

FLEMMING BOISEN

PATOGENE BAKTERIERS VÆKSTFORHOLD

I BIOMASSE

DEL-RAPPORT TIL

SMITSTOFREDUKTION I BIOMASSE

RAPPORT VEDRØRENDE

DET VETERINÆRE FORSØGSPROGRAM

I

BIOGASFÆLLESANLÆG

BIND II: DEL-RAPPORTER OG BILAG 1995

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

BIOGAS FÆLLESANLÆG

PROJEKT:

PATOGENE BAKTERIERS

VÆKSTFORHOLD I BIOMASSE

**MLK FYN I/S
Mikrobiologisk laboratorium
Lille Tornbjerg Vej 24
5220 Odense SØ**

**Flemming Boisen
Afdelingsdyrlæge**

November 1994

BAGGRUND OG FORMÅL

I opfølgingsprogrammet for biogasområdet 1992-1994 gennemføres en række veterinære undersøgelser, som beskrevet i forslag til et veterinært forsøgsprogram fremsendt af Veterinærdirektoratet til Energistyrelsen d. 15. juli 1991. MLK FYN, Mikrobiologisk Laboratorium udfører en del af disse opgaver. Ved styregruppens og laboratoriegruppens møder i efteråret 1993 blev det drøftet at gennemføre yderligere undersøgelser af patogene bakteriers smitteveje i forbindelse med behandling af gylle og organisk affald i biogafællesanlæg.

Formålet med nærværende projekt er at undersøge og belyse forskellige relevante patogene bakteriers overlevelsesmuligheder og vækstforhold under lagring i rå biomasse og færdigbehandlet, afgasset biomasse, udført gennem kontrollerede forsøgsbetingelser.

MATERIALER OG METODER.

Biomasse.

I undersøgelsen blev anvendt fire prøvetyper. To prøver stammer fra BFA Fangel, der forhygiejniserer biomassen ved 55°C, og hvor biogasreaktoren fungerer ved mesofilt temperaturniveau. Andre to prøver stammer fra BFA Revninge, der alene arbejder med et mesofilt temperaturniveau.

I Fortank fra BFA Fangel (F2), 10 liter.

II Lagertank fra BFA Fangel (L1), 10 liter.

III Gylletank fra Revninge (F1), 10 liter.

IV Lagertank fra Revninge (L2), 8 liter.

Prøverne blev primært udtaget i nye plastspande i mængde af 20 kg og derefter filtreret gennem en metalsi på laboratoriet. De resulterende 8-10 liter blev overført til en 25 liter ren plastdunk med skruelåg. Disse 4 dunke med flydende biomasse blev anvendt i det videre pilotforsøg.

Testorganismer.

Følgende patogene bakterier fra laboratoriets kultursamling blev anvendt til podning af de 4 flydende biomasser:

1. *Salmonella Typhimurium*, der blev tilsat i renkultur i antal af 2900 pr. 100 ml biomasse.
2. *Listeria monocytogenes*, der blev tilsat i renkultur i antal af 1000 pr. ml. biomasse.
3. *Campylobacter jejuni*, der blev tilsat i renkultur i ukendt antal efter vækst i selektiv bouillon.
4. *Yersinia enterocolitica* 0:3, der blev tilsat i renkultur i antal af 1000 pr. ml biomasse.
5. *Escherichia coli* 0157:H7, der blev tilsat i renkultur i antal af 20 pr. ml. biomasse.

Testorganismene blev tilsat d. 15.03.94 og fordelt i biomasseprøverne ved manuel omrystning af dunkene 25 gange. Dunkene blev herefter indtil 18.04.94. placeret på magnetomrører og anbragt under kontrollerede forhold i særskilt lagerbygning, hvor der hersker udetemperatur.

Metoder.

Forekomsten af *Salmonella* spp. blev undersøgt kvantitativt ved modificeret anvendelse af DS 266, 1988, MPN metoden. Som fast selektivt, indikativt medium blev anvendt Rambach Agar.

Suspekter Salmonella kolonier blev konfirmeret ved TJS-reaktion og serumagglutination. Hver biomasse blev undersøgt 3 gange parallelt.

Forekomsten af *Listeria monocytogenes* blev undersøgt kvalitativt og kvantitativt ved anvendelse af NMKL 136, 1990. Kendte 10-folds fortyndinger blev undersøgt for forekomst af *Listeria monocytogenes* ved opformering og selektiv, indikativ dyrkning på Oxford Agar og/eller Palcam Agar. Suspekter *Listeria* kolonier blev identificeret som *Listeria monocytogenes* ved Accu Gen Probe Teknik. Hver biomasse blev undersøgt 3 gange parallelt.

Forekomsten af *Yersinia enterocolitica* 0:3 blev undersøgt kvalitativt ved anvendelse af NMKL 117, 1987. Hver biomasse blev analyseret 1 gang efter 4 dages opformering, alternativt 21 dages opformering. Suspekter *Yersinia* kolonier blev konfirmeret ved biokemiske reaktioner i urea/indol bouillon. *Yersinia enterocolitica* blev identificeret ved API 20E profilen.

Forekomsten af *Campylobacter* spp. blev undersøgt kvalitativt ved anvendelse af NMKL 119, 1990. Hver biomasse blev analyseret 1 gang. Suspekter *Campylobacter* kolonier på selektiv, indikativ CCDA blev identificeret som *Campylobacter jejuni/coli/lari* ved Accu Gen Probe Teknik.

Forekomsten af *Escherichia coli* 0157 blev undersøgt kvalitativt ved anvendelse af in house metode (Dansk Standard forskrift findes ikke), bestående af Petrifilm, Fluorocult Agar og Sorbitol MacConkey Agar. Hver biomasse blev analyseret 1 gang. Suspekter *E. coli* 0157 blev identificeret på reaktionsskive ved ELISA immunoblot procedure samt latex agglutinationstest.

RESULTATER OG DISKUSSION.

Samtlige resultater er vist i tabel 1.

Salmonella spp. blev primært påvist i Fangel F2 (prøve I) i antal af gns. ca. 12.000 pr. 100 ml, hvilket er ca. 4 gange så meget som det tilsatte antal Salmonella Typhimurium. Dette kan forklares ved, at der naturligt har været indhold af Salmonella i biomassen i fortanken. I Fangel L1 (prøve II) blev der påvist i gns. ca. 730 Salmonella pr. 100 ml, hvilket kun er ca. 25% af det tilsatte. Det tyder på, at biomassen har haft en væksthæmmende effekt. Efter lagring i ca. 1 måned blev påvist i gns. ca. 10.000 Salmonella pr. 100 ml i Fangel F2, hvilket viser en konstant overlevelse i prøve I. Tilsvarende blev efter ca. 1 måned påvist i gns. ca. 4.000 Salmonella pr. 100 ml i Fangel L1 (prøve II). Dette resultat antyder talmæssigt en opformering af Salmonella i den forhygiejniserede lagertankprøve fra Fangel i forhold til det primære resultat på ca. 5 gange. Men når man tager undersøgelsesteknikken, dvs. MPN-metodens statistiske princip i betragtning, så kan dette ikke bekræftes ved denne undersøgelse.

For Revninge F1 (prøve III) fandtes primært gns. ca. 275 Salmonella pr. 100 ml. svarende til 10% af det tilsatte niveau af Salmonella Typhimurium. Der synes således ikke på undersøgelsestidspunktet at være et højt naturligt indhold af Salmonella, snarere en væksthæmmende effekt i biomassen. I Revninge L2 (Prøve IV) fandtes i gns. ca. 3.800 Salmonella pr. 100 ml., hvilket er nær ved det tilsatte niveau. Efter lagring i ca. 1 måned fandtes fortsat ca. 10% Salmonella i prøve III, svarende til konstant indhold. Prøve IV indeholdt efter 1 måned i gns. ca. 900 Salmonella pr. 100 ml, hvilket antyder et fald i Salmonella indholdet i denne prøvetype, men det kan ikke dokumenteres ud fra MPN-metodens statistiske princip..

Listeria monocytogenes blev primært påvist i prøve I i niveau 100-1000 pr. ml. biomasse, d.v.s. nær det tilsatte antal. I prøve II blev påvist i niveau 1.000 - 10.000 Listeria pr. ml. Efter 1

måneds lagring blev påvist henholdsvis >10 pr. ml. og >10.000 pr. ml. Der er således overlevelse i både fortank og lagertank, men ikke noget markant tegn på opformering. I prøve III og IV fandtes mellem 100 og 1.000 *Listeria* pr. ml., og efter 1 måneds lagring blev påvist >10 pr. ml.

Campylobacter jejuni/coli/lari kunne påvises i alle 4 primære prøver, mens den ikke kunne påvises i Fangel L1 (prøve II) efter 1 måneds lagring. Ved nærmere identifikation af *Campylobacter* species blev påvist såvel den tilsatte *Campylobacter* som *C.coli* og *C.lari*. Dette tyder på, at *Campylobacter* har været naturligt tilstede i biomassen. Ved udvælgelsen af suspekterte kolonier til identifikation er det ikke muligt at se entydig forskel på species.

Yersinia enterocolitica blev påvist i alle 4 primære prøver, men efter 1 måneds lagring kun i prøve I og prøve III, derimod ikke i prøve II og prøve IV, som er de behandlede, afgassede bioprøver. Dette kunne tyde på en væksthæmmende effekt i sidstnævnte prøver eller manglende overlevelsesmulighed for *Yersinia*.

E.coli 0157 blev påvist ved den primære undersøgelse af prøve II og IV, d.v.s. i de behandlede, afgassede biomasser, men ikke i prøve I og II. Dette kan formentlig forklares som en kraftig væksthæmmende effekt på *E.coli* 0157 i de ubehandlede biomasser og/eller en dominans og overvækst af andre fækale coliforme bakterier. Denne effekt ses ikke i de afgassede prøver, hvor *E.coli* 0157 i det tilsatte niveau på 20 pr. ml. let kan genfindes. Det samme genfindelsesmønster ses efter 1 måneds lagring af prøverne.

De korresponderende FS-resultater fra prøver udtaget d. 14.03.94, var: Fangel fortank 2.300.000 FS/gram, Fangel lagertank 670 FS/gram, Revninge gylletank 4.000.000 FS/gram, Revninge

lagertank 18.000.000 FS/gram.

Denne pilotundersøgelse blev udført på den flydende del af biomassen, for at lette fordelingen af den tilsatte testorganisme og derved gøre prøverne så homogene som mulig. Prøverne henstod i lagringsperioden under konstant magnetomrøring og inden hver delprøveudtagning blev dunken manuelt vendt 10 gange. Til trods for disse foranstaltninger kan man næppe opnå fuldstændig homogenitet i biomassen. For at sikre at den anførte homogenitetsprocedure dog var tilstrækkelig, blev der udført 3-dobbelt kvantitativ undersøgelse af *Salmonella* spp. og *Listeria monocytogenes* såvel ved pilotforsøgets start som efter lagringsperioden. *Salmonella* resultaterne dokumenterer, at fordelingen af testorganismer har været tilfredsstillende, idet der ved tolkningen af resultaterne også skal tages hensyn til MPN-metodens usikkerhed i form af spredning på resultaterne.

Prøverne blev i lagringsperioden fra 15.03.94 til 18.04.94 exponeret for den faktiske udetemperatur. Det fremgår af figur 1, at temperaturen i perioden har været fra -3°C til $+13^{\circ}\text{C}$ med en middeltemperatur omkring $+8^{\circ}\text{C}$. Dette svarer til de virkelige temperaturforhold i biogasfællesanlæggene på årstiden.

KONKLUSION.

Efter lagring i ca. 1 måned under kontrollerende pilotforsøgsbetingelser af 2 prøver ubehandlede biomasser og 2 prøver behandlede, afgassede biomasser af forskellig oprindelse fandtes at:

- *Salmonella* spp. kunne påvises i alle prøver ubehandlet biomasse og afgasset biomasse.

- *Listeria monocytogenes* kunne påvises i alle prøver ubehandlet biomasse og afgasset biomasse.
- *Campylobacter jejuni/coli/lari* kunne påvises i 1 prøve ubehandlet biomasse og 2 prøver afgasset biomasse.
- *Yersinia enterocolitica* kunne påvises i 2 prøver ubehandlet biomasse, men ikke i afgasset biomasse.
- *Escherichia coli* 0157 kunne ikke påvises i ubehandlede biomasser, men derimod i 2 prøver afgasset biomasse.

Denne undersøgelse har vist, at der potentielt foreligger gode overlevelsesmuligheder i biomasser for patogene bakterier, der er af betydning både for folkesundheden og for sygdomme hos husdyr. Denne overlevelse har væsentlig betydning, såfremt den rå biomasse ikke behandles tilstrækkeligt eller ukorrekt i biogasfællesanlæg, eller såfremt afgasset hygiejniseret biomasse bliver efterkontamineret i lagertank inden genbrug ved udlægning på jord.

REFERENCER.

1. Bendixen, H.J. Det veterinære forsøgsprogram i biogasfællesanlæg. Midtvejsrapport vedrørende 10 biogasfællesanlæg. November 1993.
2. Bendixen, H.J. og Ammendrup, S. Smittebeskyttelse i biogasfællesanlæg. Veterinærdirektoratet. Rapport, delprojekt 4. 1991.

Tabel 1: Resultaterne af genfindelse af 5 testorganismer i 4 prøver ubehandlet biomasse og 4 prøver behandlet, afgasset biomasse. (Resultaterne er opstillet parvis, således: Prøvetype 609=830, 613=831, 618=832, 624=833. Prøve 609, 613, 618, 624 repræsenterer de primære undersøgelser. Prøve 830, 831, 832, 833 repræsenterer undersøgelser efter ca. 1 måned).

LABNR. Prøvetype og prøvested	SALMONELLA SPP./100 ml	LISTERIA MONOCYTOGENES	CAMPYLOBACTER JEJUNI/COLL/LARI	YERSINIA ENTEROCOLITICA	E.COLI 0157:H7
VM 609 I Fortank(F2),Fangel primære undersøgelse	1. 11.000 2. 7.900 3. 17.000	1.ikke påvist i 25ml 2.ikke påvist i 25ml 3.PÅVIST >100<1000/ml	PÅVIST i 10ml	PÅVIST i 25ml	ikke påvist i 25ml
VM 830 I Fortank(F2),Fangel undersøgelse efter ca. 1 måned	1. 4.900 2. 13.000 3. 13.000	1.ikke påvist i 25ml 2.ikke påvist i 25ml 3.PÅVIST i 25ml	PÅVIST i 10ml	PÅVIST i 25ml	ikke påvist i 25ml
VM 613 II, Lagertank(I.1),Fangel primære undersøgelse	1. 700 2. 700 3. 790	1.ikke påvist i 25ml 2.ikke påvist i 25ml 3.PÅVIST >1000<10000/ml	PÅVIST i 10ml	PÅVIST i 25ml	PÅVIST i 25ml
VM 831 II, Lagertank(I.1),Fangel undersøgelse efter ca. 1 måned	1. 3.300 2. 4.900 3. 3.300	1.ikke påvist i 25ml 2.PÅVIST >100<1000/ml 3.PÅVIST >10000/ml	ikke påvist i 10ml	ikke påvist i 25ml	PÅVIST i 25ml
VM 618 III, Gylletank(F1),Revninge primære undersøgelse	1. 390 2. 170 3. 260	1.ikke påvist i 25ml 2.ikke påvist i 25ml 3.PÅVIST >100<1000/ml	PÅVIST i 10ml	PÅVIST i 25ml	ikke påvist i 25ml
VM 832 III, Gylletank(F1),Revninge undersøgelse efter ca. 1 måned	1. 330 2. 220 3. 200	1.ikke påvist i 25ml 2.PÅVIST i 25ml 3.PÅVIST i 25ml	PÅVIST i 10ml	PÅVIST i 25ml	ikke påvist i 25ml
VM 624 IV, Lagertank(L2),Revninge primære undersøgelse	1. 2.200 2. 7.900 3. 1.300	1.ikke påvist i 25ml 2.ikke påvist i 25ml 3.PÅVIST >100<1000/ml	PÅVIST i 10ml	PÅVIST i 25ml	PÅVIST i 25ml
VM 833 IV, Lagertank(L2),Revninge undersøgelse efter ca. 1 måned	1. 630 2. 790 3. 1.300	1.ikke påvist i 25ml 2.PÅVIST i 25ml 3.PÅVIST i 25ml	PÅVIST i 10ml	ikke påvist i 25ml	PÅVIST i 25ml

PROJEKT: BIOGAS, RUMTEMPERATUR FRA 15. MARTS 1994 12:11 TIL 18. APRIL 1994 1:56 LOGGER NUMBER 11007 ID NUMBER 49/2

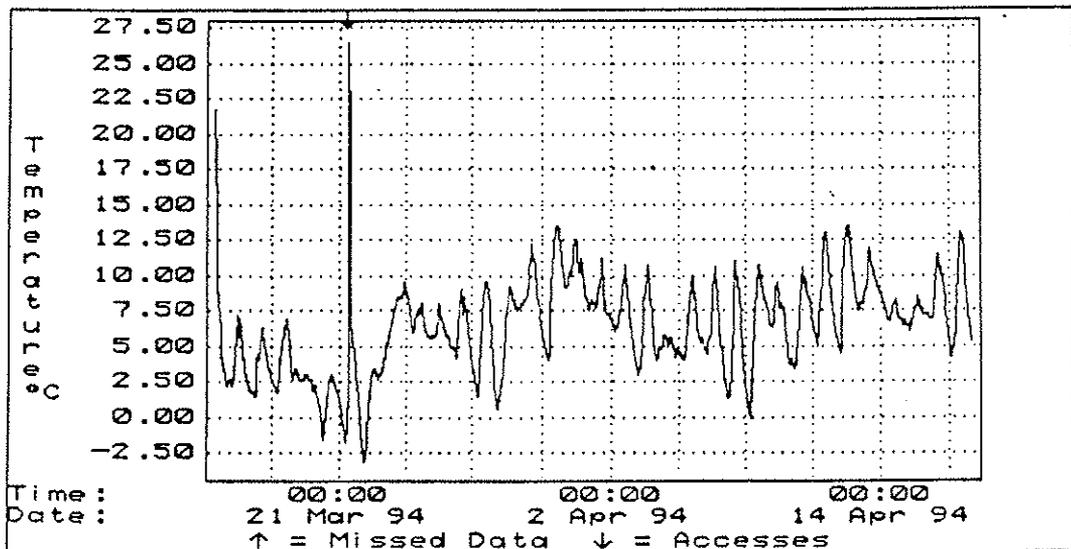
CONFIGURATION AND STATUS.

Serial Number.....11007 Id. Number.....49/2
 Temperature Minimum...-20.00 deg C. Resolution.....0.25 deg C.
 Maximum....40.00 deg C.
 Clock Interval.....1.875 minutes.
 Logger Date.....19 Apr 94 Time.....11:13
 Logging Interval...00:15.000
 Logged Samples.....3358 Logger Accesses.....5
 Samples Last Read.....570
 Logger Statuses...Logging, Power OK, Memory OK
 Text...
 Projekt: Biogas, Rumtemperatur
 Time Zone.....DK Denmark

DATA SUMMARY.

	Data Read		Data Reported	
Start :	Date..15 Mar 94	Time...12:11	Date..15 Mar 94	Time...12:11
Finish :	Date..19 Apr 94	Time...11:26	Date..18 Apr 94	Time...01:56
Samples :	Total.....3358	Missed.....0	Total.....3224	Missed.....0
	Accesses.....2		Accesses.....2	
Temps. :	Minimum...-3.00 deg C.		Minimum...-3.00 deg C.	
	Average....6.83 deg C.		Average....6.42 deg C.	
	Maximum...26.50 deg C.		Maximum...26.50 deg C.	

DATA PLOT.



Figur 1. Temperaturforløbet i lagringsperioden 15.03.94.-18.04.94. for patogene bakterier i biomasser.