

**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**



\*\*\*\*\*

**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.

Testorganismerne 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  $-3^{\circ}\text{C}$  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

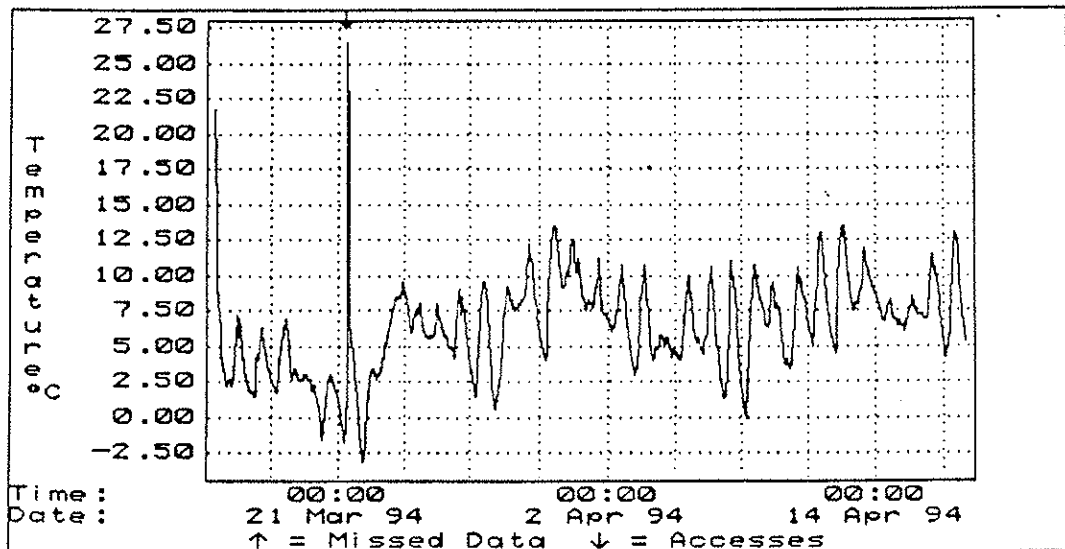
CONFIGURATION AND STATUS.

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.