: forsøget påbegyndes i 1. halvår af 1994. De deltagende MLKE'er bestemmer selv, hvornår i ovennævnte periode forsøget startes. Forsøget er berammet til en varighed på 3 mdr. med 1 måneds efterbehandlingstid, altså ialt 4 mdr. MLKE'erne aflægger en kortfattet slutrapport til Energistyrelsen.

Forsøgsresumé: ubehandlet biomasse sammenlignes med behandlet biomasse (biomasse der har fået en varmebehandling på 53°C i mindst 4 timer i Ribe biogasfællesanlæg). Den behandlede biomasse podes med fækale streptokokker (FS) fra opformeringsmedie, stammende fra kolonier på Slanetz agar, der er isoleret fra den ubehandlede biomasse. Derefter måles FS-indholdet i den ubehandlede og behandlede biomasse. De 2 biomassetyper deles hver i 3 portioner og viderebehandles ved 3 forskellige temperaturbehandlingsniveauer (7°C, 21°C og 30°C) i varmeskab i 3 måneder. I denne periode undersøges prøverne hver måned for indholdet af FS. Sluttelig sammenlignes den ubehandlede og den behandlede biomasse for FS-indhold ved de 3 temperaturbehandlingsniveauer, for at se om der er signifikant forskel.

FORSØGSPLAN

FS-indholdet bestemmes efter: Udkast til FS-metode, august 1991/92: Biomasse undersøgelse: "Bestemmelse af fækale streptokokker i gylle, slam og blandinger af gylle med organisk affald ved pladespredningsmetoden". Metoden er udarbejdet af LKE-Haderslev/Ribe. Salmonella-indholdet bestemmes efter NMKL nr. 71: "Salmonella-bakterier. Påvisning i livsmedel", 4. udgave 1991.

MLKE i Ribe:

ca. 3 kg frisk biomasse (A) udtages fra fortanken og ca. 3 kg biomasse (B) udtages fra reaktortankene (1/3 fra hver reaktortank) i Ribe biogasfællesanlæg.

Samme dag foretages: 3 delprøver af A (C) og 3 delprøver af B (D), hver á 10 g, undersøges for FS-indhold. Hver delprøve sås ud i følgende fortyndinger: C: -2, -3 og -4, D: -1 og -2. Der foretages dobbeltudsåd (og dermed dobbeltbestemmelser). Det resterende prøveindhold opbevares under køl.

Efter dyrkning på Slanetz-agar af C, udtages der fra hver af de 3 delprøver 6 typiske kolonier fra de respektive plader, bestemt efter ovennævnte metode. Den samlede kolonimasse kommes i 50 ml BHI-bouillon og inkuberes i 2 døgn ved 37°C. FS-indholdet bestemmes, ved at lave en 10-folds fortyndingsserie fra 10^{-5} til 10^{-10} med efterfølgende dyrkning på Slanetz-agar (E). Straks efter bestemmelsen af FS-indholdet i BHI-bouillonens podes B, således at der opnås et forventet antal FS/g i samme størrelsesniveau som i A (indholdet i A beregnes som gennemsnittet af de udtagne 3 delprøver).

Efter podningen deles A og B i hver 2 portioner (A/2 henholdsvis B/2) som MLKE'erne i Ribe og Haderslev (transporteres under køl til Haderslev) arbejder videre med (F).

MLKE'erne i Ribe og Haderslev:

FS-indholdet i A/2 og B/2 bestemmes straks ved udtagning af 3 delprøver á 10 g fra hver, og undersøge dem efter ovennævnte metode (G). Hver delprøve sås ud i fortyndingerne: -2, -3 og -4. Der udføres dobbeltudsåd (og dermed dobbeltbestemmelser) Både for A/2 og B/2 gælder, at det resterende prøvemateriale deles i 3 lige store portioner (ca. 0,5 kg i hver), nemlig 1.A/2, 2.A/2, 3.A/2 henholdsvis 1.B/2, 2.B/2, og 3.B/2.

De udtagne portioner kommes i steril glasbeholder (rumfang: 1000 ml) med skruelåg for at simulere anaerobe forhold.

Prøverne inkuberes i varmeskabe ved følgende temperatur niveauer (H):

1.A/2 og 1.B/2: $7^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

2.A/2 og 2.B/2: $21^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

3.A/2 og 3.B/2: $30^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$

Hver måned i knap 3 måneder (d.v.s. 3 gange ialt) udføres følgende (I):

fra alle de ovennævnte inkuberede prøver udtages der 3 delprøver á 10 g og undersøges for FS-indholdet.

Undersøgelser efter 1 måned: hver delprøve sås ud i fortyndingerne -1, -2, -3 og -4.

Undersøgelser efter 2 måneder: delprøver dyrket ved 7°C , henholdsvis 21°C sås ud i fortyndingerne -2, -3 og -4. Delprøver dyrket ved 30°C sås ud i fortyndingerne -2 og -3 (samt i -4 i Haderslev).

Undersøgelser efter 3 måneder: delprøver dyrket ved 7°C sås ud i fortyndingerne -2, -3 og -4. Delprøver dyrket ved 21°C sås ud i fortyndingerne -2 og -3. Delprøver dyrket ved 30°C sås ud i fortyndingen -2.

Der udføres dobbeltudsæd (og dermed dobbeltbestemmelser). De prøvemængder der ikke udtages til delprøveundersøgelsen sættes straks i varmeskabet til videre inkubering. Pr. gang skal der altså foretages

$6 (1.A/2 + 2.A/2 + 3.A/2 + 1.B/2 + 2.B/2 + 3.B/2) \times 3$ (3 delprøver fra hver prøve) = 18 FS-undersøgelser. Dette giver samlet: 18 FS-undersøgelser \times 3 (hver måned) = 54 FS-undersøgelser.

På undersøgelsesresultaterne udføres der spredningsberegninger, repeterbarheds- og reproducerbarhedsberegninger samt en t-test for at afgøre, om der er signifikant forskel på indholdet af FS i behandlet og ubehandlet biomasse ved de forskellige temperaturbehandlingsniveauer.

Ved forsøgets afslutning udføres der kvalitative Salmonella-undersøgelser ved at afveje 25 g af prøverne inkuberet ved henholdsvis 7°C , 21°C og 30°C . Undersøgelserne udføres både på A/2 og B/2.

Tidsplan for forsøget:

	Dato	MLK, Ribe	MLK, Haderslev
dag: 0	02.03.94	A og B udtages	
dag: 0	02.03.94	C og D undersøges for FS-indhold	
dag: 2	04.03.94	C og D aflæses på grundlag af C foretages en opformering i BHI-bouillon	
dag: 4	06.03.94	FS fra BHI-bouillon podes ud på Slanetz-plader	
dag: 6	08.03.94	FS-indholdet i BHI-bouillon bestemmes, og B podes med denne	
dag: 6	08.03.94	A og B deles i hver 2 portioner (henholdsvis A/2 og B/2)	
dag: 6	08.03.94	MLK i Ribe kører den ene af portionerne A/2 og B/2 til Haderslev under køl	
dag: 6	08.03.94	Fra A/2 og B/2 udtages der 6 delprøver fra hver, som undersøges for FS-indhold.	Ditto
dag: 6	08.03.94	A/2 og B/2 deles i hver 3 portioner af lige stor størrelse (henholdsvis 1.A/2, 2.A/2, 3 A/2 og 1.B/2, 2.B/2 3.B/2).	Ditto
dag: 6	08.03.94	1.A/2 og 1.B/2 inkuberes ved 7°C, 2.A/2 og 2.B/2 inkuberes ved 21°C 3.A/2 og 3.B/2 inkuberes ved 30°C	Ditto
dag: 8	10.03.94	FS-indholdet fra A/2 og B/2 aflæses	Ditto

dag:34	05.04.94	De 6 ovennævnte prøvetyper udtages af varmeskabet og undersøges for FS-indholdet ved podning på Slanetz-plader. Den ikke-undersøgte prøvemængde inkuberes videre ved de samme temperaturer (X).	Ditto
dag:36	07.04.94	Aflæsning af resultater fra de prøver der blev sået ud i forgårs (Y)	Ditto
dag:62	03.05.94 (X)		Ditto
	(Haderslev dog:		
dag:61	02.05.94)		
dag:64	05.05.94 (Y)		Ditto
	(Haderslev dog:		
dag:63	04.05.94)		
dag:90	31.05.94 (X),	dog med den undtagelse, at	Ditto
	(Haderslev dog:	den ikke-undersøgte prøvemængde	
dag:89	30.05.94)	ikke inkuberes videre. Der foretages endvidere Salmonella-undersøgelser på 25 g af prøverne inkuberet ved henholdsvis 7°C, 21°C og 30°C. Undersøgelsen udføres både på A/2 og B/2.	
dag:92	02.06.94 (Y)		Ditto
	(Haderslev dog:		
dag:91	01.06.94)		
dagene:			
92-96		færdiggørelse af Salmonella-undersøgelserne.	

RESULTATER

FS-bestemmelser:

De originale resultater er vedlagt i kladde. Der er udført χ^2 -test på talmaterialet. De anvendelige resultater er forsynet med en rød cirkel. På grundlag af disse resultater, er der beregnet kimal samt log kimal (se side 8 og 9). Resultaterne er grafisk afbildet på bilagene lige efter side 8 og side 9 (henholdsvis figur 1 og figur 2).

Salmonella-undersøgelser:

Resultaterne er angivet på side 10.

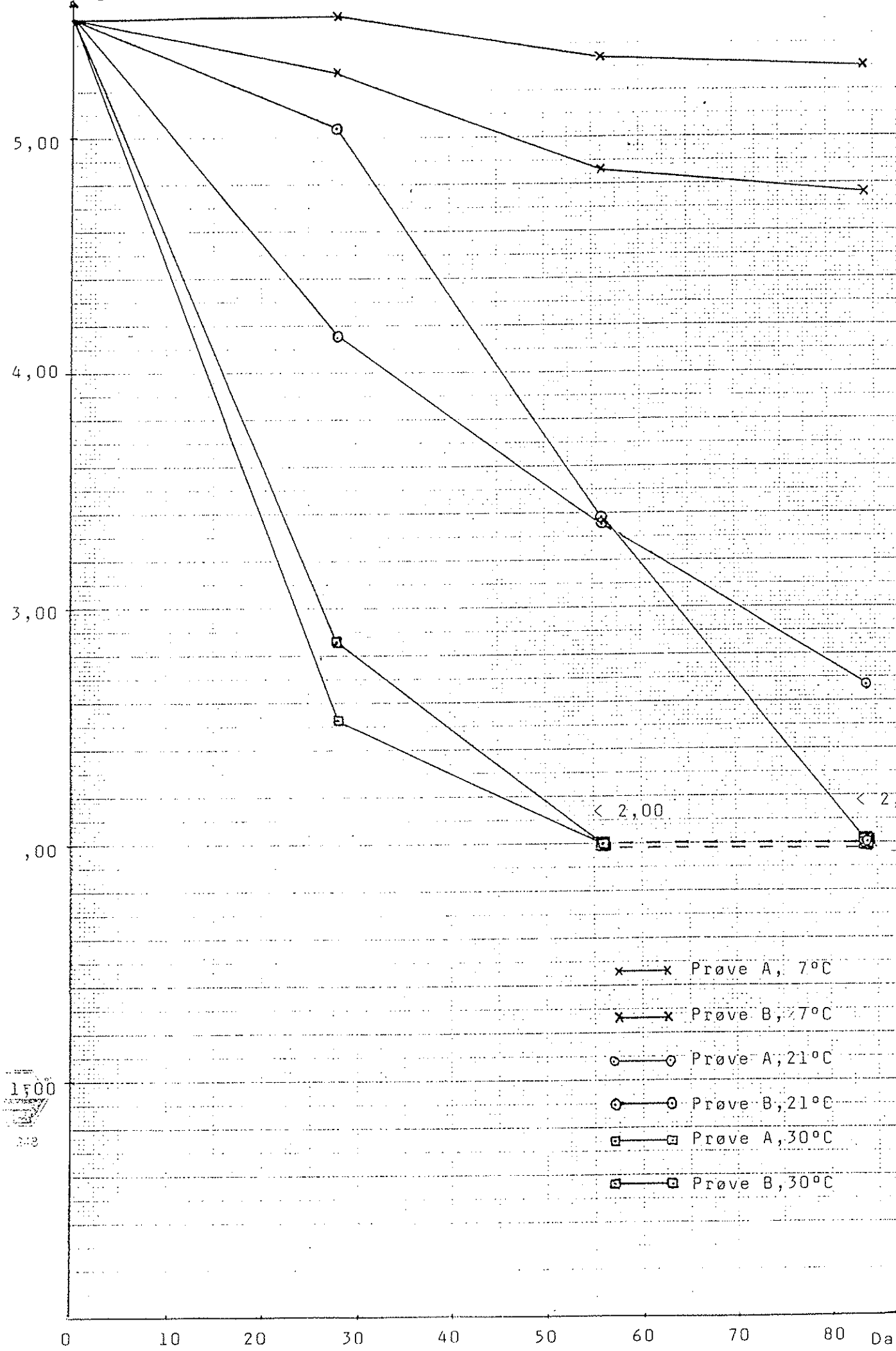
Ribe:

aflæs- nings- dato	prøve- type	dyrk- nings- tempe- ratur (°C)	antal FS/g	log antal FS/g	% af udgangs popula- tion (FS)
10.03.94	A/2	-	320.000	5,51	100
10.03.94	B/2	-	320.000	5,51	100
07.04.94	A/2	7	190.000	5,28	59
07.04.94	B/2	7	330.000	5,52	103
07.04.94	A/2	21	14.000	4,15	4
07.04.94	B/2	21	110.000	5,04	34
07.04.94	A/2	30	340	2,53	0,1
07.04.94	B/2	30	730	2,86	0,2
05.05.94	A/2	7	73.000	4,86	23
05.05.94	B/2	7	220.000	5,34	69
05.05.94	A/2	21	2.300	3,36	0,7
05.05.94	B/2	21	2.400	3,38	0,8
05.05.94	A/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03
05.05.94	B/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03
02.06.94	A/2	7	58.000	4,76	18
02.06.94	B/2	7	200.000	5,30	63
02.06.94	A/2	21	470	2,67	0,2
02.06.94	B/2	21	< 100	< 2,00	< 0,03
02.06.94	A/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03
02.06.94	B/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03

log antal FS/g

Ribe

FIGUR

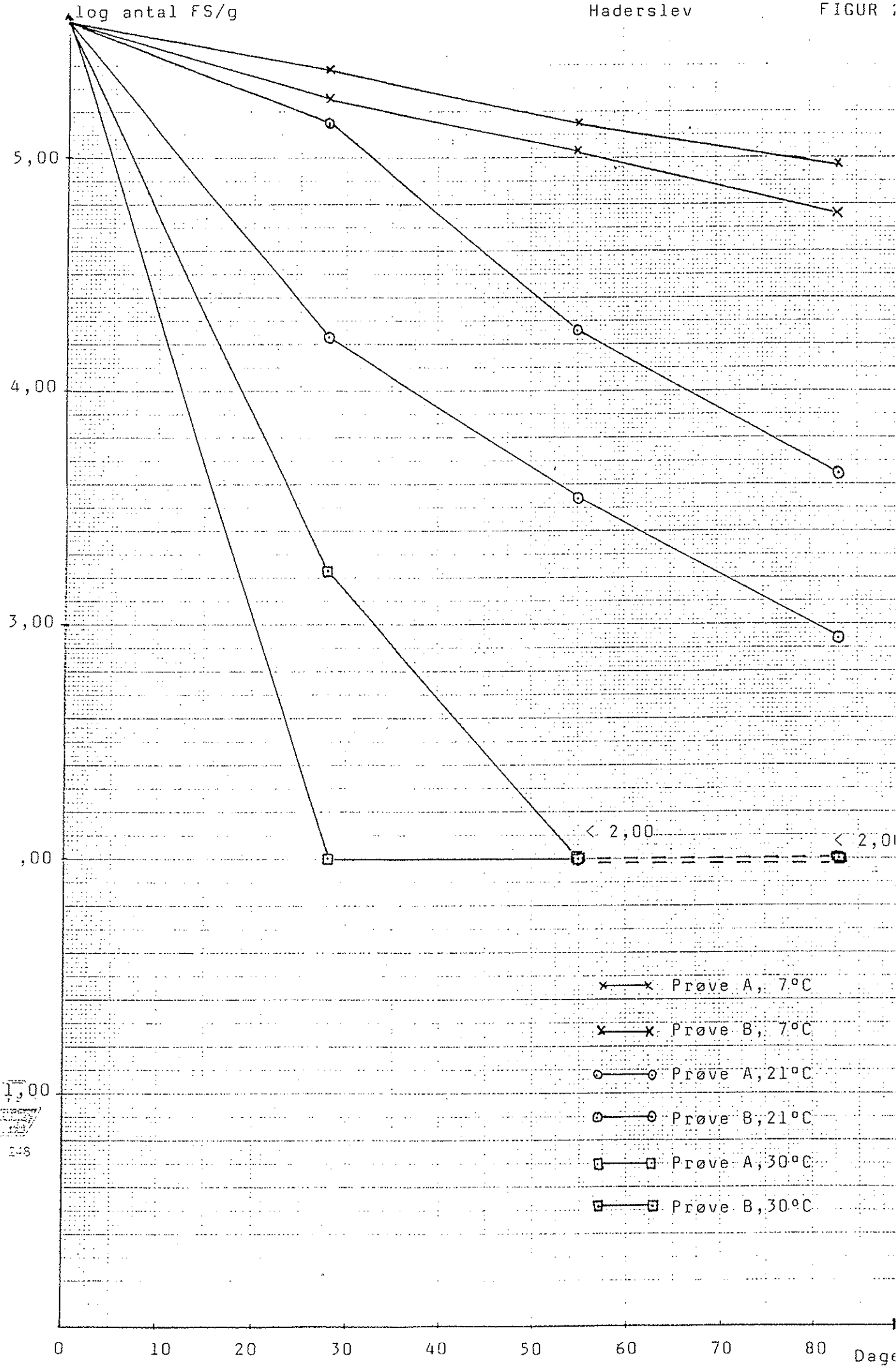


1500
2:8

- x—x Prøve A, 7°C
- x—x Prøve B, 7°C
- o—o Prøve A, 21°C
- o—o Prøve B, 21°C
- Prøve A, 30°C
- Prøve B, 30°C

Haderslev

aflæs- nings- dato	prøve- type	dyrk- nings- tempe- ratur (°C)	antal FS/g	log antal FS/g	% af udgangs popula- tion (FS)
10.03.94	A/2	-	390.000	5,59	100
10.03.94	B/2	-	390.000	5,59	100
07.04.94	A/2	7	180.000	5,26	46
07.04.94	B/2	7	240.000	5,38	62
07.04.94	A/2	21	17.000	4,23	4
07.04.94	B/2	21	140.000	5,15	36
07.04.94	A/2	30	100	2,00	0,03
07.04.94	B/2	30	1.700	3,23	4
04.05.94	A/2	7	107.000	5,03	27
04.05.94	B/2	7	140.000	5,15	36
04.05.94	A/2	21	3.500	3,54	0,9
04.05.94	B/2	21	18.000	4,26	5
04.05.94	A/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03
04.05.94	B/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03
01.06.94	A/2	7	58.000	4,76	15
01.06.94	B/2	7	93.000	4,97	23
01.06.94	A/2	21	880	2,94	0,2
01.06.94	B/2	21	4.500	3,65	1
01.06.94	A/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03
01.06.94	B/2	30	< 100	< 2,00	< 0,03



1,00

248

Salmonella-undersøgelser:

MLK	prøvens alder (dage)	prøve-type	inkuberingstemp. (°C)	Salmonella påvist i prøve	Salmonella type
Haderslev	83	A/2	7	ja	S. typhimurium
Haderslev	83	B/2	7	nej	-
Haderslev	83	A/2	21	nej	-
Haderslev	83	B/2	21	nej	-
Haderslev	83	A/2	30	nej	-
Haderslev	83	B/2	30	nej	-
Ribe	84	A/2	7	ja	S. typhimurium
Ribe	84	B/2	7	nej	-
Ribe	84	A/2	21	nej	-
Ribe	84	B/2	21	nej	-
Ribe	84	A/2	30	nej	-
Ribe	84	B/2	30	nej	-

STATISTIK

Der udføres en t-test for at se, om der er signifikans imellem resultaterne fra A/2 og B/2.

Endvidere beregnes 95 % confidensintervallet for forskellen imellem A/2 og B/2.

t-test:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - 0}{sp * \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

hvor \bar{x}_1 er gennemsnittet af observationer i prøve A/2, \bar{x}_2 er gennemsnittet af observationer i prøve B/2, sp er den samlede spredning på observationerne, n_1 er antallet af observationer i prøve A/2, og n_2 er antallet af observationer i prøve B/2.

$$sp = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) * s_1^2 + (n_2 - 1) * s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

hvor s_1 og s_2 er spredningerne af observationerne i prøve A/2 henholdsvis B/2.

95% confidensinterval:

$$(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \pm t(.975) * sp * \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$$

hvor $t(.975)$ er t-værdien på 95 % niveau med en frihedsgrad (d.f.) på $n_1 + n_2 - 2$.

t-testen og beregningen af 95 % confidensintervallet udføres på grundlag af logaritmerede værdier. For hvert temperaturniveau udføres der således på de forskellige aflæsningstidspunkter en beregning af forskellen imellem de anvendte værdier i prøverne A/2 og B/2. De anvendte værdier fremgår af de vedlagte originale aflæsningsbilag (værdierne er omkranset af en rød ring). Disse værdier logaritmeres og anvendes til de ovennævnte tests.

t-test og beregning af 95 % konfidensinterval, Ribe

aflæsningsdato	dyknings temp. (°C)	log gns., prøve A/2	log gns., prøve B/2	s_1^2 for prøve A/2	s_2^2 for prøve B/2	fælles spredning, sp	frihedsgrader	t-værdi	signifikans	95% konfidensinterval for forskellen imellem de logaritmiske gennemsnit af A/2 og B/2 (x)
07.04.94	7	5,28	5,52	0,00126	0,000625	0,03197	8	11,630	ja	$0,19 < x < 0,29$
07.04.94	21	4,15	5,05	0,000827	0,000225	0,02452	8	56,863	ja	$0,86 < x < 0,94$
07.04.94	30	2,45	2,90	0,0993	0,00750	0,24486	7	2,740	ja	$0,06 < x < 0,84$
05.05.94	7	4,57	5,34	0,116	0,000587	0,20944	8	5,696	ja	$0,46 < x < 1,08$
05.05.94	21	3,35	3,37	0,0148	0,0181	0,12390	6	0,198	nej	-
05.05.94	30	<2,00	<2,00	-	-	-	-	-	-	-
02.06.94	7	4,76	5,31	0,00202	0,00123	0,04152	8	20,522	ja	$0,49 < x < 0,61$
02.06.94	21	2,65	<2,00	0,0211	0,00000	0,1027	10	10,962	ja	$0,52 < x < 0,78$
02.06.94	30	<2,00	<2,00	-	-	-	-	-	-	-

t-test og beregning af 95 % confi nsinterval, Haderslev

aflæs- nings- dato	dyrk- nings- temp. (°C)	log gns., prøve A/2	log gns., prøve B/2	s_1^2 for prøve A/2	s_2^2 for prøve B/2	fælles spred- ning, sp	fri- heds grad er	t- værdi	sig- ni- fi- kans	95% confi- dens-inter- val for forskellen imellem de logaritmis- ke gennem- snit af A/2 og B/2 (x)
07.04.94	7	5,25	5,36	0,000467	0,0102	0,08093	10	2,106	nej	-
07.04.94	21	4,22	5,16	0,000627	0,000567	0,02459	10	59,221	ja	0,90<x<0,98
07.04.94	30	2,10	3,23	0,0240	0,0135	0,13693	10	14,294	ja	0,95<x<1,31
04.05.94	7	5,03	5,15	0,00199	0,000450	0,04163	6	3,530	ja	0,04<x<0,20
04.05.94	21	3,54	4,26	0,0046	0,00158	0,05208	8	21,417	ja	0,64<x<0,80
04.05.94	30	<2,00	<2,00	-	-	-	-	-	-	-
01.06.94	7	4,75	4,97	0,00627	0,00227	0,06535	10	5,831	ja	0,14<x<0,30
01.06.94	21	2,93	3,65	0,0135	0,000547	0,08381	10	14,880	ja	0,61<x<0,83
01.06.94	30	<2,00	<2,00	-	-	-	-	-	-	-

DISKUSSION

Prøver inkuberet ved 7°C (se figurerne 1 og 2):

Der ses en hvis reduktion af antallet af FS i de 3 måneder forsøget forløber, såvel i den ubehandlede gylle (prøve A/2) som i den termofilt stabiliserede gylle (prøve B/2).

Prøve A/2 er således reduceret med 0,75 og 0,83 log-enheder over hele perioden i henholdsvis Ribe og Haderslev.

Prøve B/2 er reduceret med 0,21 og 0,62 log-enheder over den samme periode i henholdsvis Ribe og Haderslev.

De omtalte reduktioner er foregået jævnt over hele perioden. Med undtagelse af aflæsningen d. 07.04.94 i Haderslev har indholdet af FS i B/2 været signifikant højere end i A/2.

Ved at ekstrapolere kurverne (det forudsættes at de er lineære) kan det beregnes, hvor lang tid der går inden FS-indholdet er reduceret til mindre end 2,00 log-enheder ved konstant opbevaring ved 7°C:

Prøve A/2: log antal FS i udgangsmateriale: $(5,59 + 5,51)/2 = 5,55$. Log reduktion i 3 måneder: $(0,83 + 0,75)/2 = 0,79$.

Antal måneder før log antal FS er < 2,00:

$(5,55 - 2,00) * 3/0,79 = 13,5$ måneder.

Prøve B/2: log reduktion i 3 måneder: $(0,62 + 0,21)/2 = 0,415$.

Antal måneder før log antal FS er < 2,00:

$(5,55 - 2,00) * 3/0,415 = 25,7$ måneder.

Prøver inkuberet ved 21°C (se figurerne 1 og 2):

Der ses en kraftigere reduktion af antallet af FS end i prøverne inkuberet ved 7°C.

Prøve A/2 er reduceret med 2,84 og 2,65 log-enheder over hele perioden i henholdsvis Ribe og Haderslev.

Prøve B/2 er reduceret med > 3,51 og 1,94 over den samme periode i henholdsvis Ribe og Haderslev.

For prøve A/2 samt for prøve B/2 i Haderslev er reduktionerne foregået jævnt over hele perioden. I prøve B/2 i Ribe er der foregået en kraftigere reduktion efter dag 28 i forsøget.

Indholdet af FS i B/2 har været signifikant højere end i A/2 i hele forsøgsperioden i Haderslev. Dette er også tilfældet i Ribe til og med dag 28 i forsøget. Derefter sker der en kraftig reduktion i indholdet af FS i prøve B/2. Dette bevirker, at der på dag 56 ingen signifikans er imellem indholdet af FS i prøverne A/2 og B/2. På dag 84 (forsøgets afslutning) er indholdet af FS i prøve A/2 signifikant højere end i prøve B/2. Der er ingen umiddelbar forklaring på dette forhold. Da der ikke er nogen faktorer i det øvrige forsøg, der indikerer at en så kraftig reduktion vil finde sted efter dag 28 (hverken ved 7°C, 21°C i Haderslev eller ved 30°C) vælges der at se bort fra denne kraftige reduktion i forsøget.

Beregning af tiden der går før indholdet af FS er reduceret til < 2,00 log-enheder:

Prøve A/2: log reduktion i 3 måneder: $(2,65 + 2,84)/2 = 2,745$.
Antal måneder før log antal FS er < 2,00:
 $(5,55 - 2,00) * 3/2,745 = 3,9$ måneder.

Prøve B/2: lig reduktion i 3 måneder: 1,94 (fra Haderslev).
Antal måneder før log antal FS er < 2,00:
 $(5,59 - 2,00) * 3/1,94 = 5,6$ måneder.

Prøver inkuberet ved 30°C (se figurerne 1 og 2):

Antallet af FS i prøverne reduceres hurtigere end ved 7°C og 21°C.

Begge prøver er reduceret til < 2,00 efter 56 dage.

Der er signifikant forskel imellem prøverne A/2 og B/2 efter 28 dage, idet FS-indholdet i prøve B/2 ligger højest.

Beregning af tiden der går, før indholdet af FS er reduceret til < 2,00:

Prøve A/2: log reduktion i 1 måned: $(3,59 + 2,98)/2 = 3,285$.
Antal måneder før log antal FS er < 2,00:
 $(5,55 - 2,00) * 1/3,285 = 1,1$ måned.

Prøve B/2: log reduktion i 1 måned: $(2,36 + 2,65)/2 = 2,505$.
Antal måneder før log antal FS er < 2,00:

$(5,55 - 2,00) * 1/2,505 = 1,4$ måned.

Der er påvist Salmonella-bakterier af typen S. typhimurium i prøve A/2 inkuberet ved 7°C i både Ribe og Haderslev ved forsøgets afslutning.

Dette viser, at der har været Salmonella-bakterier i udgangsmaterialet i prøve A/2. Det er ikke overraskende at finde Salmonella-bakterier ved forsøgets afslutning i prøverne inkuberet ved 7°C, da vores forsøgsresultater har vist et højt indhold af FS i den rå biomasse på dette tidspunkt (FS er indikator for evt. forekomst af Salmonella-bakterier og øvrige patogener i biomassen).

I prøverne A/2 inkuberet ved 21°C og 30°C er der ikke påvist Salmonella-bakterier. Dette kan heller ikke forventes, idet indholdet af FS er reduceret til meget lave værdier.

I prøverne B/2 er der ikke fundet Salmonella-bakterier. Dette skyldes sikkert, at udgangsmaterialet er termofilt stabiliseret, og en kontrolanalyse ved forsøgets start har vist, at indholdet af FS er mindre end 100/g.

KONKLUSION

Forsøget viser:

1. at indholdet af FS reduceres ved opbevaring af biomasse, såvel ubehandlet som termofilt stabiliseret, over en periode.
2. at indholdet af FS reduceres hurtigst ved 30°C, langsommere ved 21°C og langsomst ved 7°C.
3. at FS reduceres hurtigere i ubehandlet biomasse end i termofilt stabiliseret biomasse.
4. at Salmonella-bakterier kan overleve i lang tid i biomasse såfremt opbevaringstemperaturen er lav (i forsøget 7°C).

ad 2):

Årsagen til at bakterieantallet reduceres hurtigst ved 30°C, langsommere ved 21°C og langsomst ved 7°C kan skyldes, at der er størst mikrobiologisk aktivitet ved 30°C, mindre aktivitet ved 21°C og mindst aktivitet ved 7°C. Dette betyder, at der hurtigere sker en vækst og drab af bakterier under disse forhold (enzymsystemerne arbejder hurtigere ved 30°C end ved 7°C). Endvidere vil der være større konkurrence under disse forhold, da der er flere bakterietyper der kan vokse ved 30°C end ved 7°C.

ad 3):

Årsagen til dette kan være 1) at der ved efterkontaminationen (podning med FS i prøve B/2) ikke er andre mikroorganismer til at hæmme FS's vækst (der er ingen medkonkurrerende mikroorganismer, da de er dræbt ved den termofile forgæring) 2) at der er væksthæmmende mediatorer i den rå biomasse som ikke findes i den behandlede biomasse 3) at der er vækstfremmende mediatorer i den behandlede biomasse som ikke findes i den ubehandlede biomasse.