

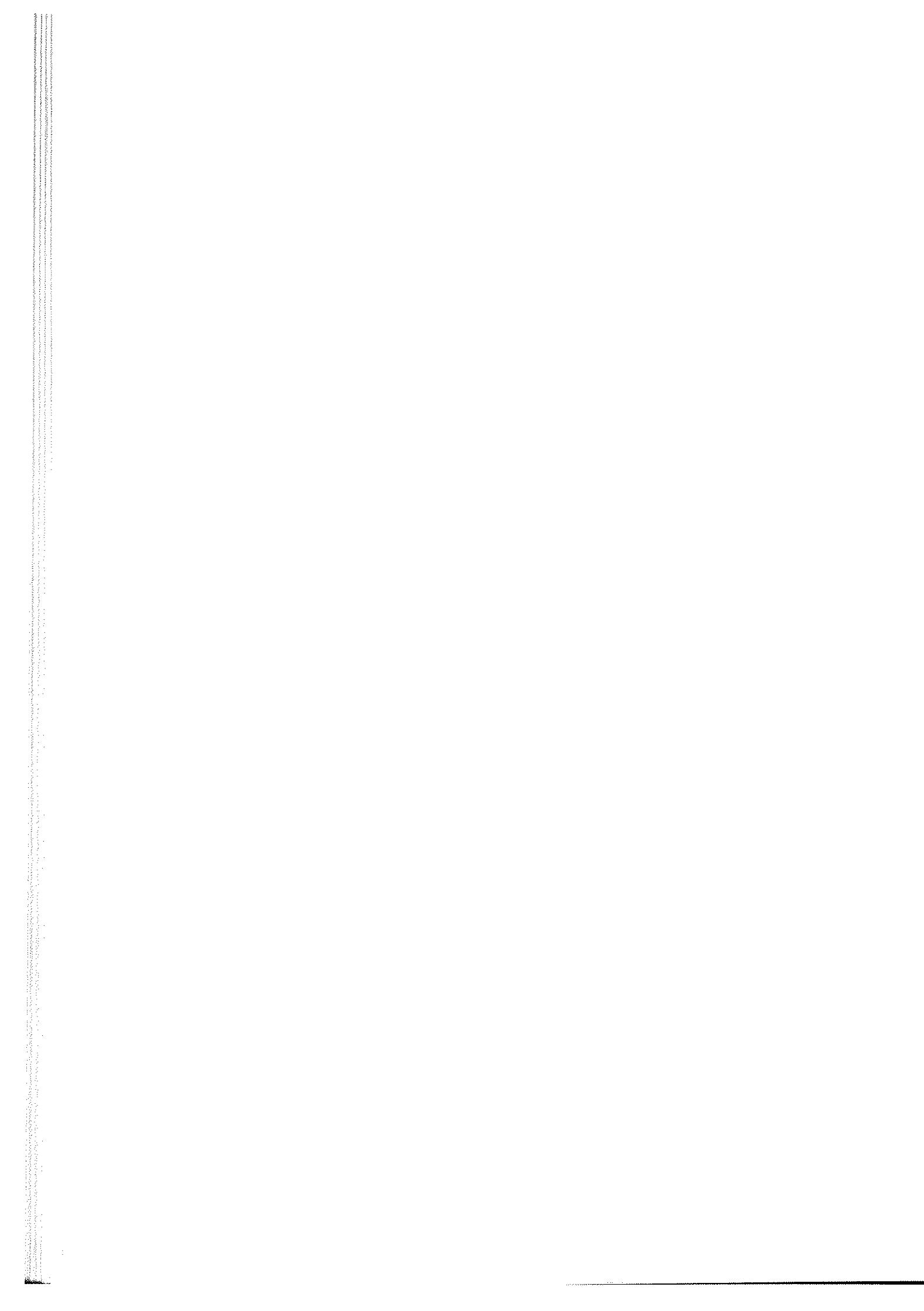
BILAG X

**BENTE LUND, VIBEKE FRØKJÆR JENSEN, PER HAVE,
BIRGITTE AHRING OG GERT JUNGERSEN**

**MODELSTUDIER VEDRØRENDE OVERLEVELSE AF VIRUS
I GYLLEBASERET BIOMASSE UNDER UDRÅDNING I
LABORATORIE-SKALA BIOGASANLÆG**

**DEL-RAPPORT TIL
SMITSTOFREDUKTION I BIOMASSE
RAPPORT VEDRØRENDE
DET VETERINÆRE FORSØGSPROGRAM
I
BIOGASFÆLLESANLÆG**

BIND II: DEL-RAPPORTER OG BILAG 1995



MODELSTUDIER VEDRØRENDE OVERLEVELSE AF VIRUS I GYLLEBASERET BIOMASSE UNDER UDRÅDNING I LABORATORIE-SKALA BIOGASANLÆG

Udført i samarbejde mellem:

**Dansk Teknologisk Institut, Afdelingen for Bioteknik
og
Statens Veterinære Institut for Virusforskning**

November 1994

Finansieret af Energistyrelsens Udviklingsprogram

DANSK RESUME

Reduktionen af porcint parvovirus (PPV), bovint enterovirus (BEV) og fæcale streptococcer (FS) opblændet i kontinuerte model biogasreaktorer kørt på gylle hhv gylle tilsat 20% husholdningsaffald er fulgt ved 35°C og 55°C samt i batchforsøg ved 70°C. Formålet med undersøgelserne var at undersøge smitstofreduktionen ved anaerob udrådning af gylle og evaluere FS som indikator (nu henført til Enterococcer).

Reduktionen af infektivt virus og FS er parallelt hermed fulgt i fysiologisk saltvand. Disse forsøg viser, at varmeinaktiveringen er en vigtig faktor i de termofile anlæg og den altdominerende faktor ved 70°C. Omend den termiske inaktivering er væsentlig i biogasreaktorer er det tydeligt, at der er andre faktorer i reaktormiljøet med væsentlig virucid og bakteriocid effekt. I de termofile batchforsøg med fysiologisk saltvand fås meget høje korrelationskoefficienter ved linær regression. For PPV ses en reduktion på 1 log/-37 timer og for BEV 1 log/35 minutter. I de kontinuerte reaktorer, hvor virusinaktiveringen kan følges over en længere periode, ses en høj inaktiveringshastighed initialt, faldende med tiden i de tilfælde hvor inaktivéringsforløbet kan følges over længere tid (PPV ved 55°C og BEV ved 35°C). Inaktivéringshastigheden for FS er generelt i størrelsesordenen en faktor 10 højere end for PPV og en faktor 10 lavere end for BEV (i den initiale fase). For FS opnås en 4 logaritmeenheds reduktion svarende til anbefalet minimum garanteret opholdstid (MGRT) på 300 timer ved 35°C og 1-2 timer ved 55°C. For PPV er ved ekstrapolation beregnet en MGRT på 11-12 timer ved 55°C i den initiale fase (0-4 timer) og 54 timer herefter (4-48 timer). For BEV fås tilsvarende en MGRT på 23 timer ved 35°C og <0,5 timer ved 55°C (sidstnævnte er behæftiget med stor usikkerhed). Forholdet mellem inaktivéringshastigheden i den initiale fase og den "terminale" fase er således en faktor 4 for PPV i termofile reaktorer. Der ses en tendens til en lavere inaktivéringshastighed i reaktorer tilsat 20 % husholdningsaffald end i reaktorer, der kun kører på gylle. Dette kan måske skyldes kemiske faktorer som NH₃ og H₂S, men kræver yderligere undersøgelser.

Forsøgene tyder på at fæcale streptococcer er en god indikator for inaktivering af enterovirus og mere følsomme virus (især under termofile forhold); imidlertid vil inaktivéringshastigheden for naturligt forekommende virus formentlig være lavere end bestemt her bl.a. som følge af højere grad af partikelassocation. Partikelassocationen kan således interferere med forholdet mellem reduktion af virus og reduktion af FS.

Parvovirus er pga den ekstreme varmeresistens velegnet til sammenlignende undersøgelser i temperaturområdet 50-80°C med henblik på at fastlægge holdetider ved forskellige temperaturer svarende til hygiejnisering ved 70°C i en time.

I nærværende forsøg er det ved anvendelse af parvovirus estimeret, at der ved 55 °C og en MGRT på ca 13 timer opnås en smitstofreducerende effekt svarende til 70°C i en time. Disse værdier må dog ikke betragtes som endelige, idet fx indlejring af virus i organrester kan yde en vis beskyttelse og dermed kræve længere holdetid for at opnå samme effekt. Dette forhold er belyst i en anden rapport i denne undersøgelsesrække (Vibeke Frøkjær Jensen: Overlevelse af virus i animalske produkter under udrådning/hygienisering i gylle under anaerobe forhold, SVIV december 1994).

ENGLISH SUMMARY

Model experiments concerning persistence of virus in manure under anaerobic digestion in laboratory scale biogas reactors

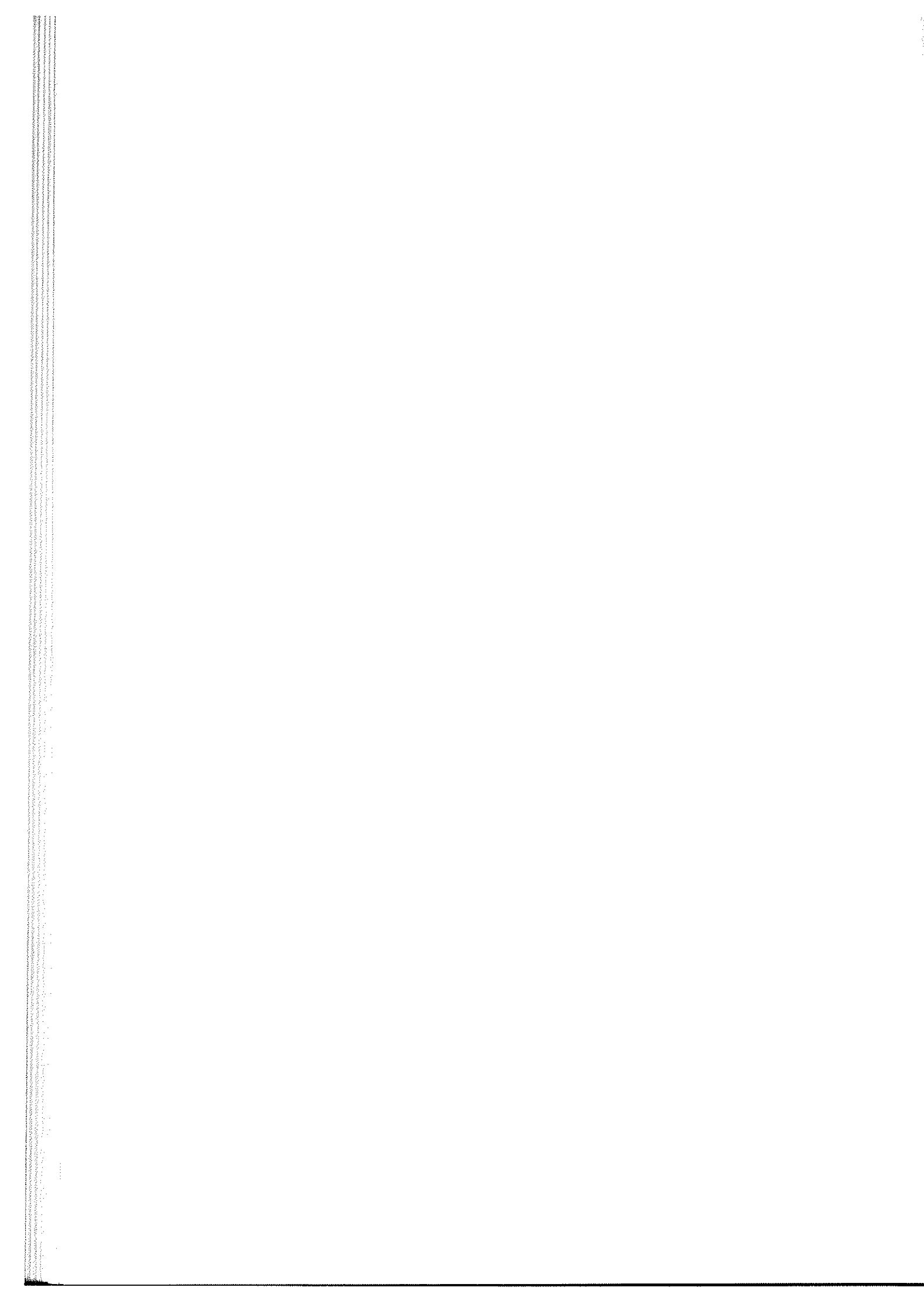
The reduction rates of porcine parvovirus (PPV), bovine enterovirus (BEV) and faecal streptococci (FS) have been measured in biogas reactors run continuously on manure and manure supplemented with household waste at 35°C and 55°C and with batch test at 70°C. The aim of the experiments was to study the sanitation effect of anaerobic digestion of manure and evaluate faecal streptococci (FS) as indicator (now Enteroccoci).

The reduction of virus and FS were followed in parallel in physiological saline solution. These tests show that the heat inactivation is an important factor in thermophilic biogas plants and the overall dominant factor at 70°C. the thermal inactivation is important in biogas reactors. However, other factors in the environment with a substantial virucidal and bacterial inhibiting effect are dearly involved in the inactivation.

In the thermophilic batch test with physiological saline, very high correlation-coefficients were found by linear regression. For PPV, a reduction of 1 log/37 hours and for BEV 1 log/35 minutes was found. In continuous reactors where inactivation can be followed over a longer period a high initial reduction rate is seen followed by a lower rate (PPV at 55°C and BEV at 35°C). The death rates for FS are generally 10 fold higher than for PPV and 10 fold lower than for BEV (in the initial phase). For FS a logarithmic reduction of 4 (corresponding to the recommended Minimum Guaranteed Retention Time, MGRT) was obtained after 300 hours at 35°C and after 1-2 hours at 55°C. For PPV, a MGRT of 11-12 hours is obtained at 55°C in the initial phase (0-4 hours) and 54 hours hereafter (4-48 h). Correspondingly for BEV a MGRT of 23 hours is obtained at 35°C and <0.5 hours at 55°C (the latter is a rough estimate using extrapolation). The ratio between the inactivation rate at 55°C in the initial phase and the later terminal phase is thus a factor 4 for PPV in thermophilic reactors. There is an indication of a lower inactivation rate in reactors where 20 % household solid waste is added than in reactors which only handle liquid manure. This could provisionally be related to chemical factors such as NH₃ and H₂S but needs further investigation.

The tests indicate that measuring the faecal streptococci is a good indicator for inactivation of enterovirus and other more heat sensitive virus especially under thermophilic conditions; however, the inactivation rate for natural occurring virus is expected to be lower than measured due to higher degrees of particle association. The particle association could thus interfere with the relationship between reduction in FS and virus.

Parvovirus is very suitable for comparative investigations on inactivation in the temperature area 55-80°C, due to the rather extreme heatresistance. However, in stipulating hygienic demands for biogasreactors it seems more reasonable to use less resistant virus such as reovirus and picornavirus.



FORORD

Nærværende rapport er resultatet af et samarbejde mellem Statens Veterinære Institut for Virusforskning (SVIV) og Dansk Teknologisk Institut, afd. for Bioteknik (DTI).

SVIV har opformeret og analyseret virus, DTI har kørt laboratoriebiogasreaktorerne under standardiserede og kontrollerede forhold, udtaget prøver samt opformeret og analyseret fæcale streptococcer.

Det er første gang, der i Danmark er udført forsøg med virusreduktion i kontinuerte biogasreaktorer under kontrollerede forhold. Forholdene i en biogasreaktor baseret på gylle vil adskille sig fra rå gylle som følge af en øget mikrobiel aktivitet i reaktoren, hvorfor koncentrationen af potentielt hæmmende stoffer, der er mikrobielle nedbrydningsprodukter - ammoniak, flygtige fede syrer, og svovlbrinte - kan være betydelig forskellig fra rå gylle.

Samarbejdet mellem de to institutioner har gjort det muligt at klarlægge nogle problemstillinger, der med relativt få supplerende undersøgelser vil kunne danne grundlag for praktisk anvendelige anbefalinger for hygiejnisering på biogasfællesanlæg.

Undersøgelsen er gjort mulig ved finansiering under det veterinære overvågningsprogram for biogasfællesanlæg (Energiministeriet).

H.J. Bendixen takkes for diskussioner undervejs og Lis Christensen og Hanne Sachler for teknisk assistance.

Statens Veterinære Institut for Virusforskning (Per Have og Vibeke Frøkjær Jensen)

Dansk Teknologisk Institut, Afdelingen for Bioteknik (Birgitte Ahring, Bente Lund og Gert Jungersten)

INDHOLDSFORTEGNELSE

	<u>Side</u>
Dansk resume	2
Engelsk resume	4
Forord	6
Indholdsfortegnelse	7
Formål	9
Baggrund	9
Projektbeskrivelse	14
Kontinuerte reaktorforsøg	15
Batchforsøg	16
Materialer og metoder	16
Substrat	16
Kulturer	17
Medier	17
Mikrobiologiske analyser	18
Kemiske analyser	19
Opstart af biogasreaktorer	19

	<u>Side</u>
Resultater	22
Batchforsøg	26
Mesofilt i fysiologisk saltvand	26
Termofilt i fysiologisk saltvand	28
Kontinuerte reaktorer	31
Mesofil udrådning af gylle tilsat blegejord	32
Termofil udrådning af gylle tilsat blegejord	35
Termofil udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald	41
Hygiejnisering	48
Opsummering af resultater	50
Batch forsøg	50
Kontinuerte reaktorer	51
Diskussion	57
Konklusion	65
Ordliste	69
Litteraturliste	71

FORMÅL

Projektets formål er at undersøge overlevelse af virus ved mesofil og termofil anaerob udrådning af gylle og gylle tilsat anden biomasse i biogasreaktorer.

Undersøgelsen giver information om inaktiveringsforløbet for virus i biogasreaktorer til afklaring af hvilke driftparametre, der er nødvendige for at opnå en smitstofreducerende effekt, svarende til en hygiejniserig ved 70°C i en time, jvf slambekendtgørelsen (MM bek. nr.736 af 26/19 1989, om anvendelse af slam, spildevand og kompost mv. til jordbrugsformål).

Laboratorieforsøgene er gennemført i et modelanlæg, hvor forholdene nøje svarer til betingelserne i fungerende danske biogasfællesanlæg.

BAGGRUND

Frygt for smittespredning kan fremover vise sig at være en væsentlig hindring for øget genanvendelse af organisk affald. Da en total smitstoffjernelse er økonomisk og praktisk urealistisk, vælges det oftest at kræve en smitstofreducerende behandling der nedbringer smitstofindholdet til et acceptabelt niveau for den pågældende genanvendelsesmåde. Dette vurderes i forhold til smittebelastningen fra andre eventuelle kilder i miljøet eller direkte til individet.

I biogasanlæg behandles især følgende biomasser:

Gylle: Mængderne af husdyrgødning er ca fem gange større end mængderne af organisk affald fra husstande og industri (annon. 1991). Gylle kan indeholde en lang række patogener indenfor bakterier, parasitter og virus. På danske biogasanlæg udrådnes typisk 15-20% industriaffald sammen med gyllen.

Organisk industriaffald: Fedtslam, ristestof, flotationsslam og andet fast affald separeret fra spildevand fra bearbejdning af vegetabiliske og animalske råvarer, herunder slagterispildevand. Affaldet har et patogenindhold; der svarer til de råmaterialer hvorfra de stammer og til de forhold hvorunder de opsamles.

Spildevandsslam: I stigende omfang anvendes i BFA slam fra kommunale spildevandsrensningsanlæg. Dette slam indeholder vekslende mængder dyre- og menneskepatogener, idet de fleste behandlinger for spildevandsrensningsanlæggene ikke medfører nævneværdig smitstofreduktion.

Husholdningsaffald: Den organiske fraktion af husholdningsaffald vil indeholde et bredt spektrum af dyre- og menneskepatogener fra affald af animalsk oprindelse: kødaffald, indvolde, æggeskaller og rå og fordærvede madrester, samt evt fækalier fra husstandens kæledyr, og humant affald som engangslommetørklæder, -vaskeklude,-bleer og bind. Niveauet af patogener i husholdningsaffald er højere end det, der er fundet i dansk spildevandsslam (Ilsøe, 1992).

De forskellige affaldstyper inddeltes efter forventet smitstofindhold, således at slam og spildevand fra vegetabilsk produktion og mejerier (kategori A) kan anvendes uden hygiejniske restriktioner. Slam fra animalsk produktion (kategori B), kan genanvendes i ubehandlet form, blot det opblandes med jorden umiddelbart efter tilførsel, og det behandlede affald kan genanvendes uden restriktioner. Husholdningsaffald (kategori C) må ikke genanvendes råt, og spildevandsslam (kategori D) må kun genanvendes råt, hvis det nedfældes direkte under jordoverfladen. For både kategori C og D gælder desuden, at de arealer der modtager behandlet affald, pålægges dyrkningsmæssige restriktioner, der er afstemt efter affaldstype og behandlingsgrad (jfv slambekendtgørelsen).

Foreløbelig anvendes i danske biogasfællesanlæg hovedsagelig produkter tilhørende kategori A og B samt husdyrgødning, der alene udgør ca. 80% af den samlede biomasse (Tafdrup, 1994).

Graden af smitstofreduktion under forskellige affaldsbehandlingsmetoder er bestemt af flere forskellige fysiske og kemiske faktorer. Den termiske inaktivering er den faktor, der er bedst beskrevet, og da den er relativ enkel at overvåge og beskrive, vælges varmebehandlingsgraden oftest som fysisk parameter for smitstofreduktionen. Måling af temperatur og tid har vist sig ikke i alle tilfælde at være velegnet som eneste parametre til måling af smitstof-inaktiveringen. I flere lande er det foreslået, at der suppleres med krav om overvågning af såvel procesforløb som produktkvalitet - i form af et maximalt indhold af egnede indikatororganismer (Ilsøe, 1993).

På basis af de senere års erfaringer i danske biogasfællesanlæg (BFA) (programmet for veterinær forskning og rådgivning i forbindelse med etablering og drift af biogasfællesanlæg udført siden 1988 på 5 danske biogasfællesanlæg) er foreslået følgende hygiejniseringskriterier (Bendixen & Ammendrup, 1991):

I termofile anlæg, hvor der behandles affald tilhørende kategori A og B, anbefales det, at biomassens sikrede opholdstid i reaktortanken er mindst 2 timer ved 55°C, eller mindst 4 timer ved 50°C, eller tilsvarende kombinationer mellem disse yderpunkter. Det er samtidig en forudsætning, at den gennemsnitlige passagetid gennem reaktortanken er mindst 2-3 døgn (I termofile

BFA er den hydrauliske opholdstid typisk over 10 døgn).

I mesofile anlæg anbefales det, at biomassen, når den indeholder affald af kategorierne A og B, holdes opvarmet i en hygiejniseringsstank ved mindst 55°C i mindst 4 timer, ved mindst 50°C i mindst 8 timer, eller tilsvarende kombinationer mellem disse yderpunkter. Tidsangivelsen svarer til mindste garanterede tilbageholdelsestid (MGRT). Affald tilhørende kategorierne C og D, bl.a kildesorteret husholdningsaffald og spildevandsslam skal være opvarmet i en hygiejniseringsstank ved mindst 70°C i mindst 1 time, eller tilsvarende (Bendixen, 1993).

Flere undersøgelser tyder på, at fæcale streptococcer (FS; nu henført til Enterococcer) kan bruges som indikator til kontrol med biogasfællesanlæggernes smitstofreducerende effekt (Bendixen, 1991 og 1994; Herning Kommunale Værker, 1993; Bennetzen & Mikkelsen, 1993). En Dansk Standard metodebeskrivelse er under udarbejdelse (Dansk Standard, 1993).

Den biomasse der modtages af biogasfællesanlæggene består i overvejende grad af gylle og godtning fra husdyr og indeholder derfor fæcale streptococcer. De almindeligst forekommende patogene bakterier og parasitter har i temperaturområdet mellem 0 og 55°C et henfald, der forløber parallelt med FS. FS indholdet i den ubehandlede biomasse varierer. Det er mest stabilt (fra 100.000 til 500.000 kim (CFU/g) i de store anlæg, der dagligt afhenter relativ frisk husdyrgødning. I mindre anlæg kan antallet periodevis falde til omkring 25.000 CFU/g, formentlig svarende til, at der afhentes gammel godtning i nogle besætninger. Visse typer industriaffald og husholdningsaffald kan indeholde op til 8-10 mill CFU/g. Der er således indikatorbakterier nok i fortankene på biogasfællesanlæggene. En 3-4 log reduktion, altså et fald fra fx 500.000 til under 100 FS/g biomasse kan opnås i velfungerende biogasfællesanlæg (Bendixen, 1991).

Også *E. coli* kan anvendes som indikatororganisme, men giver en mindre sikkerhedsmargin end fæcale streptococcer (Larsen et al. 1993). Undersøgelser af kmidtallene for sporedannerne *Clostridium perfringens* og *Bacillus spp.* viste, at kmidtallet holdt sig uændret fra ubehandlet til meso- og termofilt behandlet biomasse.

Ved undersøgelser af storskala anlæg er det vanskeligt direkte at sammenligne reduktionen af patogener (*Salmonella*, *Mycobacterium paraturberculosis*, *Clostridium perfringens* og *Bacillus spp.*) og indikatorer. Det skyldes primært de lave og variable koncentrationer af patogener i de tilførte biomasser (Larsen et al., 1993).

De fastsatte kriterier for hygiejnisering er især fastsat ud fra kendskab til overlevelse af bakterier og parasitter (Munch & Larsen, 1990).

En metode til kontrol med virus kunne være at følge inaktiveringen af et indikatorvirus i BFA. Dette frembyder imidlertid visse vanskeligheder:

En række virus som udskilles fra husdyrenes tarmkanal, er endemiske og derfor almindeligt forekommende i gylle. Porcint eller bovin parvovirus (Lund & Srivastava, 1980) er foreslægt som indikatorvirus, på grund af deres relativt høje resistens og fordi de er almindeligt forekommende i danske besætninger, men forekomsten i gylle er ukendt; dels er ikke alle besætninger inficerede, dels kan udskillelse fra persistent inficerede individer være intermitterende. I en canadisk undersøgelse (Derbyshire & Brown 1978) er fundet porcine enterovirus i gylle med koncentrationer op til $10^{5.5}$ TCID/l, men kun 24 af 32 prøver udtaget fra gylletanke i besætninger med fedesvin og 1 af 6 fra sobesætninger var positiv. Ved en anden undersøgelse er fundet, at porcint enterovirus er det hyppigst forekommende virus i svinegylle leveret til et biogasanlæg, men ved undersøgelser af forekomsten over et år var det ikke konstant forekommende i rågyllen (Derbyshire et al., 1986). Noget tilsvarende er formentlig gældende i DK.

Forekomsten af humane virus i spildevandsslam er ligeledes sparsomt undersøgt, bl.a. fordi virusisolering fra slam er vanskeligt - sensitiviteten er lav, på grund af høje koncentrationer af cytotoxiske stoffer i slammet og fordi virus i høj grad er associeret til partikelfasen. I en undersøgelse af spildevand og slam fra danske rensningsanlæg er fundet forskellige humane enterovirus samt adenovirus (Lund et al., 1984). Lydholm og Nielsen (1987) har fundet humane virus i koncentrationer op til 10^4 - 10^5 TCID/l slam.

Som følge af vanskelighederne ved at påvise lave koncentrationer af naturligt forekommende virus i gylle og slam samt den stærkt svingende forekomst af virus yankseliggør anvendelsen af et indikatorvirus som kontrol for anlæggenes virusinaktiviterende effekt. En mere realistisk metode til kontrol af virusinaktiveringen er at sætte krav til driften af BFA, såsom krav til driftstemperatur og holdetid. Denne kontrolmetode kræver kendskab til inaktivieringsforløbet under veldefinerede forhold og forudsætter høj grad af processtabilitet og styring.

Der foreligger på internationalt plan en række undersøgelser af virusinaktiveringen i slam og gylle (Berg & Berman, 1980; Deng and Cliver, 1982; Derbyshire et al., 1986; Lund et al., 1983; McKain & Hobson, 1987; Monteith et, 1986; Ward et al., 1976). De undersøgte virus er dels vigtige patogener, humane såvel som animale, samt potentielle indikatorvirus (bakteriofager, poliovirus og andre enterovirus, bovin parvovirus m.fl.). Undersøgelserne giver imidlertid ikke et sammenhængende billede, dels fordi undersøgelserne er svært sammenlignelige, idet der anvendes mange forskellige reaktormodeller, og der er mange variable faktorer, som ofte er mangelfuld beskrevet; dels fordi biomassen er et meget komplekst medium med mange

faktorer af ukendt betydning.

Den termiske aktivering betragtes af mange som primærfaktor ved virusinaktiveringen i biogasanlæg. Kun få andre faktorer i biomassen er undersøgt specifikt for en virusinaktiviterende effekt. I en schweizisk undersøgelse (Metzler, 1993) er påvist en væsentlig virucid effekt af lavmolekylære stoffer (penetrerer polycarbonatmembraner), og NH₃ og H₂S foreslås som værende de aktive forbindelser.

Ward et al. (1976) har fundet, at anaerob udrådning af biomassen forøger den virucide effekt (over for picornavirus) og tilskriver primært dette en stigning i koncentrationen af frit NH₃. Det er senere påvist, at ammoniak er en virucid faktor i slam, men kun i den frie form og derfor primært af betydning ved pH over 8 (Ward & Ashley, 1977). De har i denne forbindelse arbejdet med ammoniakkoncentrationer på 0,5 M (8,5 g NH₃ + NH₄⁺/l svarende til 0,42 g frit NH₃/l ved pH 8), hvilket er ca. 10 gange den koncentration, de har fundet i udrådnet gylle. Albrecht & Werkele (1983) angiver, at under kompostering af gylle kan denne betragtes som fri for virus, når der nås koncentrationer på 0,7 g frit NH₃/l. Dette er langt over, hvad der ses i velfungerende biogasreaktorer, men svarer til, hvad Ward & Ashley har fundet: at frit ammoniak har en væsentlig virucid effekt ved koncentrationer i størrelsesordenen 0,4 g/l (og højere). Det må bemærkes, at kompostering adskiller sig væsentligt fra den anaerobe proces bl.a. ved temperatur- og pH-stigning under processen.

Da ammonium virker hæmmende på biogasproduktionen i koncentrationer over 4 g N/l (Angelidaki & Ahring, 1993), søges det begrænset i anlæggene. Dette begrænser udnyttelsen af den virusinaktiviterende effekt af ammoniak under udrådningen. Et andet aspekt som begrænser udnyttelsen af ammoniak er, at følsomheden over for frit NH₃ varierer meget mellem virusfamilierne, reovirus er således langt mere resistent end picornavirus.

Foreløbig er varme/holdetid den eneste kendte kontrollerbare parameter af betydning for virusinaktiveringen. FS-metoden (måling af fæcale streptococcer), der er foreslået som kontrolparameter for inaktivering af patogene bakterier og parasitter (Bendixen, 1993), har vist sig egnet til overvågning af procesforløbet, men det vides ikke hvorvidt metoden kan anvendes direkte som indikator for virusinaktiveringen.

I tidlige undersøgelser vedrørende overlevelse/inaktivering af virus i biogasanlæg, er der udført modelforsøg, hvor virus er blandet i gylle henholdsvis næringsmedie i glaskolber og inkuberet under anaerobe forhold ved forskellige temperaturer (Bøtner, 1990). Herved er den samlede effekt på virus af hhv. temperatur/gylle og temperatur alene, målt som funktion af tiden.

De tidligere undersøgelser udført på Statens Veterinære Institut for Virusforskning (Bøtner, 1990) har givet betydelig information om inaktiveringen af en lang række patogene virus under de givne forsøgsbetegnelser og dermed bl.a. om indbyrdes forskelle mellem disse virus. En generel tendens er, at kappebærende virus inaktiveres hurtigere i gylle end virus uden kappe. Forskellen mellem inaktiveringshastigheden i et neutralt medium og i gylle (udtryk for den relative betydning af andre faktorer i forhold til varmeanaktivering) er generelt større for kappebærende virus end for virus uden kappe (tydeligt ved temperaturer $<50^{\circ}\text{C}$, dvs at for kappebærende virus har varmeanaktiveringen mindre betydning i forhold til andre faktorer i biomassen. De udarbejdede inaktiveringsskurver giver et godt grundlag for videre studier af en eventuel additiv effekt knyttet til den aktive mikrobiologiske omsætning i biogasanlæg.

I tidligere udførte forsøg er virusinaktiveringen undersøgt i gylle. Den aktive mikrobielle flora i kontinuert drevne biogasreaktorer vil især adskille sig fra tidligere forsøg ved: Biomassens sammensætning, tilledning af frisk biomasse og omrøring med deraf følgende udvikling af en stabil, specialiseret og aktiv mikroflora. Med henblik på at kunne inddrage en eventuel additiv effekt på inaktiveringen af virus i vurderingen af kriterier for drift af biogasanlæg, er der behov for at få udført nogle supplerende undersøgelser over inaktiveringssforløbet for nogle udvalgte virustyper i modelreaktorer, der fungerer som storskala biogasreaktorer.

I det foreliggende projekt er inaktiveringen af virus (bovint enterovirus og porcint parvovirus) blevet sammenholdt med inaktiveringen af FS. Virusaktiviteten kan derved vurderes ved sammenligning med FS-reduktioner i danske Biogasfællesanlæg ved forskellige betingelser (fx Bendixen, 1991, 1993 og 1994). En reduktion i antal fæcale streptococcer pr. gram biomasse på 3-4 log enheder svarer til en varme/tid påvirkning, der er i stand til at fjerne en række smitstoffer (fx Svinepestvirus og Salmonellabakterier) samt svække mange parasitters viabilitet (fx Ascaris). En vigtig del af forsøget består i øvrigt i at fastsætte inaktiveringssforløbet af udvalgte virustyper fx parvovirus for at afprøve dem som indikatororganismér i temperaturområdet 50-80°C.

PROJEKTBESKRIVELSE

Som modelvirus er valgt to virus uden kappe:

- A. Bovint enterovirus (BEV)
- B. Porcint parvovirus (PPV)

BEV hører til de relativt termoresistente picornavirus, en familie der rummer vigtige patogener som mund-og-klovsyge virus, Teschensyge virus og svine vesicular disease virus samt humane virus som echo-, coxsackie- og poliovirus; disse humane virus er almindeligt forekommende i spildevand (Lund et al., 1984).

PPV er meget termostabilt og har dermed den fordel at inaktiveringen kan følges over en længere periode. Det er dermed et velegnet virus til sammenlignende undersøgelser af den smitstofreducerende effekt ved høje temperaturer.

Der anvendes suspensioner af virus opformeret på cellekultur og opkoncentreret for at opnå en høj titer. Det var oprindeligt planlagt, at opformere svineinfluenzavirus, men det viste sig vanskeligt at opnå tilstrækkeligt stort volumen af højt titret suspension. Porcint parvovirus blev derefter opformeret og anvendt istedet, også fordi PPV er bedre egnet til undersøgelser ved 55°C og 70°C. I de mesofile reaktorforsøg er der derfor kun tilsat BEV.

Desuden gennemføres forsøgene med fæcale streptococcer for at undersøge den smitstofreducerende virkning på bakterier samt inaktivningsforløbet af denne indikatorbakterie i forhold til virus.

Kontinuerte reaktorforsøg

Forsøgene udføres i replica med:

- a) Mesofil (35°C) reaktor med gylle tilsat blegejord
- b) Termofil (55°C) reaktor med gylle tilsat blegejord
- c) Termofil reaktor (55/52°C) med gylle tilsat blegejord og 20% husholdningsaffald

Substratsammensætning som typisk anvendes på danske BFA.

Årsagen til at der i sidste forsøgsserie køres først ved 55° og derefter ved 52°C er, at flere termofile anlæg i dag kører ved 52°C på grund af frygt for ammoniakhæmning. Af budgetmæssige årsager er virus ikke medtaget i forsøgene ved 52°C, ligesom reaktorforsøgene ikke er udført i replica.

Gylle/biomasseblandinger i stabilt kørende reaktorer podes med virus. Der tilstræbes et virusvolumen på max. 1% af det pågældende substratmateriale. BEV-suspensionen tilsættes i forholdet 1:200. PPV-suspensionen tilsættes i forholdet 1:100.

Bakterierne tilsættes (såfremt de ikke allerede er til stede) i et mængdefor-

hold således, at et startkimal på ca 10^7 CFU ml⁻¹ tilstræbes. Bakterierne opformeres på PCA plader, der afvaskes i 4 ml fysiologisk saltvand, hvorefter en passende mængde overføres til forsøgsreaktorerne.

Prøverne udtages direkte fra reaktorerne med stigende tidsinterval. Under forsøgene køres med konstant omrøring i reaktoren.

Tidsintervaller for prøveudtagning er generelt (idet der er foretaget afvigelser herfra efter skøn):

$$T \text{ (time)} = 0,25 \ 0,5 \ 1 \ 1,5 \ 2 \ 4 \ 8 \ 16 \ 32 \text{ og } 48$$

Prøveudtagning til virustitreringer: 6 prøver á 2,7 ml prøvemateriale udtages og opblandes i 10% kold foetal kalveserum (FCS) i kryorør på alkoholbad. Prøverne overføres straks til -60°C fryser.

Der fremstilles endvidere en nul-prøve ved at udtage en prøve før tilsætning af virus. En del af prøven nedkøles til (20-27°C), tilsættes en forholdsmaessig mængde virus, blandes og nedfrysies straks, den anden del analyseres for indikatorbakterier. Afkølingsproceduren var oprindeligt planlagt med nedkøling til 5°C inden tilsætning af virus.

Den samlede forsøgsperiode er ca. 2 døgn. Forsøget repeteres efter ca. 1 uge.

Batchforsøg

Parallelt med reaktorforsøgene undersøges overlevelsen af virus og FS (10^7 CFU/ml) i fysiologisk saltvand. Dette forsøg udføres i lukkede koniske kolber med 500 ml fysiologisk saltvand under svag omrøring ved 35 og 55°C/± 0,5°C. Desuden undersøges overlevelsen ved hygiejnisering, 70°C i en time i fysiologisk saltvand, gylle tilsat blegejord og gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald. Procedurerne ved tilsætning af virus, bakterier samt udtagning af prøver svarer til det ovenfor beskrevne.

Ved forsøgene udtages prøver efter samme plan som reaktorforsøgene. Forsøgene udføres som dobbeltbestemmelse (2x500 ml).

MATERIALER OG METODER

Substrat

Svinegylle (antibiotikafrit) fra Svineforsøgsstationen Sjælland. Kvæggylle fra

Vegger Biogasanlæg og husholdningsaffald fra Helsingør Biogasanlæg.

For at sikre et homogent substrat og udtagning af homogene prøver behandles substratet på følgende måde: Substratet sies gennem groft net, for at frasortere strå m.m. Derefter blendes materialet og opbehandles under omrøring til mindre beholdere, der frysес ved -18°C indtil anvendelse.

Kulturer

Det bovine enterovirus (BEV) er en stamme isoleret på Lindholm fra en fæcesprøve. Serotypen er ikke bestemt. BEV blev opformeret på monolayer af kalvenyreceller i rulleflasker. Som vedligeholdelsesmedium anvendtes Eagles MEM suppleret med 1% føltalt kalveserum (FCS). Efter høst af virus blev større cellerester centrifugeret fra ved 900 g i 25 min. Virus i supernanten blev opkoncentreret ved PEG-fældning og resuspenderet i fysiologisk saltvand, så den endelige suspension blev 1/20 af oprindeligt volumen. Der fremstilles 4 batch med en virustiter på $10^{7.8}\text{--}10^{8.2}$ TCID/200 μl .

Det porcine parvovirus (PPV) er en vaccinestamme (nr. 893), og den anvendte suspension er udtaget fra vaccineproduktionen på Lindholm (SVTV). Virus var opformeret på monolayer af primære svinenyreceller i rulleflasker. Som vedligeholdelsesmedium anvendes et modiceret Hanks medium (ved anvendelse af 0,75 g/l bicarbonat, aminosyrer i form af koncentreret valleprotein-hydrolysat (5 g/l), samt vitaminer og antibiotika som for Eagles MEM). Råvirus gennemgik de indledende trin i oparbejdning af antigen: Efter ekstraktion af cellebundet virus og filtrering gennem Seiz Suprafiltre (Seiz filtertype EF 30/30 CW) blev $\frac{1}{2}$ l virussuspension udtaget. Suspensionsmediet indeholder 0,02 M glycin, pH 9. Virustiteren i suspensionen var $10^{7.7}$ TCID/50 μl .

I reaktorforsøgene er anvendt fæcale streptococcer isoleret fra det anvendte substrat. Dette er gjort, da den naturlige flora af fæcale streptococcer var lav og da der er risiko for at laboratoriestammer ikke opfører sig på samme måde som naturligt forekomne stammer i biomassen under de pågældende forhold. Der er således isoleret FS (tilhørende Lancefields gruppe D) fra hhv gylle og gylle tilsat husholdningsaffald.

Medier

Til virus:

Eagles minimum essential medium (Glasgow modification) tilsat dihydro-

streptomycin (0,10 g/l) og neomycin (0,05 g/l), her betegnet Eagles MEM.

Eagles MEM tilsat dihydrostreptomycin (1 g /l), penicillin (1 mill i.e./l), amphotericin B (10 mg/l), her betegnet Eagles med antibioticum.

Til bakterier:

Slanetz agar (Merck 5289) med opformering på Plate Count Agar (Difco 0479-01-1).

Mikrobiologiske analyser

Fra reaktorer og prøver med fysiologisk saltvand foretages analyser af fæcale streptococcer (Dansk Standard Metodik) og virustitreringer for hver prøveudtagning.

Bakterieanalyser. Udtagne prøver analyseres umiddelbart efter udtagning, alternativt nedkøles de til 5°C indtil undersøgelse. Indholdet af streptococcer i gyllen bestemmes ved overfladeudsæd på Slanetz agar (Merck 5289), inkubering ved 37°C i 48 timer og tælling af lyserøde til dybt røde kolonier eventuelt omgivet af en farveløs zone. Det ideale antal på plade er 15-150 CFU (se i øvrigt Dansk Standard, 1993).

Udspredes stressede bakterier - fx efter hygiejnisering ved 70°C - preinkuberes på Tryptic Soya Agar i 2 timer ved 37°C, hvorefter der påhældes et toplag af Slanetz agar og inkuberes 48 timer ved 37°C.

Virus analyser. For hvert reaktor- eller batchforsøg titreres samtlige prøver fra den pågældende forsøgskørsel parallelt.

Prøverne optøes ved stuetemperatur. 2 prøver for hvert prøveudtag pooler og centrifugeres 15 min ved 900 g og analyseres ved infektivitetstitreringer.

PPV: Der anvendes ca. 70% tætte monolayers af sekundære svinenyreceller i mikrotiterplader (NUNC, Microwell Plate, F96, Danmark). Der laves en 10-foldsfortynding i Eagles med antibioticum tilsat 10% FCS; der bruges 5 brønde pr. fortynding, 50 µl/brønd. Der suppleres med Eagles MEM med 10% FCS til i alt 150µl/brønd. Efter en adsorptionsperiode på 2½ time ved 37°C, vaskes cellekulturerne 1 gang med Eagles MEM og der tilsættes igen 150 µl/brønd Eagles MEM med 10% FCS. Pladerne dækkes og inkuberes 4-5 dg ved 37°C med atmosfærisk luft tilsat 5% CO₂. Kulturerne acetonefixeres og farves ved PLA-teknik under anvendelse af et peroxydasekonjugeret monoklonalt antistof (L-PPV-2, Lindholm). Resultaterne er angivet som titerværdier i TCID/50µl; målt på prøver af biomassen tilsat 10% FCS.

BEV: Der anvendes monolayer af primære kalvenyreceller i reagensglasrør med 1,8 ml Eagles MEM med 1% FCS. Der laves en 10-foldsfortyning i Eagles med antibioticum og 3% FCS. Hver fortyning podes på 5 rør, 200 μ l/rør. Rørene inkuberes ved 37°C under langsom rotation. Der undersøges dagligt for CPE i 3-5 dage. Virusanslaget konfirmeres ved PLA-farvning med et polyklonalt antiserum af CPE-positive og CPE-negative rør omkring omslagspunktet. Resultaterne er angivet som titerværdier i TCID/200 μ l, og er målt på prøver af biomassen tilsat 10% FCS.

Kemiske analyser

Gasmængde. Den daglige producerede gasmængde bestemmes ved fortrængning af surt vand efter opsamling i gastætte poser.

Methanindhold. Gasprøver analyseres en gang om ugen ved gaskromatografi med molekylarsi 5A og en kolonne med Chromosorb i serie. Bæregas N₂, Detektor TCD.

Svovlbrinteindholdet er målt med Drägerrør.

Indhold af flygtige fede syrer bestemmes en gang ugentligt. Prøvematerialet syrnes med oxalsyre, centrifugeres og filtreres gennem 0.45 μ filtre. Indholdet af flygtige fede syrer (eddikesyre, smørsyre, isosmørsyre, 2-methylsmørsyre, propionsyre og isovalerianesyre) måles gaskromatografisk på Shimadzu 8A gaschromatograf med SGE 25QC5/BP21 0,5 kolonne (Mikrolab. Århus) og FID detektor med N₂ som bæregas (25 ml/min). Injektortemperatur 180°C, ovntemperatur: start 85°C, temperaturstigning på 6°C/min, slut 180°C.

Ammoniak-indhold bestemmes ved alle forsøgene på hhv substratet og reaktorindholdet (under stabil biogasproduktion). Indhold af ammonium-kvælstof i gyllen bestemmes efter Kjeldahlmetoden.

Indholdet af tørstof (TS) og organisk stof (VS, Volatile Solids) i substratet er bestemt.

Opstart af biogasreaktorer

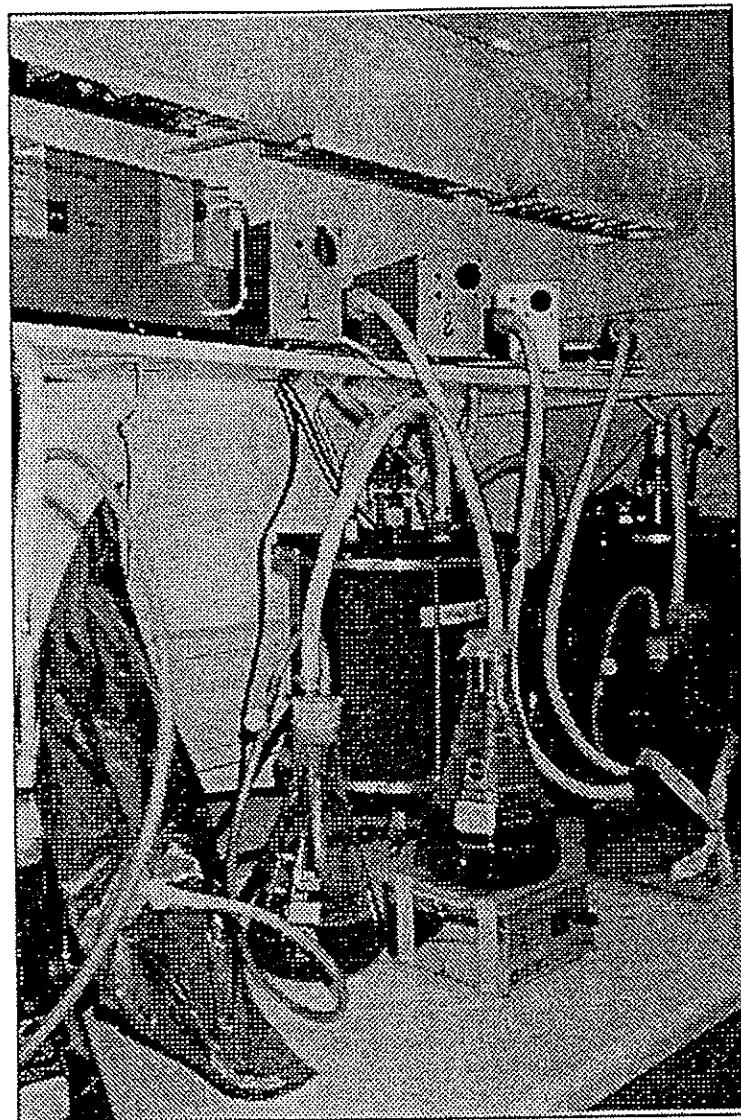
Forsøgene udføres i laboratoriereaktorer med 3 liters arbejdsvolumen. Som substrat anvendes hhv:

- * 75% kvæg- og 25% svinegylle, idet der tilsættes blegejord svarende til 5% af et VS indhold på 4%
- * ovennævnte gylleblanding tilsat 20 % husholdningsaffald svarende til et VS indhold på 4%.

Det kontrolleres, at ammoniumindholdet i den færdigblandede gylle ikke overstiger 3,5 g N/L, for at undgå ammoniumhæmning.

De gyllebaserede reaktorer køres først mesofilt, derefter termofilt og endelig afsluttes med termofilt udrådning af gylle tilsat husholdningsaffald. Reaktorerne køres ind til stabilitet (vurderet på methanproduktion og syreindhold) ved 15 dages (gennemsnitlig) opholdstid, idet der doseres gylle 4 gange i døgnet (altså en mindste garanteret tilbageholdelsestid på 6 timer). Under forsøgene doseres ikke nyt substrat i måleperioden, da nøjagtigheden på beregningerne af henfaldstiden ellers bliver ringe.

Forsøgsopstillingen er vist på figur 1 (næste side).



Figur 1. Foto af de kontinuerte reaktorer, der er anvendt i forsøgene. Fra højre ses omrørt fødekolbe, reaktor, afløbskolbe og gastæt pose til opsamling af den producerede gas. På hylden over reaktoren står pumper og styreboks.

RESULTATER

Reisolering

Bakterier:

I alle forsøgene ved 35°C var reisoleringsprocenten ca. 100 %, mens den ved 55°C var meget lav. Ved opgivelse af startkmidtallet er der derfor konsekvent benyttet beregnede værdier (baseret på indhold i inokulum og inokuleringsmængde).

Virus:

Beregnet initialkoncentration:

PPV er $10^{5.8}$ TCID/50 μ l

BEV $10^{5.5}$ - $10^{5.9}$ TCID/200 μ l (afhængig af batch).

Dektekjonsgrænsen ved titreringerne er $10^{0.7}$ TCID/50 μ l for PPV og $10^{0.7}$ TCID/200 μ l for BEV (dog $10^{-0.3}$ TCID/200 μ l for BEV i fysiologisk saltvand). Detektionsgrænserne er markeret på figurerne ved en vandret linie.

For PPV er fundet en reisoleringsprocent på ca 100% i nulprøverne.

Ved titrering for BEV af nulprøver fra batchforsøg med fysiologisk saltvand findes systematisk ca. 1,4 log-enhed lavere titer end den beregnede udgangskoncentration. Dette skyldes en systematisk påvirkning fra proceduren omkring forsøget (optønings- og afkølingsproceduren). Der må derfor regnes med en initial koncentration på $10^{4.1}$ - $10^{4.6}$ TCID/200 μ l (afhængig af batch). Sammenlignes nulprøverne fra fysiologisk saltvand med de tilsvarende nulprøver fra de mesofile reaktorer og batchforsøgene ved 70°C ses tilsvarende ca. 1,4 logenhed lavere titer end den beregnede; dette indikerer en reisoleringsprocent på ca. 100 %. Nulprøverne fra de termofile reaktorer har derimod systematisk en titer der er ca. 0,7 logaritmeenhed lavere end de tilsvarende prøver i fysiologisk saltvand (jvf. diskussionen).

Disse iagttagelser understøttes af de tidligere forsøg (Bøtner, 1990), hvor der blev anvendt samme isoleringsteknik og fundet en reisoleringsprocent på 100% for bl.a. Mund- og klovsyge og PPV. Ved undersøgelse af forekomsten af virusantigen i supernatant og bundfald, fandtes ingen tegn på at virusantigen opkoncentreredes i bundfaldet.

Inaktivieringsforløb

Data fra forsøg med inaktivering er vist på følgende figurer og tabeller:

Batch. Mesofilt i fysiologisk saltvand
Fig. 2A Fæcale streptococcer
Fig. 2B Bovint enterovirus

Batch. Termofilt i fysiologisk saltvand
Fig. 3A Fæcale streptococcer
Fig. 3B Bovint enterovirus
Fig. 3C Porcint parvovirus

Kontinuerte reaktorer. Mesofil udrådning af gylle tilsat blegejord.

- 4 Aa+b Fæcale streptococcer
- 4 Ba+b Bovint enterovirus

Kontinuerte reaktorer. Termofil udrådning af gylle tilsat blegejord.

- 5 Aa+b Fæcale streptococcer
- 5 Ba+b Bovint enterovirus
- 5 Ca+b Porcint parvovirus

Kontinuerte reaktorer. Termofil udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald.

- 6 Aa+b Fæcale streptococcer (55°C)
- 6 Ac Fæcale streptococcer (52°C)
- 6 Ba+b Bovint enterovirus (55°C)
- 6 Ca+b Porcint parvovirus (55°C)

Hygiejnisering

- Tabel 1A Fæcale streptococcer
- Tabel 1B Bovint enterovirus
- Tabel 1C Porcint parvovirus

Alle resultater er opsummeret i tabellerne:

- Batch. Fysiologisk saltvand
- 2A Fæcale streptococcer
- 2B Bovint enterovirus
- 2C Porcint parvovirus

- Kontinuerte reaktorer
- 3A Fæcale streptococcer
- 3B Bovint enterovirus
- 3C Porcint parvovirus
- 4 Kemiske parametre

Bakterier:

I alle forsøg med fæcale streptococcer ses en konstant decimering af bakterierne, uafhængig af om der er tale om et naturligt indhold eller tilsatte bakterier, ligesom forskellige startkimalt giver samme drabsrate. I de termofile batchforsøg (tabel 2A) og i de kontinuerte reaktorforsøg (tabel 3A) opnås pæne høje korrelationskoefficienter (gennemsnitligt 0,91). I de mesofile batchforsøg opnås en lav korrelationskoefficient ved lineær regression, men samtidig en meget lav inaktivering. Den anbefalede "mindste garanterede opholdstid" (MGRT), beregnet som den tid det tager at opnå en 4 log reduktion i kimaltallet, er derfor beregnet ved ekstrapolation i de tilfælde, hvor der ikke har været observationer over 4 decader.

Under mesofile forhold ses en drabsrate i fysiologisk saltvand på $0,005 \text{ t}^{-1}$ og i reaktorer baseret på gylle på $0,01 \text{ t}^{-1}$ (tabel 2A og 3A) svarende til 4 log reduktionstider på hhv 832 og 296 timer. Der er stor usikkerhed på bestemmelserne, men reduktionerne er uden praktisk betydning for hygiejniseringen af affaldet.

Under termofile forhold (55°C) ses en drabsrate i fysiologisk saltvand på $1,1 \text{ t}^{-1}$, i reaktorer baseret på gylle $3,7 \text{ t}^{-1}$ og i reaktorer baseret på gylle tilsat husholdningsaffald $2,1 \text{ t}^{-1}$ (tabel 2A og 3A) svarende til 4 log reduktioner på hhv 3,8, 1,1 og 2,1 time.

Virus:

Reaktorforsøg:

I de tilfælde hvor virusinaktiveringen i biomasse kan følges over i et længere forløb ses at inaktiveringen sker hurtigst initialt med stigende decimeringstid (PPV ved 55°C (figur 5C og 6C) og som en tendens for BEV ved 35°C (figur 4B)); nogle viruspartikler synes således at være mere resistente end andre, hvad enten det skyldes en egenskab ved viruspartiklerne eller er udtryk for forskellig grad af påvirkning (beskyttelse) fra substrat.

Kurverne synes at beskrive en bifasisk inaktivering, hvilket er årsagen til, at der i forsøgene ved termofile temperaturer er beregnet 2 drabsrater for PPV-en initial (0-4 timer) og en "terminal" (4-48 timer). Endvidere er der beregnet reduktionstider for 4 log enheders reduktion ved ekstrapolation både for den initiale og den "terminale" reduktion. Korrelationskoefficienterne for den initiale reduktion er lave for nogle af kurverne men generelt høje for den sene reduktion. Dette afspejles i den noget store spredning i 4 log-reduktionstider for den initiale fase.

For nogle grafer ville valget af et andet skillepunkt mellem de 2 faser (f.eks.

8 timer) synes mere oplagt og i nogle tilfælde give en højere korrelationskoefficient. Det må dog understreges, at omend inaktivieringsforløbet synes bifasisk, er der tale om et "blødt" kurveforløb. Valget af skillepunkt vil derfor i alle tilfælde træffes ud fra en subjektiv vurdering; ydermere er der en vis usikkerhed ved bestemmelsen af de enkelte punkter. Det er derfor valgt at skelne ved et fast punkt (4 timer) for alle graferne.

Fænomenet med den hurtige inaktivierung initialt optræder muligvis også i forsøgene med BEV ved 55°C, men skjult af detektionsgrænsen som følge af en lav udgangskoncentration. Ekstrapolation udfra de opnåede resultater til beregning af 4 log-reduktionstider må derfor tolkes med stor forsigtighed.

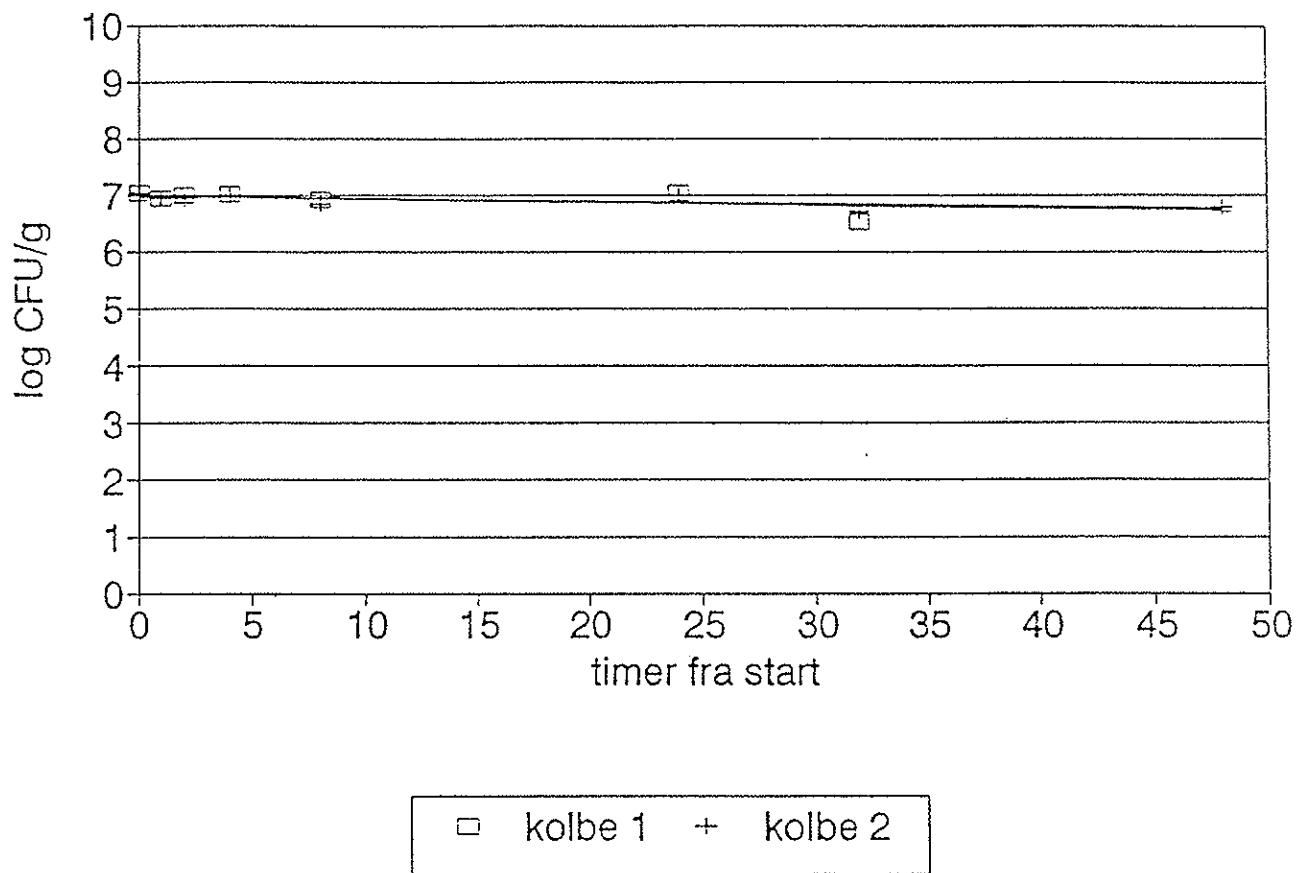
Batchforsøg med fysiologisk saltvand:

I de mesofile batchforsøg med fysiologisk saltvand opnås for BEV som for fæcale streptococcer en lav korrelationskoefficient ved lineær regression og en meget lav inaktivieringshastighed.

I de termofile batchforsøg med fysiologisk saltvand fås meget høje korrelationskoefficienterne (0,82 - 0,97) ved linær regression, omend der er en tendens til en hurtigere reduktion initialt.

BATCHFORSØG

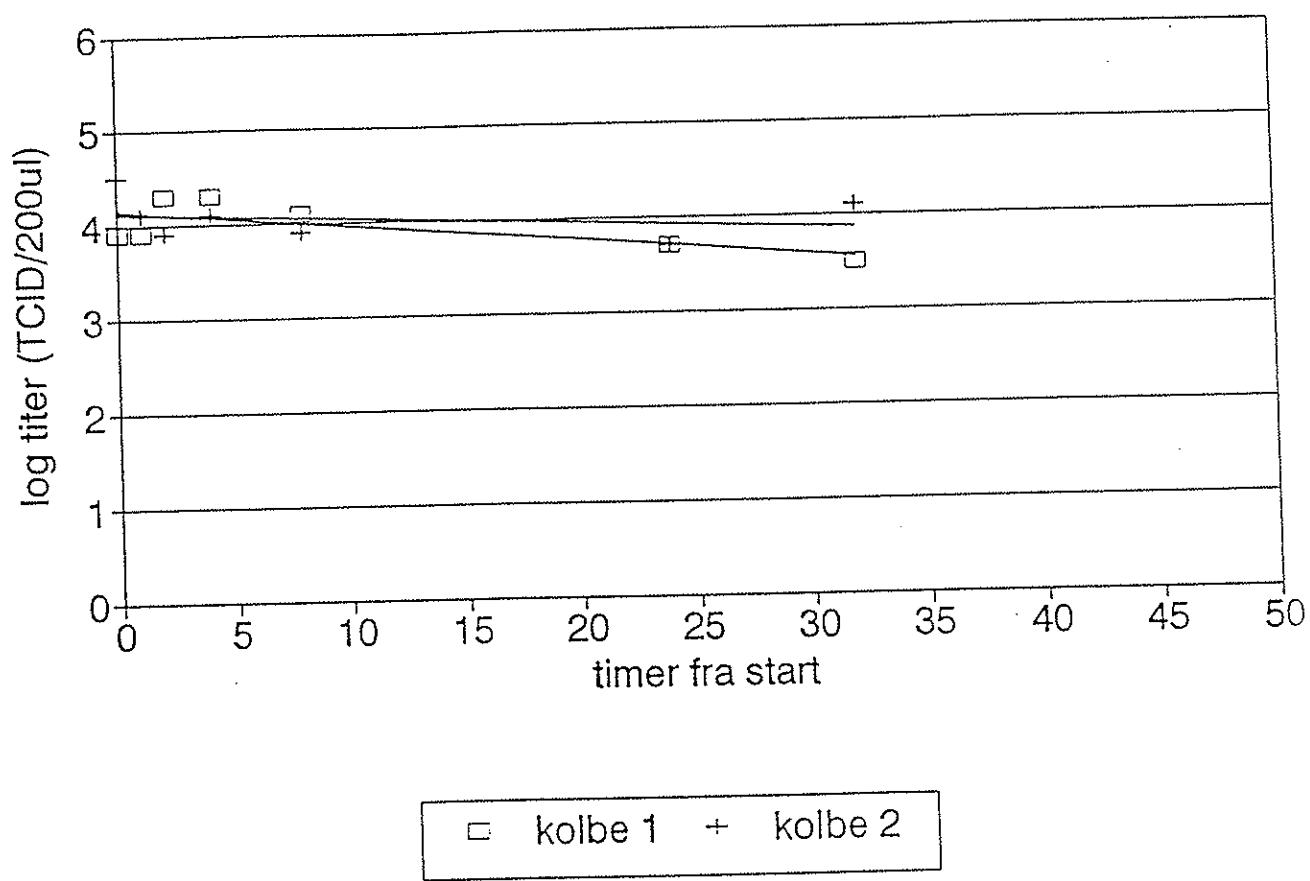
Mesofilt i (35°C) fysiologisk saltvand



Figur 2A. Henfald af fæcale streptococcer.

FS kimtal ved forsøg i 1 liter fysiologisk saltvand podet med ca. 10^8 CFU FS/g. Korrelationskoeficienterne ved lineær regression er 0,32 og 0,521. dvs. en lineær sammenhæng kan ikke påvises. Henfaldraten er hhv 0,005 og 0,004 t^{-1} . Ved ekstrapolation af henfaldkurverne (som dog beskriver henfaldet dårligt) fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 756 og 907 timer.

Mesofilt (35°C) i fysiologisk saltvand

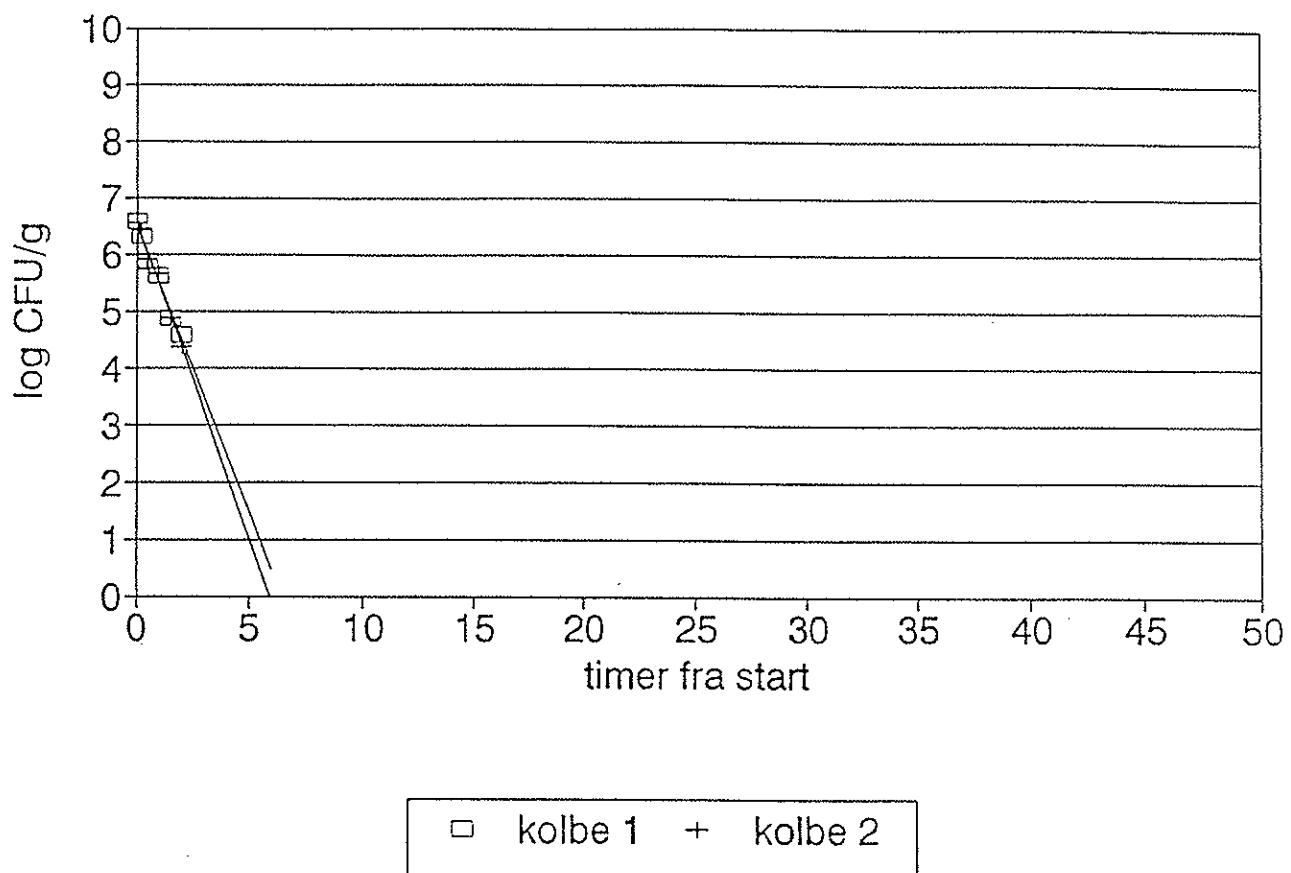


Figur 2 B: Henfald af bovint enterovirus.

Infektiøs titer i 1 liter fysiologisk saltvand podet med $10^{5,7}$ TCID/200 μ l. Korrelationskoefficienterne ved lineær regression er 0,60 og 0,16, dvs en linær sammenhæng kan ikke påvises.

Antages der at være en linær sammenhæng, fås for 1. kørsel en henfaldsrate på $0,005 \text{ t}^{-1}$. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 219 timer.

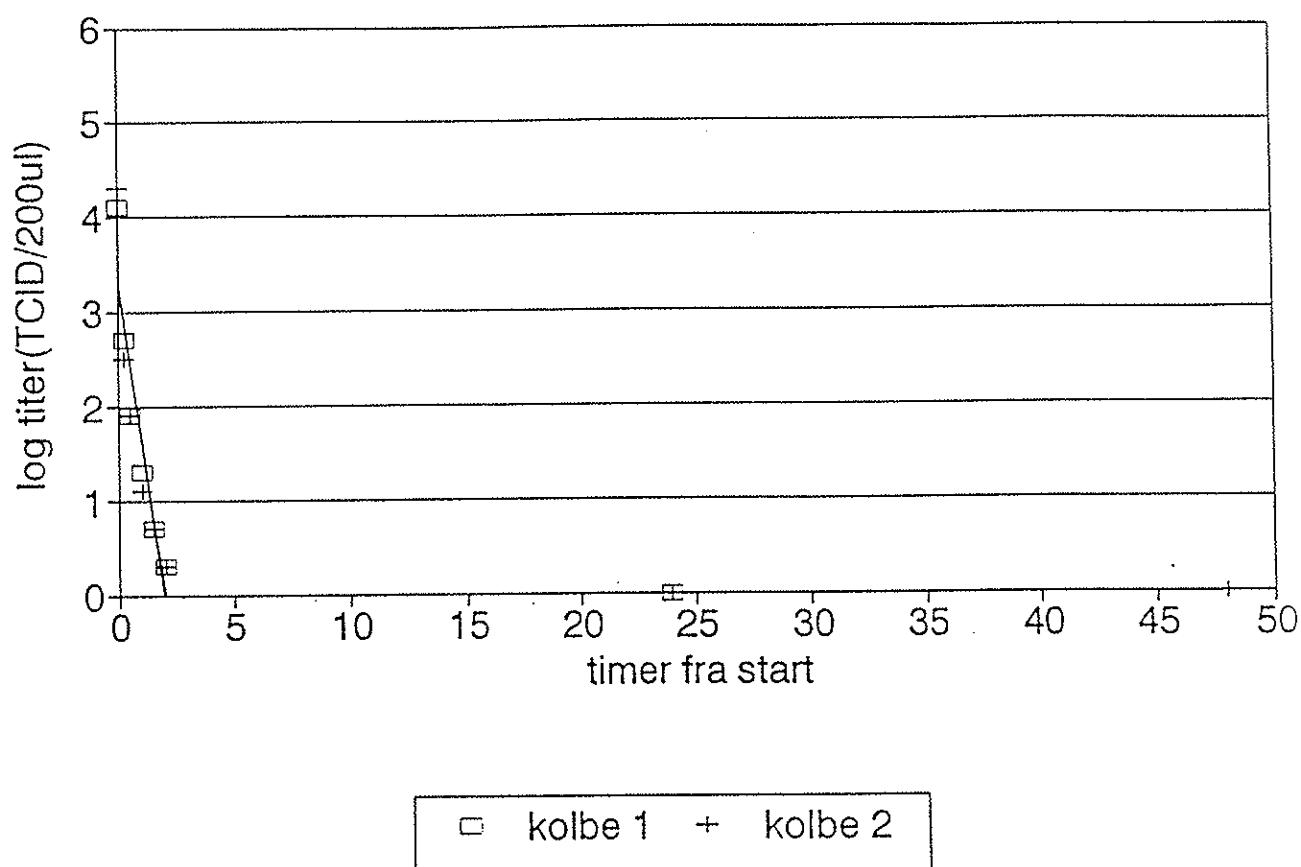
Termofilt (55°C) i fysiologisk saltvand



Figur 3 A: Henfald af fæcale streptococcer.

Korrrelationskoeficienterne ved lineær regression er 0,98. Henfaldraten er hhv 1,0 og 1,1 t^{-1} . Ved ekstrapolation af henfaldskurves fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 3,6-4,0 timer.

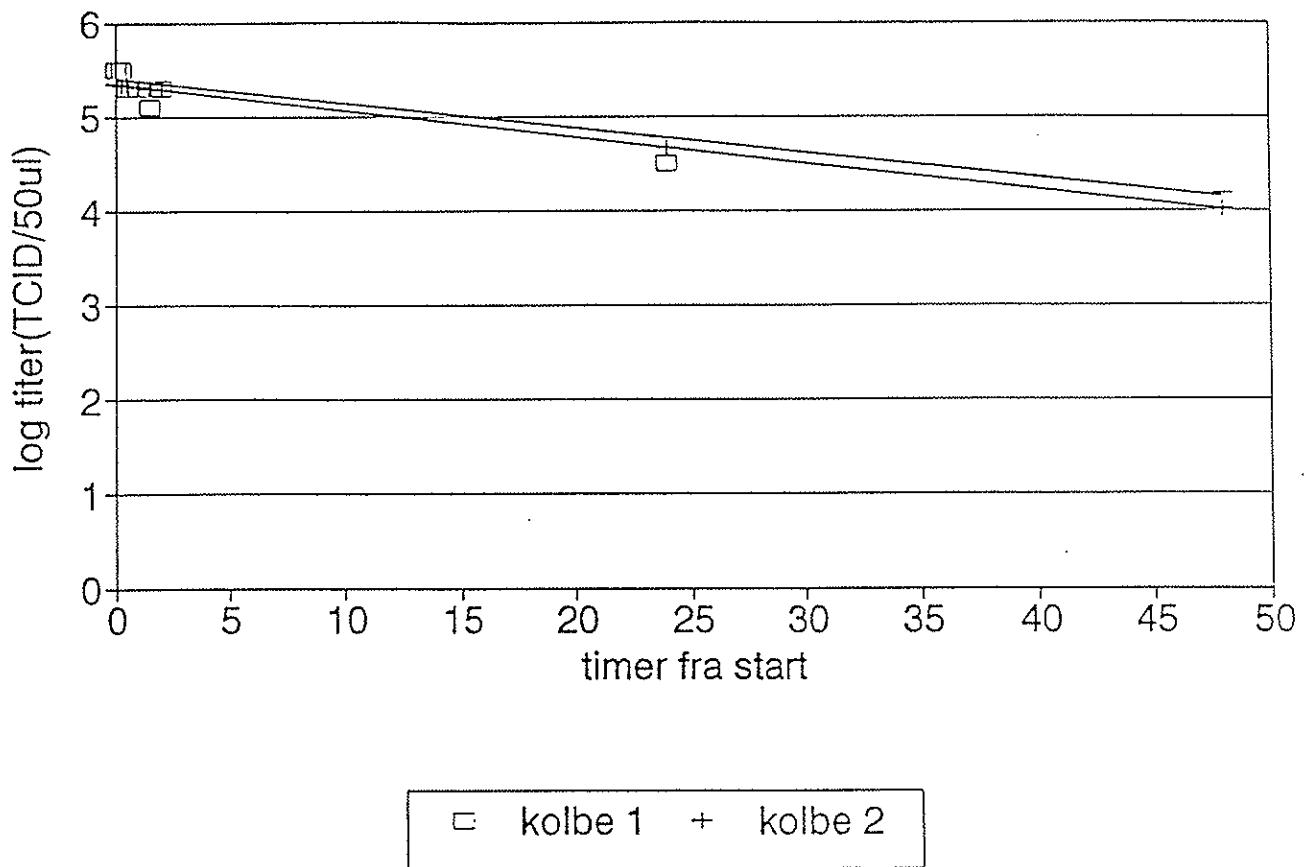
Termofilt (55°C) i fysiologisk saltvand



Figur 3 B: Henfald af bovint enterovirus.

Korrelationskoeficienterne ved lineær regression er 0,88 hhv 0,83. Henfaldraten er hhv $1,70$ og $1,72 \text{ t}^{-1}$. Ved ekstrapolation af henfaldkurverne fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 2,3 timer.

Termofilt (55°C) i fysiologisk saltvand

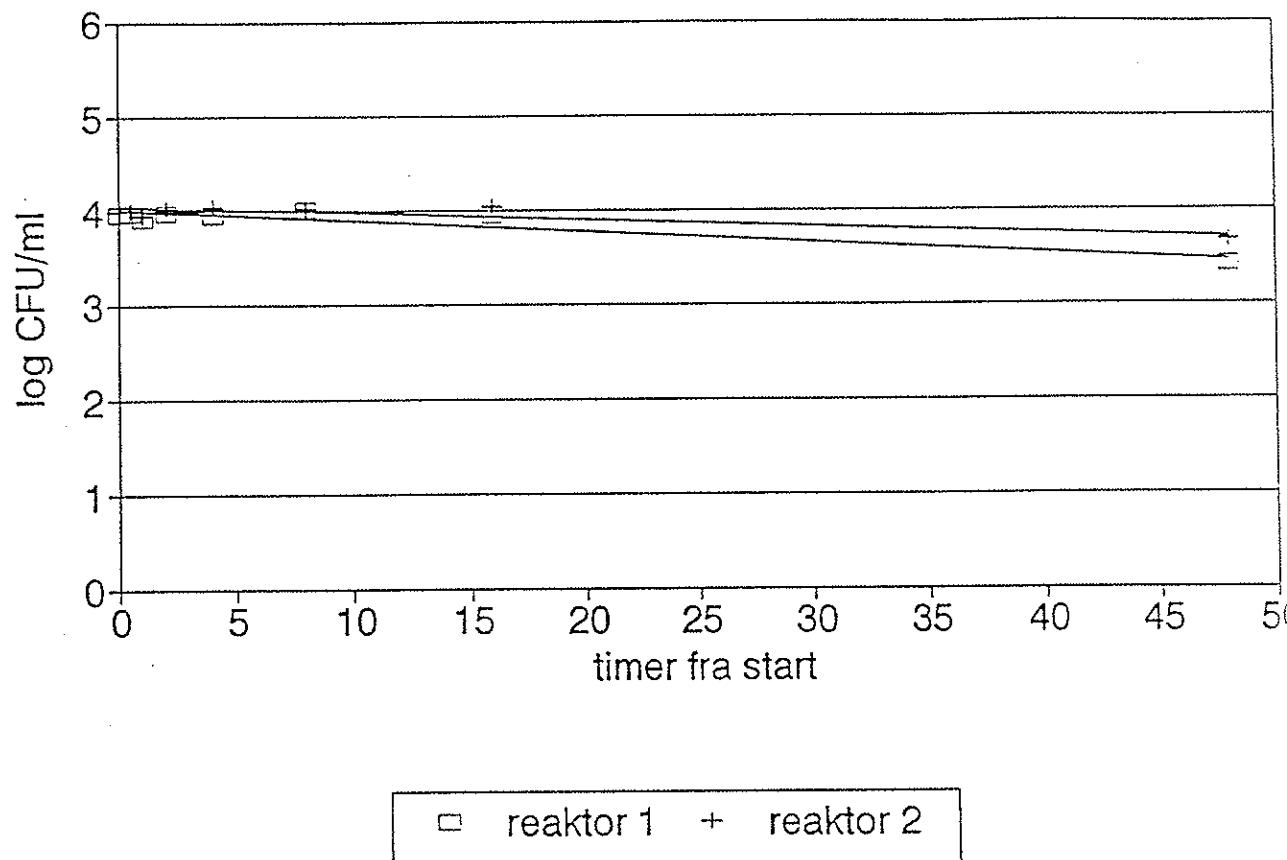


Figur 3 C: Henfald af porcint parvovirus.

Korrelationskoeficienterne ved lineær regression er hhv 0,93 og 0,88. Henfaldsraten er $0,03 \text{ t}^{-1}$. Ved ekstrapolation af henfaldskurves fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 148 timer.

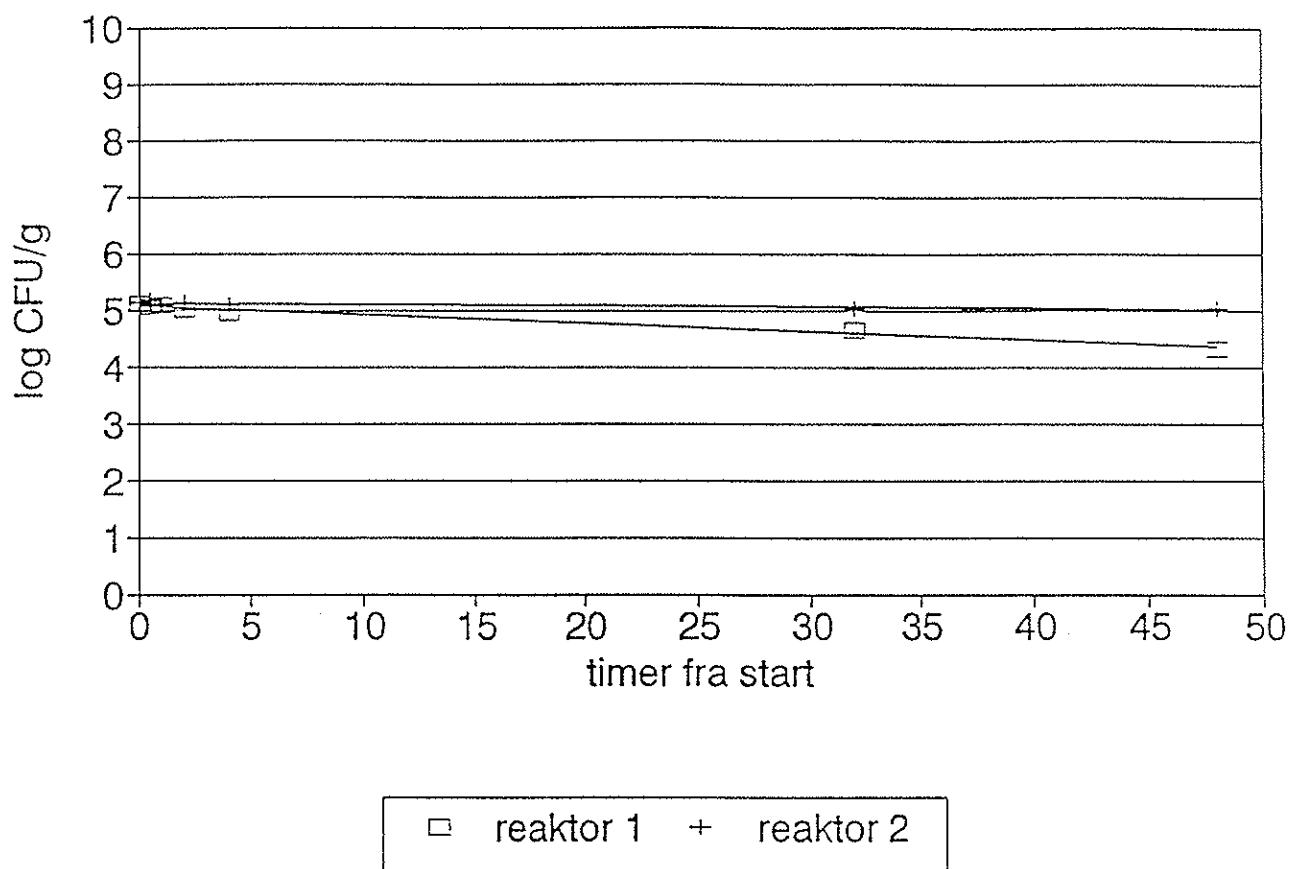
KONTINUERTE REAKTORER

Mesofil (35°C) udrådning af gylle tilsat blegejord



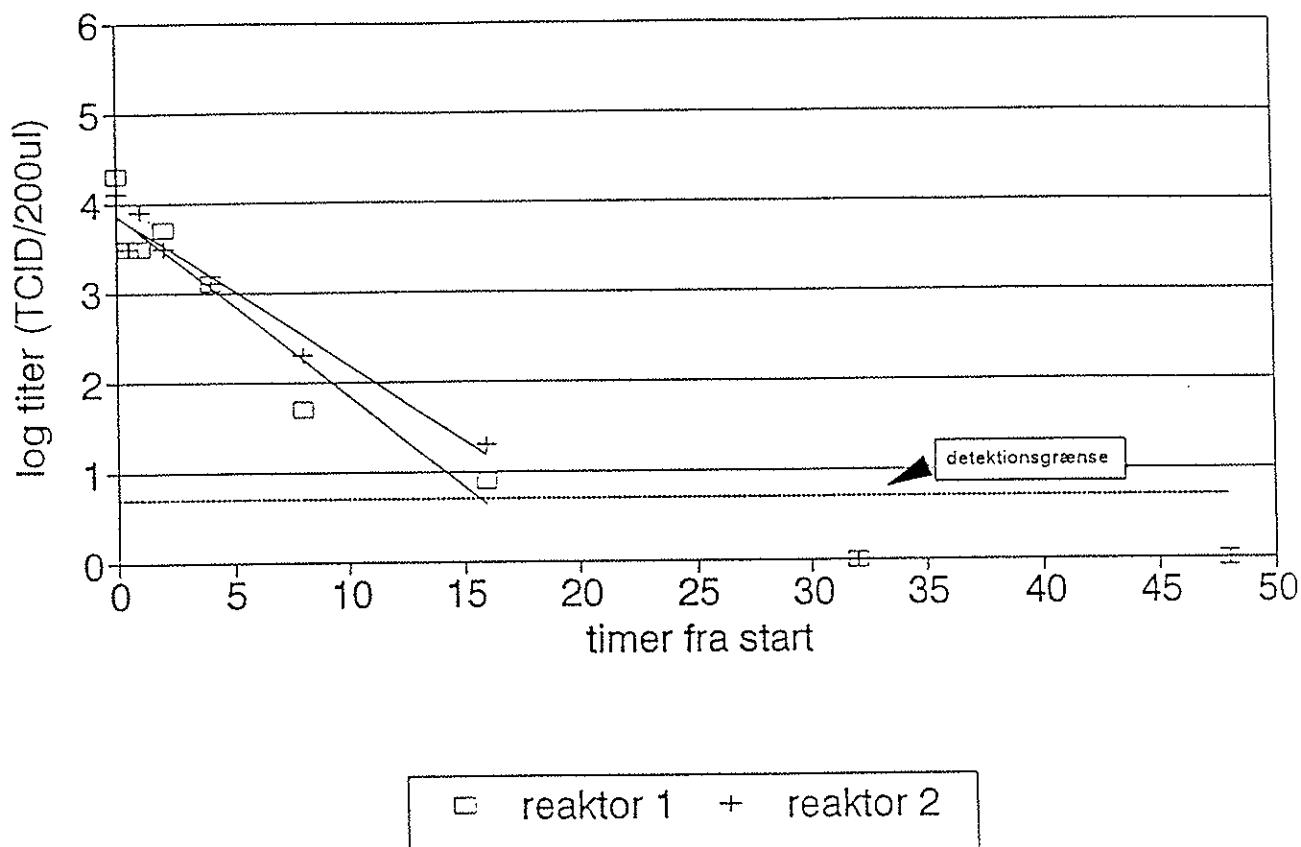
Figur 4 Aa: Henfald af naturligt indhold af *Str. facalis* - 1. kørsel. Korrelationskoeficienterne ved lineær regression er hhv 0,87 og 0,81. Ved ekstrapolation af henfaldskurves fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 351 - 563 timer.

Mesofil (35°C) udrådning af gylle tilsat blegejord



Figur 4 Ab. Henfald af tilsatte *Str. facalis* - 2 kørsel. Korrelationskoefficienterne ved lineær regression er hhv 0,98 og 0,72. Ved ekstrapolation af henfaldskurves fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 269 timer (for reaktor 2 med den dårlige korrelationskoefficient 1754 timer).

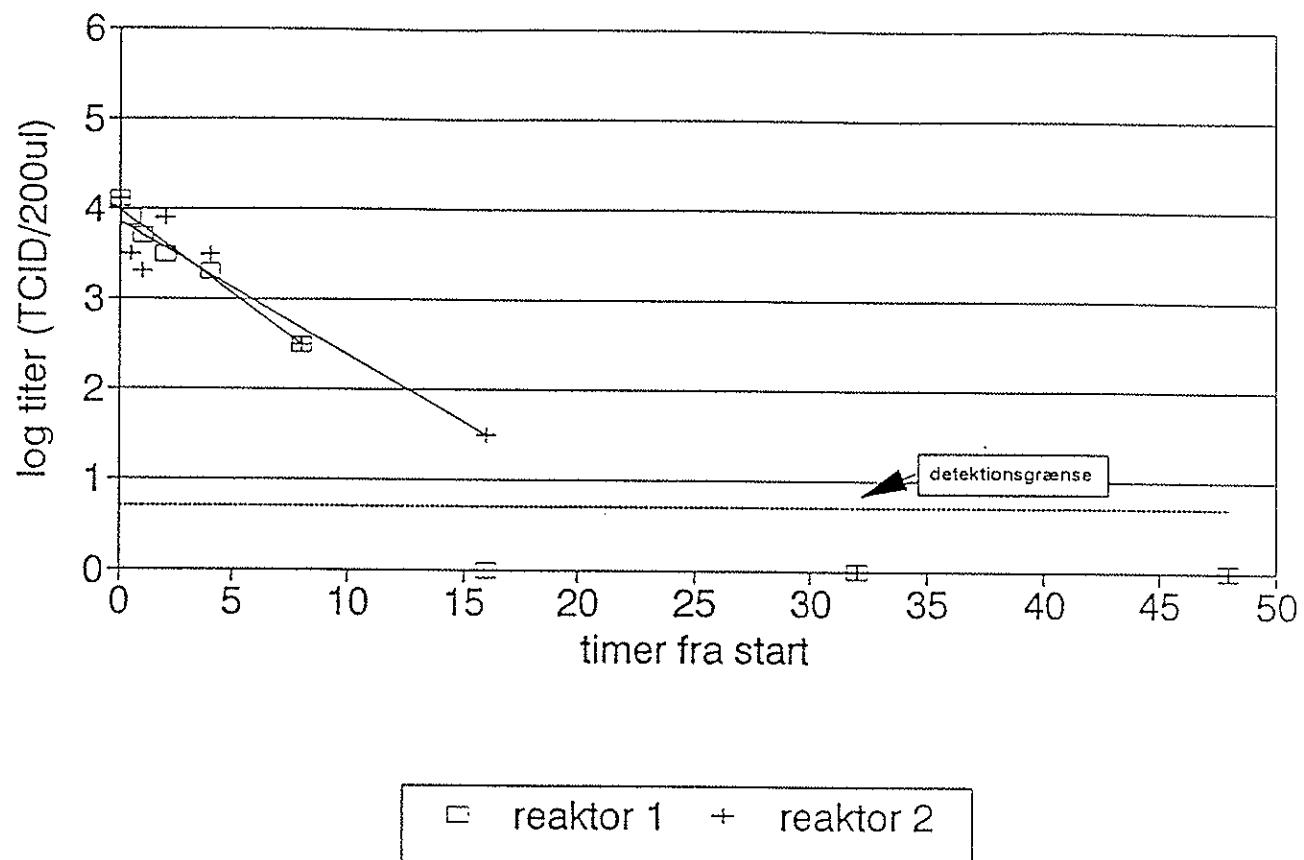
Mesofil (35°C) udrådning af gylle tilsat blegejord



Figur 4 Ba: Henfald af bovint enterovirus - 1. Kørsel

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression er hhv 0,92 og 0,96. Ved ekstrapolation af henfalderkurverne fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 20-24 timer.

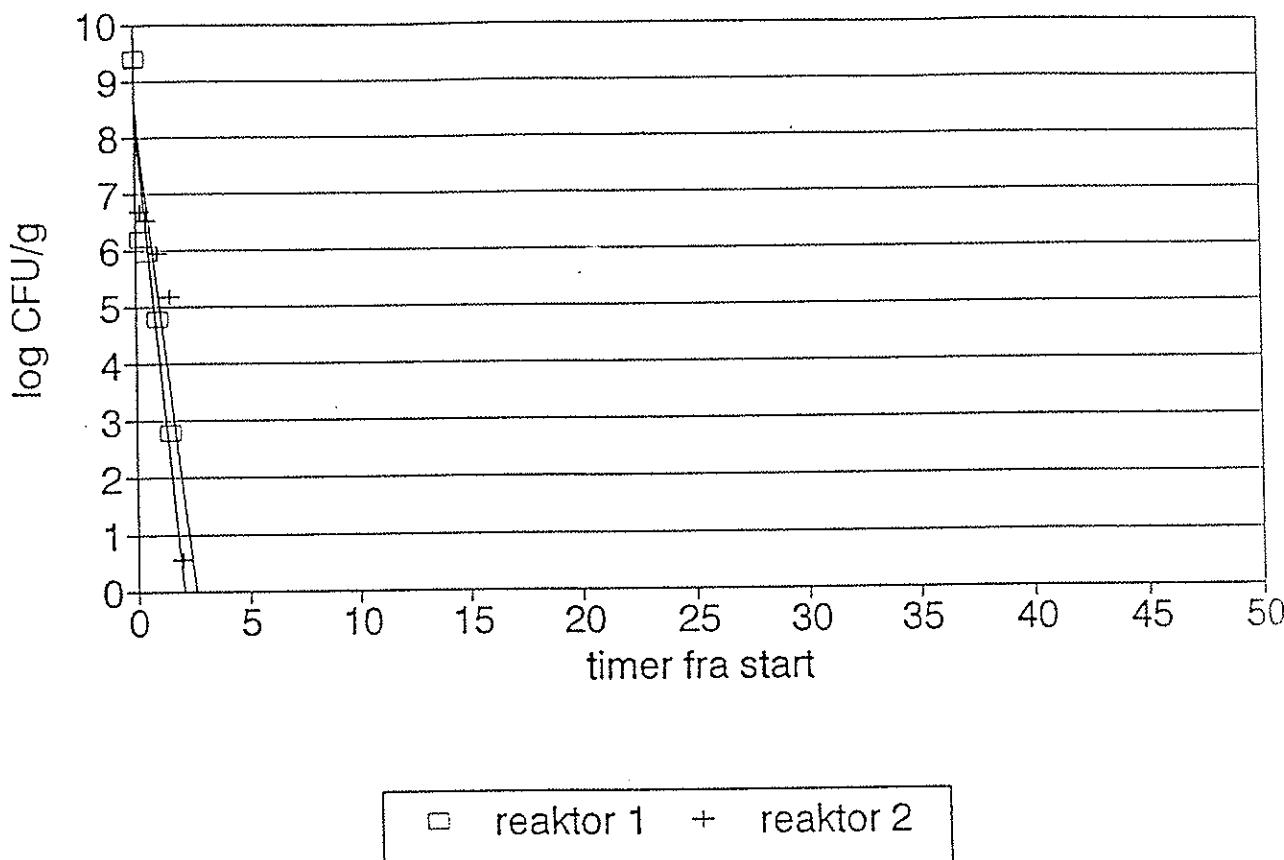
Mesofil (35°C) udrådning af gylle tilsat blegejord



Figur 4 Bb. Henfald af bovint enterovirus - 2. Kørsel

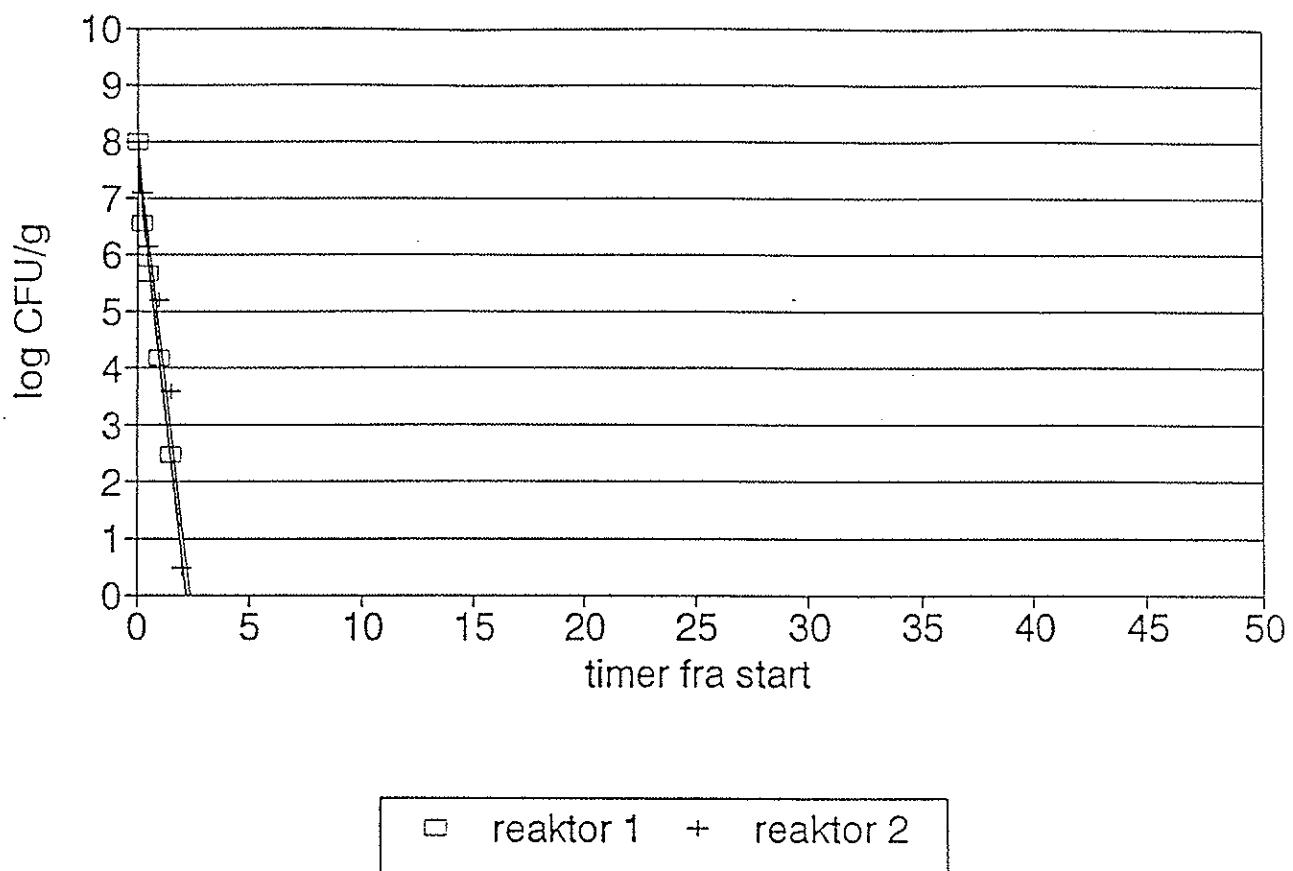
Korrelationskoeficienterne ved lineær regression er hhv 0,98 og 0,90. Ved ekstrapolation af henfaldskurverne fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 22-27 timer.

Termofil (55°) udrådning af gylle tilsat blegejord



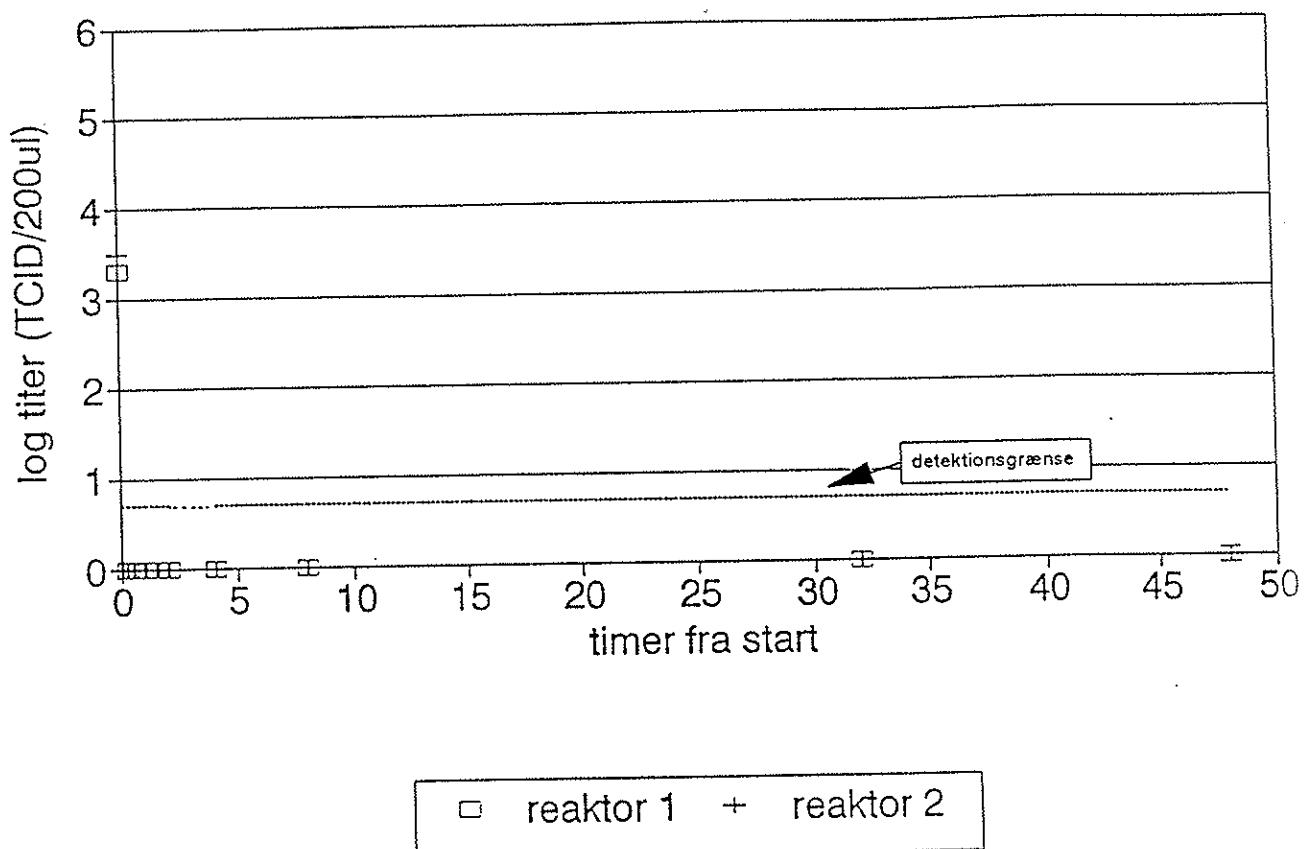
Figur 5 Aa. Henfald af tilsatte *Str. facalis* - 1 kørsel. Korrelationskoefficienterne ved lineær regression er hhv 0,94 og 0,84. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 1,0 - 1,2 timer.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord



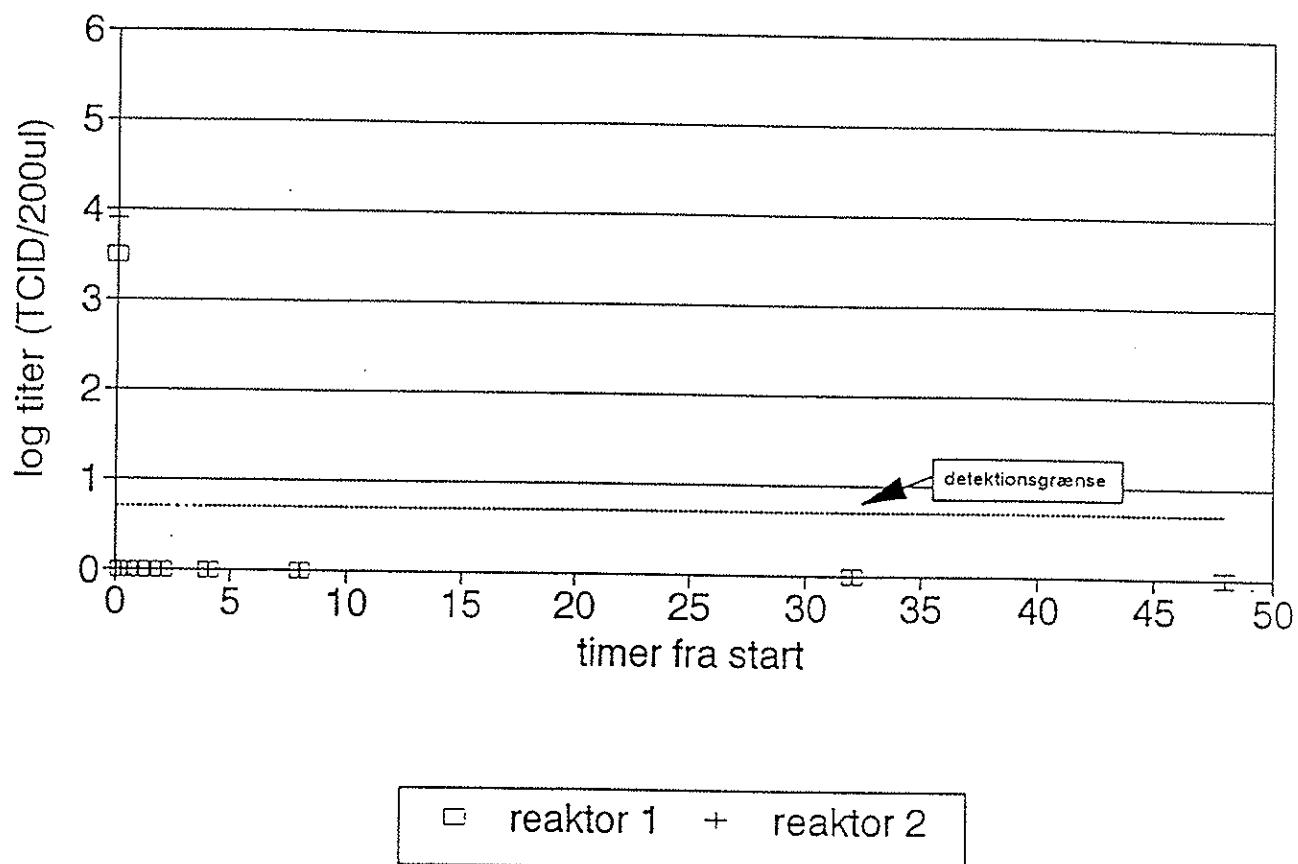
Figur 5 Ab. Henfald af tilsatte *Str. facalis* - 2. kørsel. Korrelationskoefficienterne ved lineær regression er hhv 0,99 og 0,96. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 1,1 - 1,2 timer.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord



Figur 5 Ba. Bovint enterovirus - 1. Kørsel.
Drabsraten er $> 11 \text{ t}^{-1}$.

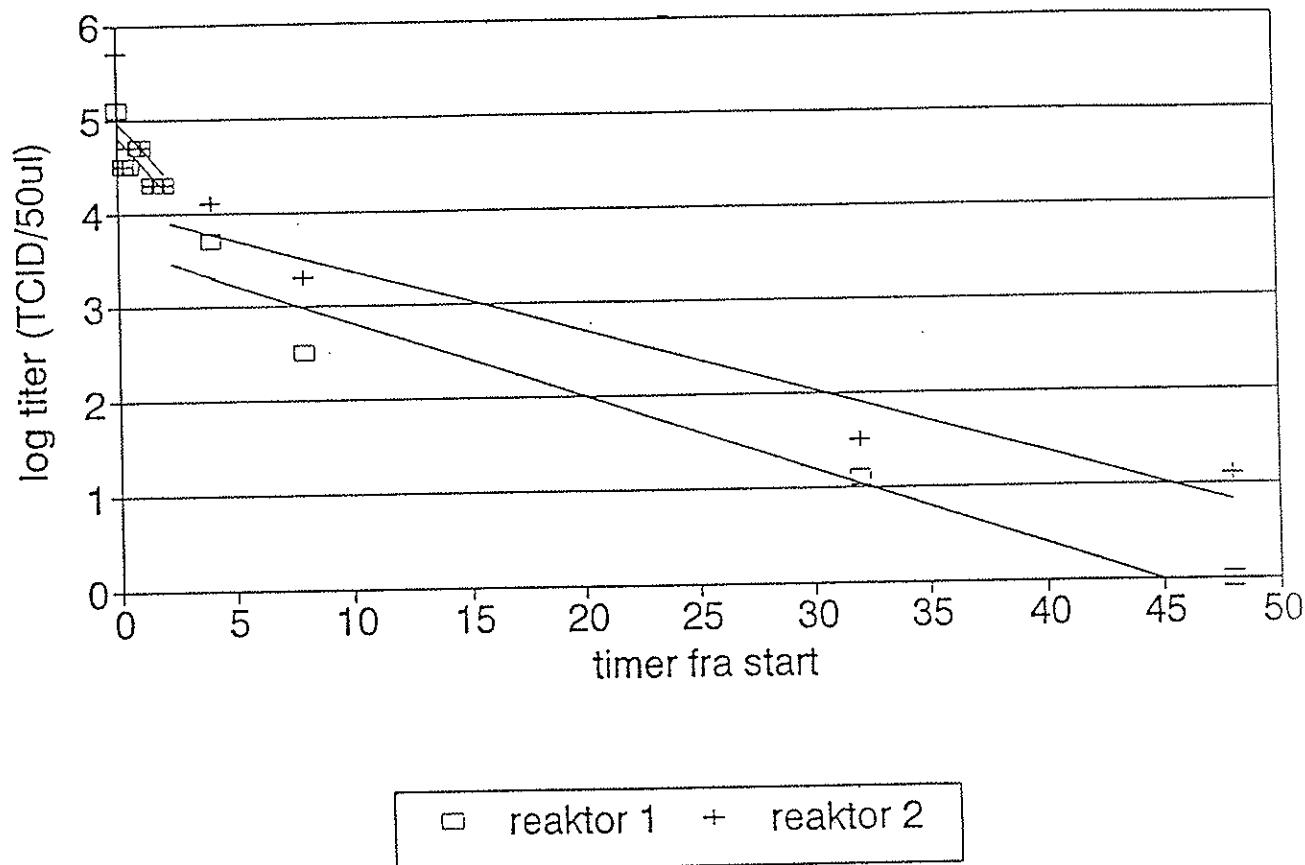
Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord



Figur 5 Bb. Bovint enterovirus - 2. kørsel.
Drabsraten er $> 11 \text{ t}^{-1}$ hhv $> 13 \text{ t}^{-1}$.

Figur 5 Ba+b: Den lave udgangskoncentration og høje drabsrate medfører at der kun er 2 punkter på hver graf. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på $< 0,5$ time, men resultatet må tolkes med forbehold, jvf. diskussionen.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord

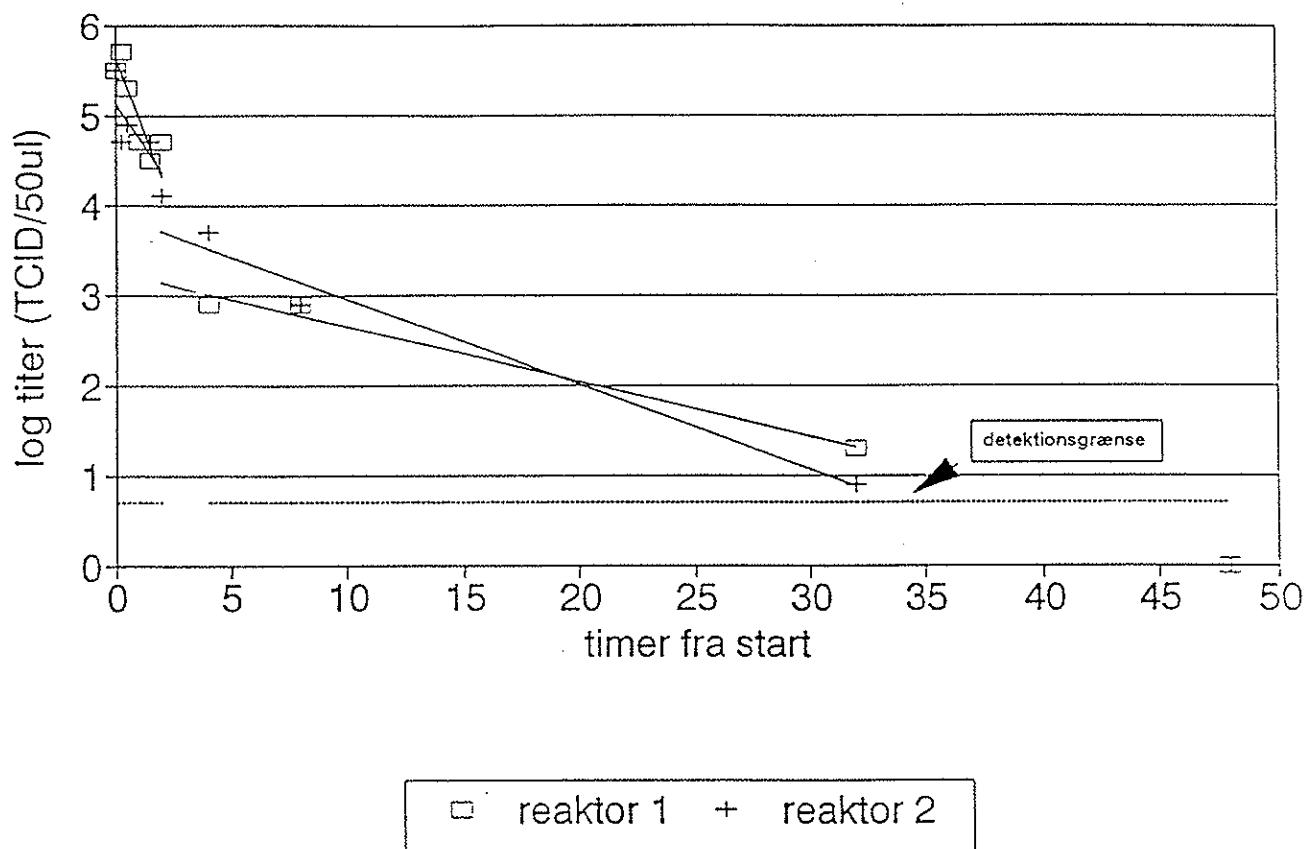


Figur 5 Ca: Porcint parvovirus - 1. Kørsel

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den initiale reduktion (0-4 timer) er hhv 0,81 og 0,49. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 14,3 og 14,8 timer.

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den senere reduktion (4-48 timer) er hhv 0,88 og 0,94. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 50 og 60 timer.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord

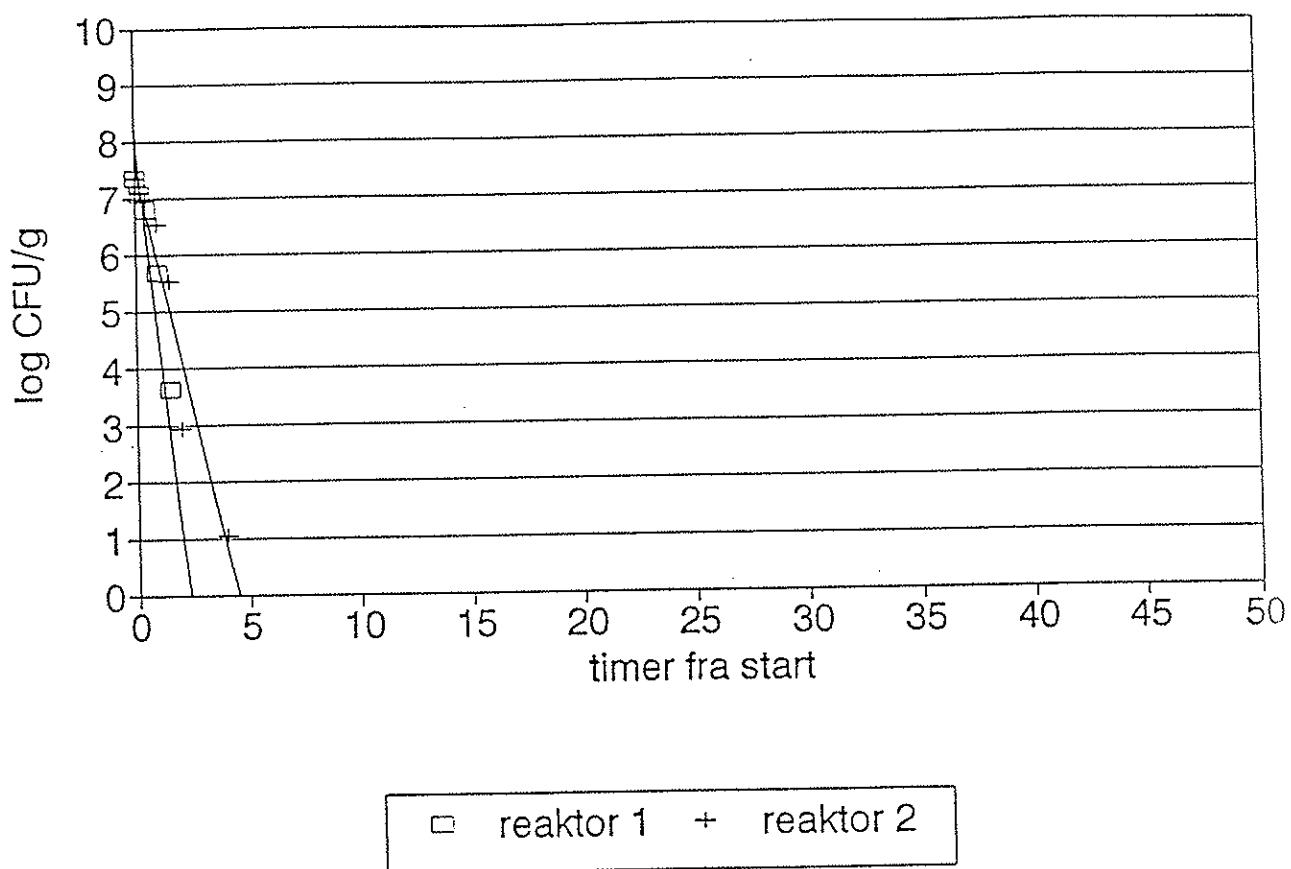


Figur 5 Cb: Porcint parvovirus - 2. Kørsel

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den initiale reduktion (0-4 timer) er hhv 0,94 og 0,82. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 6,1 og 10,5 timer.

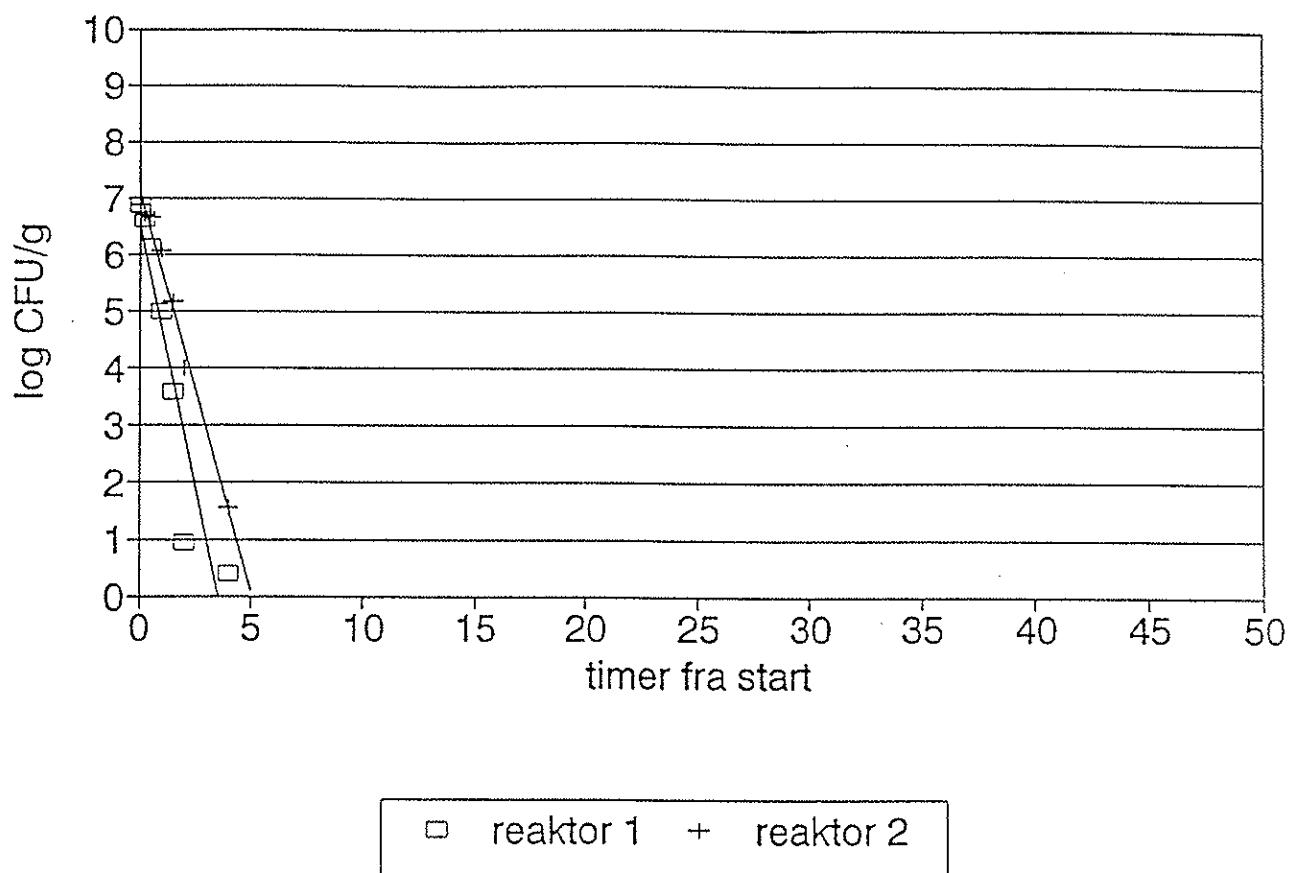
Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den senere reduktion (4-48 timer) er hhv 0,98 og 0,98. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 66 og 42 timer.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald



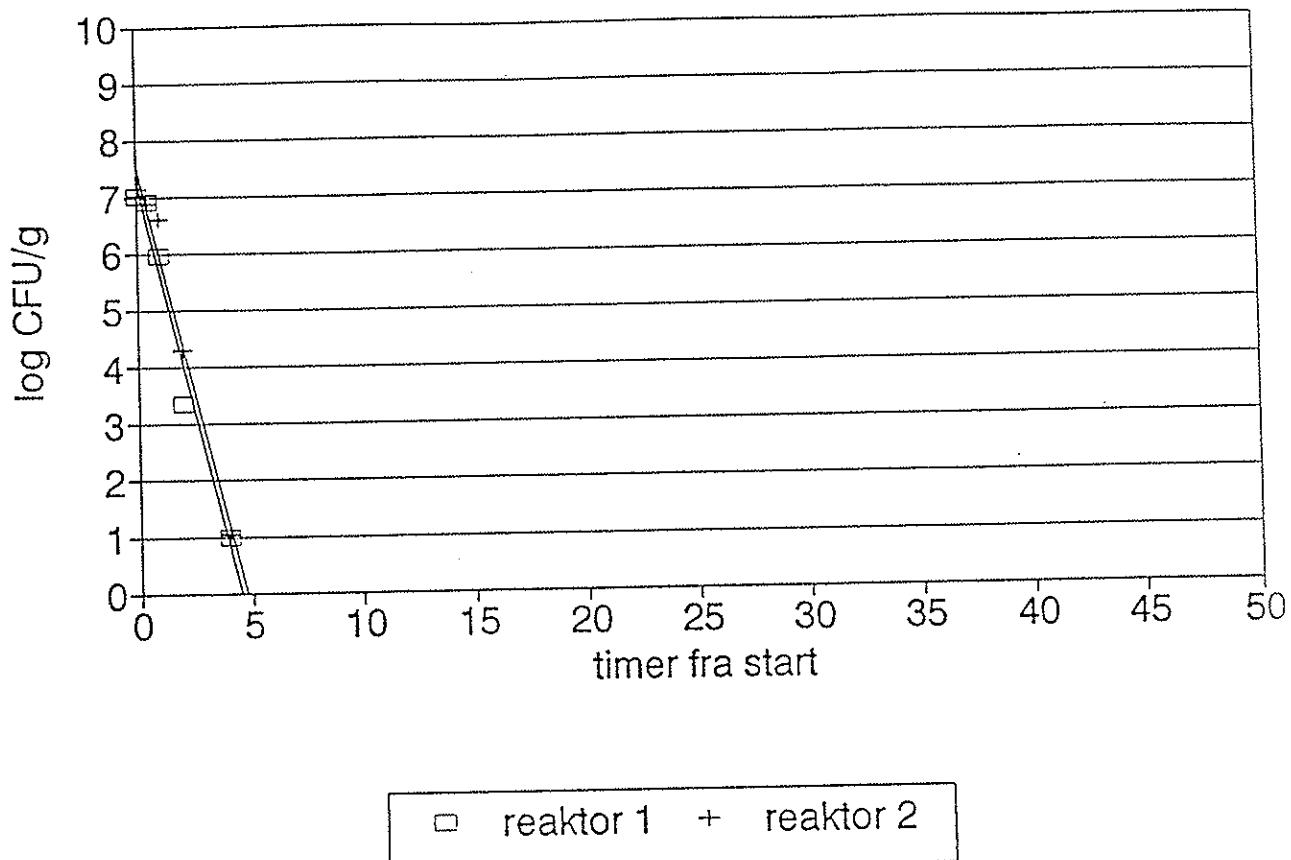
Figur 6 Aa. Henfald af tilsatte *Str. facalis* - 1. kørsel. Korrelationskoefficienterne ved lineær regression er hhv 0,90 og 0,93. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 1,1 - 2,3 timer.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald



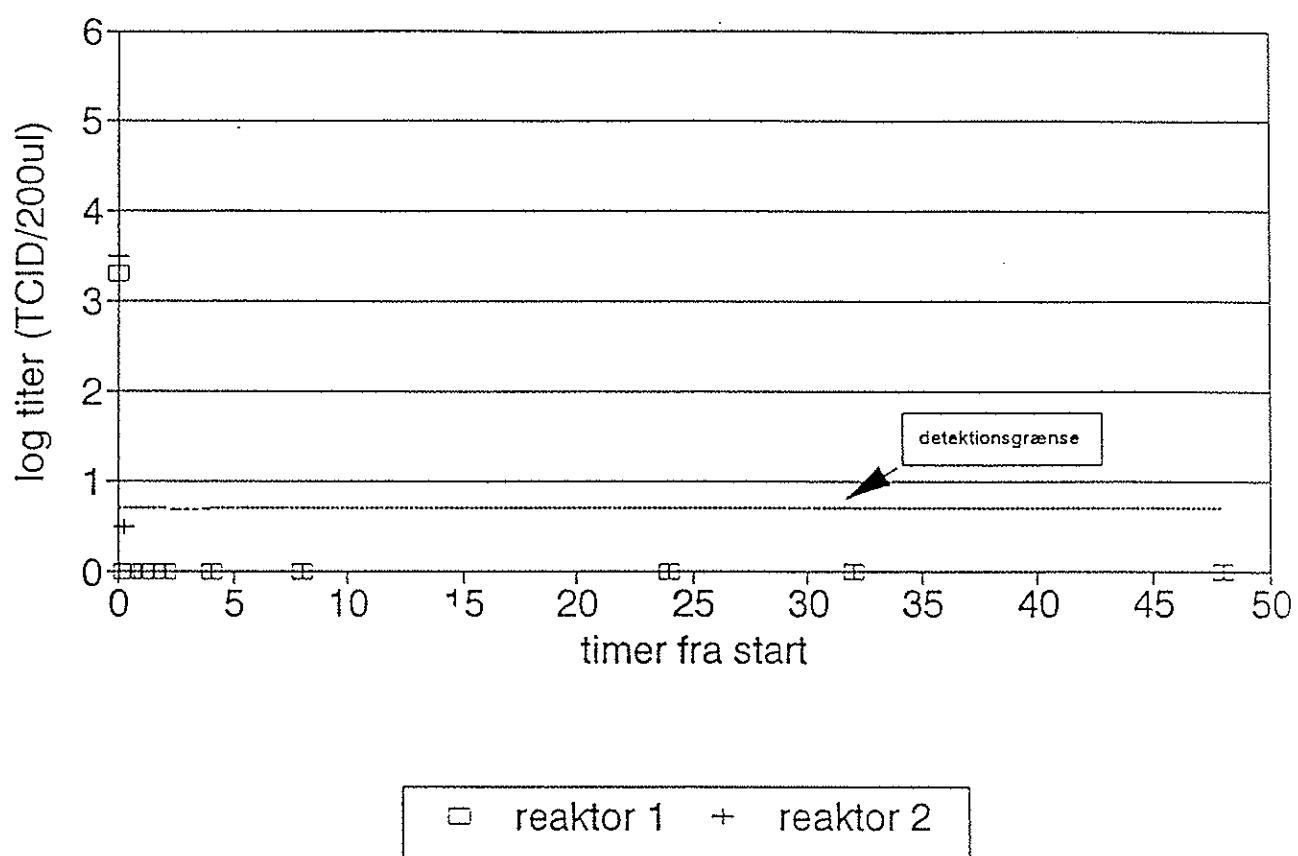
Figur 6 Ab. Henfald af tilsatte *Str. facalis* - 2.kørsel. Korrelationskoefficiente ved lineær regression er hhv 0,86 og 0,98. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 2,2 - 2,8 timer. NB: temperaturen checket ekstra gang - der var ingen forskel mellem reaktorerne (til forklaring af systematisk forskel mellem reaktor 1 og 2).

Termofil (52°C) udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald



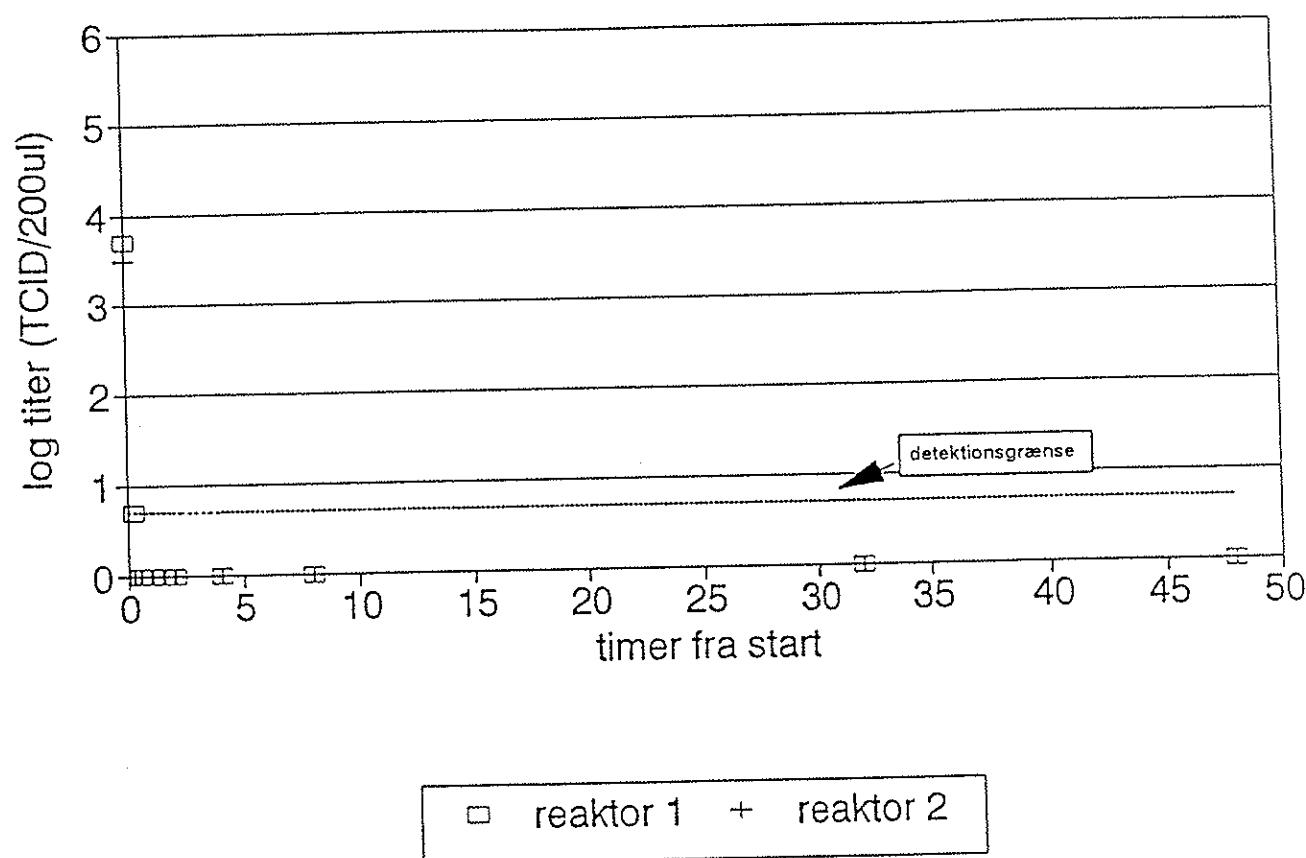
Figur 6 Ac. Henfald af *Str. facalis* i reaktorer kørt ved 52°C. Korrelationskoefficienterne ved lineær regression er 0,97. Henfaldsraten er $1,6 \text{ h}^{-1}$. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på 2,5 timer.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald



Figur 6 Ba. Bovint enterovirus - 1. Kørsel
Drabsraten er $>10 \text{ t}^{-1}$ hhv 12 t^{-1} .

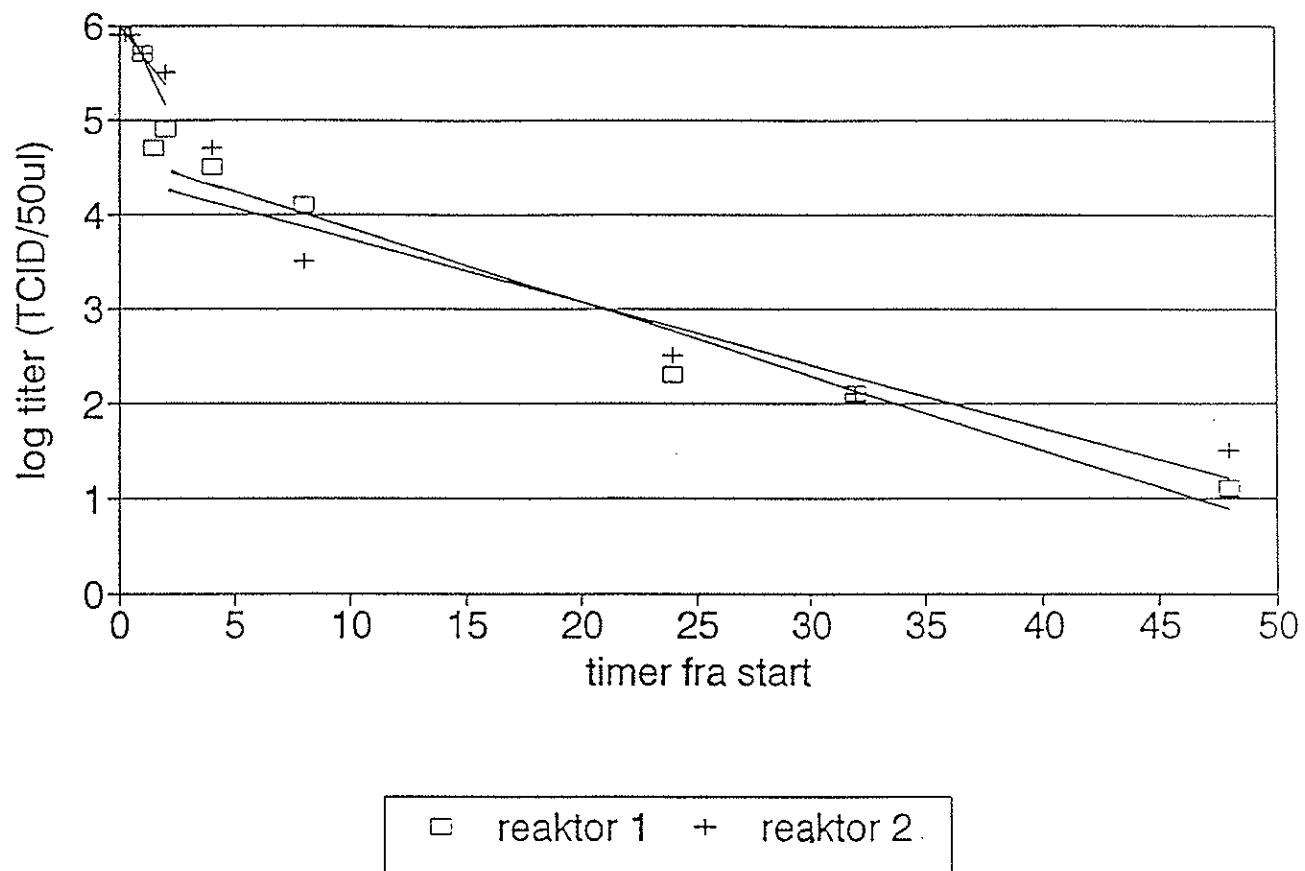
Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald



Figur 6 Bb. Bovint enterovirus - 2. Kørsel
Drabsraten er 12 t^{-1} hhv $>11 \text{ t}^{-1}$.

Figur 6 Ba+b: Den lave udgangskoncentration og høje drabsrate medfører at der kun er 3 punkter på hver graf. Korrelationskoefficienten kan derfor ikke beregnes. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skulle arbejdes med en MGRT på $<0,5$ time, men resultatet må tolkes med forsigtighed.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald

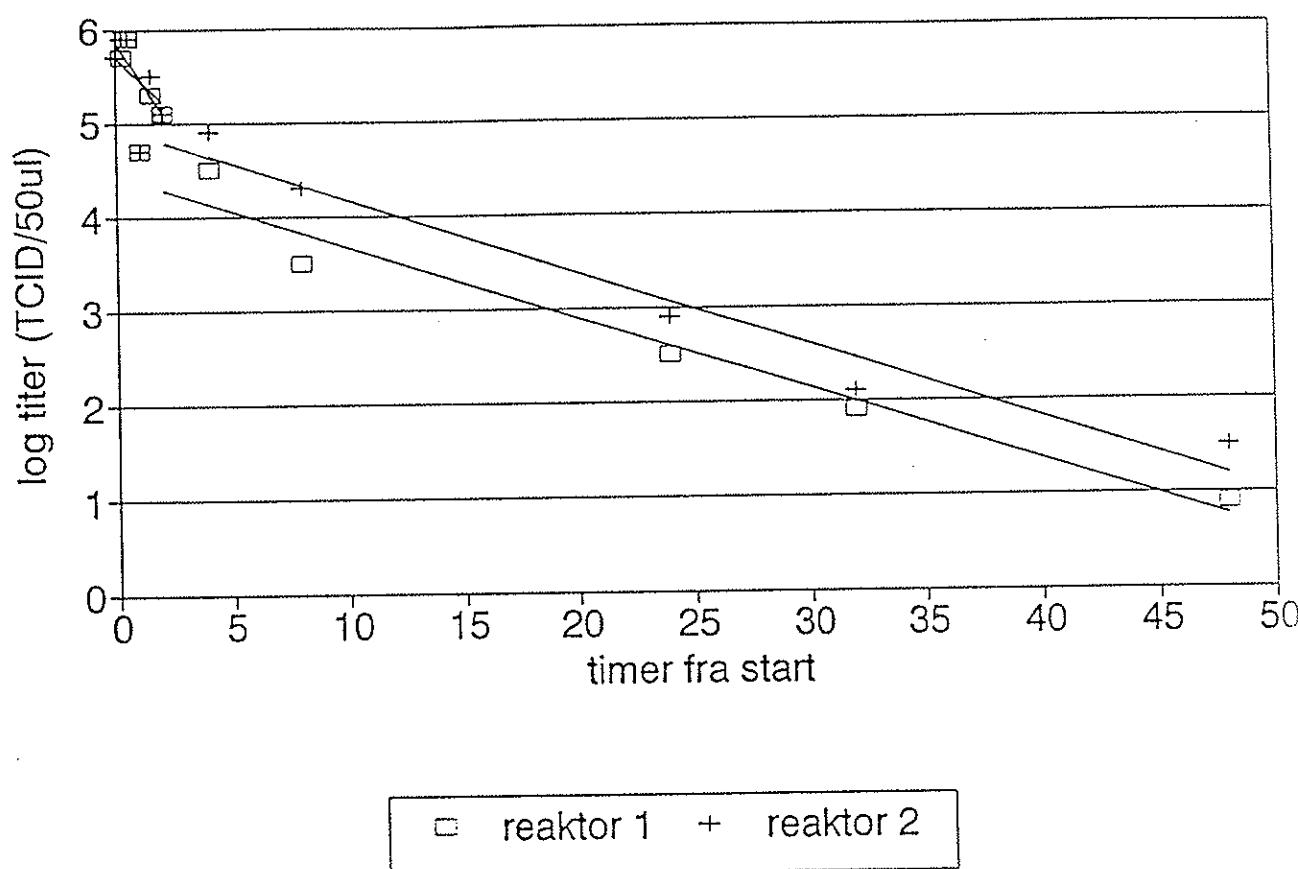


Figur 6 Ca. Porcint parvovirus - 1. Kørsel

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den initiale reduktion (0-4 timer) er hhv 0,78 og 0,97. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 7,9 og 13 timer.

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den senere reduktion (4-48 timer) er hhv 0,96 og 0,90. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 51 og 60 timer.

Termofil (55°C) udrådning af gylle tilsat blegejord og husholdningsaffald



Figur 6 Cb. Porcint parvovirus - 2. Kørsel

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den initiale reduktion (0-4 timer) er hhv 0,65 og 0,43. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 11 og 17 timer.

Korrelationskoefficienterne ved lineær regression for den senere reduktion (4-48 timer) er hhv 0,96 og 0,96. Ved ekstrapolation af henfaldskurven fås, at der for at opnå en reduktion på 4 log enheder skal arbejdes med en MGRT på hhv 53 og 51 timer.

Hygiejnisering (smitstofreduktion ved 70°C i 1 time)

Indhold af mikroorganismer som gennemsnit af prøver fra to inaktivieringsforsøg i 500 ml koniske kolber i 70 +/- 0,5°C vandbad. Prøverne er udtaget umiddelbart før tilsætning af mikroorganismer til kolberne samt efter en time. Prøverne udtaget før tilsætning til kolberne (nulprøver) tilsættes mikroorganismer svarende til udgangskoncentrationen i kolberne efter nedkøling.

Tabel 1 A: Fæcale streptococcer (log CFU/g).

	Timer fra podning	
	0	1
Fysiologisk saltvand	6,8	< 0,7
Gylle tilsat blegejord	6,8	< 0,7
Gylle tilsat blegejord og 20% husholdningsaffald	6,8	< 0,7

Tabel 1 B: Bovint enterovirus (log titer TCID/200 µl).

	Timer fra podning	
	0	1
Fysiologisk saltvand	4,6	< 0,7
Gylle tilsat blegejord	4,5	< 0,7
Gylle tilsat blegejord og 20% husholdningsaffald	4,3	< 0,7

Tabel 1 C: Porcint parvovirus (log titer TCID/50 µl).

	Timer fra podning	
	0	1
Fysiologisk saltvand	5,7	5,1
Gylle tilsat blegejord	5,9	5,3
Gylle tilsat blegejord og 20% husholdningsaffald	5,4	4,0

Af tabel 1A og tabel 1B fremgår, at der ved hygiejnisering sker en effektiv reduktion i indholdet af fæcale streptococcer og bovint enterovirus. Derimod reduceres indholdet af den termotolerante virus porcint parvovirus (tabel 1C) kun i ringe grad.

OPSUMMERING AF RESULTATER

BATCH FORSØG

Tabel 2 A: Reduktion i fæcale streptococcer i fysiologisk saltvand.

Betingelser	Korrelationskoef. ved lineær regression R ²	4 log enheders reduktion (timer)	Inaktivéringshastighed (time ⁻¹)
Mesofilt (35°C)			
R1	0,32	756	0,005
R2	0,52	907	0,004
AVG (STD)		832 (76)	0,005 (0,001)
Termofilt (55°C)			
R1	0,98	4,0	1,01
R2	0,98	3,6	1,12
AVG (STD)		3,8 (0,2)	1,1 (0,06)

Tabel 2 B: Reduktion i bovin enterovirus

Betingelser	Korrelationskoef. ved lineær regression R ²	4 log enheders reduktion (timer)	Inaktivéringshastighed (time ⁻¹)
Mesofilt (35°C)			
R1	0,60	219	0,018
R2	0,16	(512)	(0,008)
AVG (STD)		219	0,02
Termofilt (55°C)			
R1	0,88	2,3	1,701
R2	0,83	2,3	1,726
AVG (STD)		2,3 (0,0)	1,71 (0,01)

Tabel 2 C: Reduktion i porcint parvovirus

Betingelser	Korrelations-koef. ved lineær regression R^2	4 log enheders reduktion (timer)	Inaktivierings-hastighed (time^{-1})
Mesofilt (35°C)			
R1	i.u.	i.u.	i.u.
R2			
AVG (STD)			
Termofilt (55°C)			
R1	0,93	144	0,028
R2	0,88	153	0,026
AVG (STD)		148 (7)	0,03 (0,11)

i.u. = ikke udført.

KONTINUERTE REAKTORER

Tabel 3 A: Reduktion i fæcale streptococcer

Betingelser	Korrelations-koef. ved lineær regression (R^2)	4 log enheders reduktion (timer)	Inaktivierings-hastighed (time^{-1})
Mesofilt (35°), gylle + blegejord:			
R1	0,87	0,98	351 269
R2	0,81	0,72	563 (1754)
AVG (STD)			296 (124) 0,01 (0,00)
Termofilt (55°C), gylle + blegejord:			
R1	0,94	0,99	1,0 1,1
R2	0,84	0,96	1,2 1,2
AVG (STD)			1,1 (0,08) 3,7 (0,32)
Termofilt (55°C), gylle + blegejord + husholdningsaffald			
R1	0,90	0,86	1,1 2,2
R2	0,93	0,98	2,3 2,8
AVG (STD)			2,1 (0,62) 2,1 (0,86)

Til tabel 3A skal det bemærkes, at ved 55°C aflæstes pladerne både efter 48 og 96 timer, da streptococcer der havde opholdt sig mere end 2 timer i reaktoren voksende langsommere frem. I ovennævnte tabel er angivet data fra tællingen efter 48 timer, da differencen havde ubetydelig effekt på korrelationskoefficient og drabsrate.

Da mange af de termofile anlæg kører ved 52°C (med begrundelsen at undgå ammoniumhibering) er der medtaget en enkelt kørsel med to reaktorer ved denne temperatur. Ved 52°C medgik 2,5 timer for at opnå en 4 log reduktion, mod gennemsnitligt 2,1 time ved 55°C. Tilsvarende var drabsraten ved 52°C $1,6 \text{ t}^{-1}$ mod gennemsnitligt $2,1 \text{ t}^{-1}$ ved 55°C. Drabseffekten ved disse kørsler var altså ikke væsentlig lavere end ved 55°C og ammoniumindholdet i begge reaktorer 2,0 g/l (uændret totalkoncentration af $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, men evt. ændret forhold mellem NH_3 og NH_4^+). Svovlbrinteindholdet 1620 ppm.

Tabel 3 B: Reduktion i bovint enterovirus

Betingelser	Korrelationskoef. ved lineær regression (R^2)		4 log enheders reduktion (timer)	Inaktivéringshastighed (time $^{-1}$)
Mesofilt (35°), gylle + blegejord:				
R1	0,92	0,98	20	22
R2	0,96	0,90	24	27
AVG (STD)			23 (1,6)	0,201 0,186 0,167 0,148 0,18 (0,01)
Termofilt (55°C), gylle + blegejord:				
R1	ib*	ib	<0,5	<0,5
R2	ib	ib	<0,5	<0,5
AVG (STD)			<0,5	>11 >11 >11 >13 >12
Termofilt (55°C), gylle + blegejord + husholdningsaffald				
R1	ib	ib	<0,5	<0,5
R2	ib	ib	<0,5	<0,5
AVG (STD)			<0,5	>10 12 12 >11 >11

*ib = kan ikke beregnes.

Til tabel 3 B skal bemærkes, at reduktionen kun har kunnet følges over 2 logaritmeheder i de termofile anlæg, dels som følge af den høje detektionsgrænse for virus i gylle, dels pga. den lave udgangstiter for BEV i de termofile reaktorer. Ydermere er reduktionshastigheden meget høj ved 55°C. Dette giver stor usikkerhed ved beregning af 4 log reduktionstiden og drabsrater for BEV i de termofile reaktorer.

Tabel 3 C: Reduktion i porcint parvovirus

Afbildning af virustiter i logaritmiske enheder mod tiden giver ikke en ret linie idet drabsrate falder med tiden. Der er derfor lavet adskilte beregninger for a) den hurtige initiale inaktivering (0-4 timer) og b) den senere inaktivering ("terminal", 4-48 timer).

a.

Betingelser	Korrelationskoef. ved lineær regression (R^2)	4 logaritme reduktion (timer)	Initial inaktivierings-hastighed (time^{-1})
Mesofilt (35°), gylle + blegejord: R1 R2 AVG (STD)	i.u.*	i.u.	i.u.
Termofilt (55°C), gylle + blegejord: R1 R2 AVG (STD)	0,81 0,49 0,49	0,94 0,82 14,8	14,3 6,1 10,5 11(4,1)
Termofilt (55°C), gylle + blegejord + husholdningsaffald R1 R2 AVG (STD)	0,78 0,97 0,97	0,65 0,43 13,0	7,9 10,5 17,2 12(3,9)

*i.u. = ikke udført.

b.

Betingelser	Korrelationskoef. ved lineær regression (R^2)	4 log enheders reduktion (timer)	"terminal" inaktivierings-hastighed (time^{-1})
Termofilt (55°C), gylle + blegejord: R1 R2 AVG (STD)	0,88 0,98 0,93 0,98 0,93 0,98	50 66 60 42 54(10)	0,081 0,061 0,066 0,094 0,075(0,015)
Termofilt (55°C), gylle + blegejord + husholdningsaffald R1 R2 AVG (STD)	0,96 0,96 0,90 0,96 0,90 0,96	51 53 60 51 54(4,4)	0,078 0,076 0,066 0,079 0,075(0,006)

Tabel 4. Resultater af analyser for ammonium, svovlbrinte, methanproduktion, pH og flygtige fede syre i de kontinuerte reaktorer.

Betingelser	ammo-nium (g/l)	svovl-brinte i gas (ppm)	methan- produktion (ml CH ₄ /g VS tilsat)	pH	VFA (g/l)
Mesofilt (35°C), gylle + blegejord: Føde	2,6				
R1	2,5		310	8,0	360
R2	2,1	1750	290	8,0	330
Termofilt (55°C), gylle + blegejord: Føde	2,1				
R1	2,4		280	8,0	850
R2	2,6	2100	280	8,0	860
Termofilt (55°C), gylle + blegejord + husholdningsaffald					
Føde	2,1				
R1	2,1		380	8,0	720
R2	2,0	1990	400	8,0	730

De kemiske analyser (tabel 4) for ammonium, svovlbrinte, pH og VFA er gennemsnit af kun to målinger foretaget umiddelbart før virus og bakterier tilsatningerne. Methanproduktionen er gennemsnitsstal for ugen op til forsøgene.

DISKUSSION

Virusinaktivering i fysiologisk saltvand:

Under termofile betingelser (55°C) ses for PPV en decimeringstid på 37 timer (0,027 log/time) og for BEV 35 min (1,7 log/time).

I andre forsøg er der fundet en kortere decimeringstid for forskellige enterovirus. For coxackievirus er fundet en decimeringstid på 15 min og for echovirus 12 min i Hanks saltopløsning (Lund et al., 1982). McKain & Hobson (1987) har for porcint enterovirus fundet decimeringstid ved termisk inaktivering på 15 min initialt ved 55°C . Disse resultater svarer imidlertid til hvad der er fundet for BEV i den initiale fase (første 15 min) i nærværende forsøg (jvf. inaktiveringsskurven for BEV, figur 3B).

For PPV i Eagles MEM har Bøtner (1990) fundet en decimeringstid på 24 timer ved 55°C ; For PPV er der således fundet en noget langsommere inaktivering i nærværende forsøg. Medvirkende til den langsommere inaktivering kan dels være en forskel i præparationen (suspenzionen), dels at der er tilsat bakteriesuspension til saltvandet, og dermed bl.a. proteiner, som kan interferere med den termiske inaktivering (Ward et al., 1976).

Under mesofile forhold er den termiske inaktivering af BEV meget lav i fysiologisk saltvand (0,02 log/time). Der er ikke udført forsøg med PPV under mesofile forhold, men en endnu langsommere inaktivering af PPV er forventelig. Ved tidligere forsøg (Bøtner, 1990) er fundet, at inaktiveringen af PPV ved 35°C , forløb med en hastighed på 5 log/21 uger i gylle og 5 log/6 uger i et neutralt medium. I et forsøgsforløb på 2 dage, som i nærværende forsøg, kunne en målbar reduktion i PPV således ikke forventes.

Batchforsøg ved 70°C :

Ved hygiejnising, 70°C i en time ses en fuldstændig inaktivering af FS og BEV uafhængig af mediet.

For gylle og fysiologisk saltvand ses at PPV reduceres ca. 0,6 log-enhed ved hygiejnising 70°C i en time; dvs at der alt overvejende er tale om en varmeinaktivering i gyllen. Inaktiveringen i biomasse med husholdningsaffald er tilsyneladende hurtigere (1,0-1,8 log). Ingen af de målte parametre kan forklare dette; det må dog bemærkes, at usikkerheden på disse resultater er meget stor (få måleresultater og stor spredning).

Med hensyn til inaktivieringshastigheden i fysiologisk saltvand ved 70°C har Srivastava & Lund (1980) for bovin parvovirus fundet en inaktivering på 3,3 log/4 timer svarende til 0,8 log/time. Dette svarer, indenfor måleusikkerheden, til resultatet i nærværende forsøg. Det skal bemærkes at der også i batchforsøgene med fysiologisk saltvand er tilsat bakteriekultur, hvilket kan være årsag til en let forhalet inaktivering.

Reaktorforsøg:

Ved tilslætning af BEV til (afkølet) biomasse fra reaktorer kørt ved 55°C ses et brat fald i titeren. Titeren i nulprøverne er 0,9 log-enhed lavere end i de tilsvarende nulprøver fra fysiologisk saltvand.

Titeren i nulprøver af biomasse fra mesofile reaktorer samt fra batchforsøgene ved 70°C er på samme niveau som de tilsvarende nulprøver i fysiologisk saltvand. Der er anvendt rå biomasse i batchforsøgene.

Dette viser at den lave titer i nulprøverne fra de termofile reaktorer ikke skyldes en irreversibel adsorption til partikulært materiale, men er udtryk for en reel inaktivering. Da der ikke ses et tilsvarende fald i fysiologisk saltvand ved 55°C eller i de øvrige reaktorer, kan det kraftige titerfald skyldes at der i biomassen ved udrådning ved 55°C dannes nogle stærkt virucide faktorer; disse dannes tilsyneladende ikke (i betydeligt omfang) i mesofile reaktorer eller ved opvarmning af biomassen til 70°C.

Af mulige virucide faktorer er indholdet af ammoniak eller svovlbrinte; det fremgår af tabel 4 er koncentrationerne af $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ og svovlbrinte ikke markant forskellige ved de to reaktortemperaturer, men der er nogen forskel i koncentrationen af NH_3 (jvf. diskussion side 62).

Der ses generelt en større forskel mellem virusinaktiveringen i fysiologisk saltvand og i biomasse jo lavere temperaturen er - jo lavere temperaturen er desto større er den relative betydning af miljøet iøvrigt i biomassen, herunder ammoniakkoncentrationen.

Ud fra reduktionsraterne kan omregnes fra logaritmiske til almindelige talværdier for reduktionen i et givent tidsinterval og en given udgangskoncentration (som kan vælges vilkårligt, da en konstant reduktionsrate forudsættes). Herudfra kan beregnes, hvor stor en procentdel mængden af inaktiverede mikroorganismer i fysiologisk saltvand (svarende til den termiske inaktivering) udgør i forhold til mængden af inaktiverede mikroorganismer i gylten i reaktorerne/batchforsøgene:

Organisme, temperatur	Termisk inaktivering i % af total inaktivering (substrat)
FS, 35°	50% (gylle)
FS, 55°	92% (gylle) 93% (gylle + HA*)
BEV, 35°	21% (gylle)
BEV, 55°	< 63% i den initiale fase (gylle/gylle tilsat HA)
PPV, 55°	11% i den initiale fase (gylle/gylle tilsat HA) 48% i den "terminale" fase
PPV, 70°	100%

* HA = husholdningsaffald

Den termiske inaktivering har således størst betydning (i forhold til den samlede inaktivering) i den terminale fase og ved høje temperaturer. Endvidere ses at faktorer (fysisk-kemiske faktorer) ud over den termiske inaktivering har større betydning for virus end for fæcale streptococcer.

Da reduktionen af patogener i biogasreaktorer sker hurtigere end ved ren termisk behandling, kan holdetiden (krav til behandlingstid) forkortes ved udrådning i reaktorer. Denne afkortning af holdetiden kan udtrykkes ved ratio (forholdet) mellem inaktivéringshastigheden i fysiologisk saltvand og i reaktorerne: Eksempelvis for BEV ved 35° kan ratio beregnes til $0,02 t^1 / 0,18 t^1 = 0,11$, hvilket betyder, at der kræves en holdetid i reaktoren, som er 11% af den påkrævede holdetid i fysiologisk saltvand.

Tilsvarende fås:

Organisme, temperatur	Forholdet mellem inaktivieringshastigheden i fysiologisk saltvand og i reaktorerne (substrat)
FS, 35°	0,5
FS, 55°	0,30 (gylle) 0,52 (gylle + HA)
BEV, 35°	0,11 hele forløbet; ratio vil være lidt højere i den terminale fase (gylle)
BEV, 55°	<0,15 i den initiale fase (gylle/gylle + HA)
PPV, 55°	0,08 i den initiale fase (gylle/gylle tilsat HA) 0,40 i den "terminale" fase (gylle/gylle tilsat HA)
PPV, 70°	1,0

HA = husholdningsaffald

Tilsvarende er fundet for bakteriofag f2 i et forsøg, hvor virus var adsorberet på en elektropositiv membran og beskyttet mod direkte kontakt med partikelfasen (Traub et al., 1986): Ratio var 0,19 i mesofile reaktorer, 0,32 i termofile og 1,00 ved 60°C. Der er således en god overensstemmelse med resultaterne for virus i nærværende forsøg ved sammenligning med inaktiveringen af BEV og PPV i den terminale fase, men ikke i den initiale fase.

For BEV i mesofile reaktorer er der fundet en decimeringstid på 5,7 timer og i de termofile reaktorer ca. 6 min. For de termofile reaktorer gælder denne værdi kun for inaktiveringen over de første 2 log-enheder. Lund et al. (1983) har fundet en decimeringstid på 1½ time over de første 3 log- enheder for coxakievirus (humant enterovirus) i termofile slambaserede reaktorer ved 56°C; men decimeringstiden steg herefter op til 9 timer. Ved 53°C og 50°C var decimeringstiden hhv. 1½ og 2 timer over de første 3-4 log enheder, men steg herefter til 18 timer. Coxackievirus var det mest stabile af de undersøgte humane enterovirus; således var decimeringstiden 30 min ved 53°C for echovirus.

Inaktiveringen af BEV i reaktorerne i nærværende forsøg forløber således langt hurtigere end inaktiveringen af coxakievirus også hvis man sammenligner med den initiale fase (i modsætning til hvad der sås for de to virus i fysiologisk saltvand; se ovenfor). Lund et al. (1982) angiver dog ikke decimeringstiden specifikt for de første 2 dekader. Endvidere er forholdene i reaktorerne anderledes: Lund et al. anvender slam i reaktorerne og kører med et lavere pH (ca. 7,3). Resultaterne kan derfor ikke sammenlignes

direkte med nærværende forsøg. Imidlertid viser forsøgene med de humane enterovirus tydeligt at der er en markant faldende inaktivieringshastighed med tiden.

Dette understreger at de fundne inaktiveringstider for virus i reaktorerne ikke umiddelbart må tages til udtryk for den inaktivering, der sker af naturligt forekommende virus. MGRT er bestemt ved ekstrapolation; inaktiveringen af BEV i termofile reaktorer er sandsynligvis hurtigere initialt, svarende til hvad der ses for PPV under termofile betingelser.

Den stigende decimeringstid som funktion af tiden, er et fænomen som er igangtaget i mange undersøgelser (fx Bøtner, 1990; Lund et al., 1982; McKain & Hobson, 1987) for forskellige virus i gylle og slam. Årsagen til fænomenet er ikke klarlagt, men flere har fundet indikationer for, at det i hvertfald delvist skyldes at nogle viruspartikler er beskyttet ved association til partikelfasen; dette er et velkendt fænomen for virus i vandige oplosninger (Lund et al., 1982).

Denne understøttes af, at der er fundet en konstant decimeringstid i forsøg, hvor virus er elektrostatisk bundet og beskyttet af en polycarbonatmembran mod adsorption til partikulært materiale men ikke beskyttet mod lavmolekylære kemiske forbindelser (Traub et al. 1986).

McKain & Hobson, (1987) har undersøgt inaktiveringen af virus i dialyseslanger nedsænket i kontinuerte reaktorer. De fandt også her en stigende inaktiveringstid, inaktiveringen var dog hurtigere initialt for virus direkte op blandet i biomassen (batchreaktorer) end i dialyseslangerne. Dette viser, at omend partikelassociation er væsentlig må andre faktorer også have betydning for den hurtige reduktion initialt.

Det vides ikke i hvilken grad partikelassociation interfererer med inaktiveringen af naturligt forekommende virus. Berg & Berman (1980) har igangtaget en decimeringstid på ca. 20 dg for naturligt forekommende humane enterovirus i spildevandsslam ved mesofil udrådning mod ca. 1 dg for laboratoriestammer sat til slam. Heraf ses at det kan have særdeles stor betydning hvilket materiale virus stammer fra, herunder at de naturligt forekommende kan udgøre en mere resistent (del-)population, eller i hvilken grad virus er assorciert til materialet. På denne vis kan biomassens beskaffenhed have afgørende betydning. Det må her nævnes at Lund et al. (1982) har fundet, at spildevandsslam kan have en beskyttende effekt på virus i termofile reaktorer sammenlignet med den termiske inaktivering i fysiologisk saltvand. Da der i nærværende forsøg ikke er fundet signifikant forskel mellem virusinaktiveringen i de to anvendte typer biomasse, kan resultaterne således ikke direkte overføres på reaktorer, der er baseret på væsentlig anderledes typer biomasse som spildevandsslam.

Berg & Berman (1980) har endvidere fundet, at der ikke er nogen sammenhæng mellem forekomsten af virus og FS i rå slam, men den relative reduktion af FS afspejler den relative reduktion af virus (med en spredning op til en faktor 10), både under termofile og mesofile betingelser. I nærværende forsøg er fundet, at drabsrate for FS er ca. en faktor 10 lavere end for enterovirus.

Den opnåede 4 log reduktionstid for FS i fysiologisk saltvand (3,8 timer) er i samme størrelsesorden som Mikkelsen & Bennetzen (1993) fandt i hhv. rå gylle og rå gylle tilsat 20 % slam (hhv. ca. 3,3 og 3,4 time). Disse reduktionstider indikerer at det tager ca. 2 til 3 gange så lang tid at hygiejniser i rå gylle som i en aktiv biogasreaktor.

Ved sammenligning af inaktiveringen i reaktorer baseret på gylle og gylle tilsat 20% husholdningsaffald ses en tendens (især for virus) til lavere inaktiveringssrate i reaktorer tilsat husholdningsaffald, men forskellen er ikke statistisk signifikant. For PPV må forlanges en MGRT på 11 timer i reaktorer baseret på gylle mod 12 timer i reaktorer med 20% husholdningsaffald. For BEV kan virus ikke genfindes efter 15 min i reaktorer baseret på gylle, mens virus i nogle tilfælde kan genfindes i 15-30 min i reaktorer med 20% husholdningsaffald. Med hensyn til reduktionen i indholdet af fæcale streptococcus har Bennetzen & Mikkelsen (1993) ligeledes fundet en meget lille forskel mellem forskellige substrater. Der er fundet et lidt lavere indhold af både ammonium og svovlbrinte i reaktorer baseret på gylle tilsat 20% husholdningsaffald (tabel 4). Andelen af fri NH_3 er ikke målt og kan være forskellig. Forsøget giver ikke statistisk grundlag for at afgøre, hvorvidt der er en sammenhæng mellem den langsommere inaktiveringshastighed og det lavere indhold af ammonium. Proteinindholdet er ikke målt, men et forventet højere indhold i husholdningsaffaldet kunne virke beskyttende på virus.

Ammoniumkoncentrationen ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) ligger mellem 2,0 g/l og 2,6 g/l i alle reaktorerne (pH 8, hhv. 35 og 55°C), svarende til forventede koncentrationer af frit ammoniak i størrelsesordenen 0,6-0,7 g/l i termofile reaktorer og 0,3 i mesofile reaktorer. Som nævnt i indledningen har Ward & Ashley (1977) i forsøg med poliovirus fundet, at frit ammoniak ved koncentrationer over 0,4 g/l har en væsentlig virucid effekt; ved inkubation 4 timer ved 21°C ses 0,4 log reduktion ved 0,4 g NH_3 /l og 4 log reduktion ved 5,0 g NH_3 /l. Ammonium i reaktorforsøgene må således forventes at kunne have stor betydning for virusinaktiveringen.

Burge et al. (1983) har fundet, at en stigning i ammoniakkoncentrationen medfører en stigning i inaktiveringshastigheden, som er uafhængig af temperaturniveauet (10-30°C). Endvidere har de fundet, at ændringer i ammoniakkoncentrationen har stor betydning ved temperaturer <40°C; de har bl.a. fundet, at inaktiveringshastigheden for poliovirus ved 30°C er ca. 2½ gange

højere ved 0,3 g NH₃/l end ved 0,05 g NH₃/l. Derimod har de fundet, at ved 50°C og temperaturer derover er den termiske inaktivering så stor, at det langt overstiger betydningen af variationer i ammoniakkoncentrationen (0,1 - 0,8 g/l) ved de lavere temperaturer (<40°C). I nærværende forsøg kan det ikke estimeres hvor stor betydning ammoniakindholdet har haft for virusinaktiveringen, dog må det konstateres at effekten af en ammoniumkoncentration på 0,4 g NH₃/l (0,4 log/4 timer) for poliovirus (Ward & Ashley 1977) er lav når der sammenlignes med inaktiveringshastigheden for BEV i termofile reaktorer (ca. 12 log/time); reduktionsraten for BEV i mesofile reaktorer (0,18 log/time) er derimod af samme størrelseorden. Dette tyder på at ammoniak kan have haft væsentlig betydning i de mesofile reaktorer.

Et af formålene med dette forsøg var at undersøge om miljøet i en aktiv stabil biogasreaktor giver en større virusinaktiviterende effekt (additiv effekt) end den model som tidligere er anvendt i forsøg på SVIV (Bøtner, 1990). For PPV under termofile betingelser har Bøtner fundet 4,4 log reduktion/24 timer og 4,7 log/48 timer, og i nærværende forsøg er fundet gns. 3,1 log reduktion/24 timer og 4,4 log reduktion/48 timer. Der ses således en lidt hurtigere inaktivering i Bøtners forsøg, men dette skal sammenholdes med, at der ses en tilsvarende difference for inaktivering af PPV i neutralt medium ved 55°C: 1 log/37 timer nærværende forsøg mod 1 log/24 timer i Bøtners forsøg. Der kan således ikke påvises en additiv effekt i forhold til den på SVIV anvendte model (med batchvis udrådning).

På grundlag af Europakommisionens program Cost 68/681, 1972-90 (Strauch & Carrington, 1992) er bl.a. anbefalet, at der sættes krav om en 4 log enheders reduktion af parvovirus eller enterovirus til gylle- og slambehandlingsanlæg for at opnå en tilstrækkelig hygiejniserings, således at spredning af patogene virus kan forhindres. For parvovirus må dette anses for urealistisk, set i betragtning af at dette virus er ekstremt varmeresistent i forhold til andre virus og de hidtidige krav til hygiejnierung (70°C i en time) kun giver ca. 1 log inaktivering. For det bovine og porcine parvovirus er der tale om endemisk forekommende virus og smitten bør begrænses ved restriktioner i forbindelse med udbringning (som minimum forbud mod udbringning på marker der anvendes til foderafgrøder til den dyreart, som affaldet stammer fra).

Enterovirus hører som nævnt til de mere resistente virus og er endvidere de mest almindeligt isolerede fra spildevandsslam og husdyrgødning (Lund et al, 1984; Nichelsen, 1993; Derbyshire et al, 1986). Kendskabet til forekomsten af virus i forskellige affaldstyper er desværre stadig meget begrænset, men på grundlag af den eksisterende viden bør som anbefalet kræves en 4 log reduktion af enterovirus:

- 1) Der kan forekomme enteriske virus i koncentrationer på ca. 10^5 TCID/l (Derbyshire et al, 1986), men også andre virus, (fx mund- og klovsygevirus udskilt i vesikelvæske; Sellers, 1980) vil kunne forekomme i gylle i tilsvarende koncentrationer under udbrud.
- 2) Pga den relativt høje resistens af enterovirus vil et krav om 4 log reduktion sikre at også de fleste andre vigtige patogene animale virus vil være inaktivert, jvf undersøgelserne af Bøtner (1990).

Det må dog tages i betragtning, at enkelte andre patogene virus kan være mere resistent, bl.a. reovirus der er mere resistent overfor ammoniak i biomassen (Ward & Ashley, 1977). For spildevandsslam må der tages hen-syn til de i spildevand almindeligt forekommende humane Norwalk virus og humane rotavirus (Nichelsen, 1993).

KONKLUSION

I den gennemførte forsøgsrække var hovedformålet at undersøge persistensen af infektivt virus ved mesofil og termofil udrådning af gyllebaserede substrater, samt undersøge FS-metodens egnethed som indikator for virusinaktiveringen. Der foreligger meget få undersøgelser af den virusinaktiveterende effekt af selve biogasprocessen under virkelighedstro betingelser. Her er imidlertid anvendt en model som nøje afspejler et moderne biogasanlæg og processen er endvidere overvåget ved registrering af faktorer med potentiel virucid og bakteriocid effekt, da det er vigtigt at få den smitstofreducerende effekt korreleret til veldefinerede reaktorforhold. Der er anvendt to forskellige typer substrat med det formål at undersøge betydningen for den smitstofreducerede effekt. Forsøgene er udført ved tilslætning af fæcale streptococcer og to forskellige cellekulturvirus, udvalgt efter deres resistens overfor ydre faktorer. Inaktivieringsforløbet efter en sådan tilblanding af virus kan imidlertid ikke forventes at være helt som for naturligt forekomne virus, hvilket må indgå i vurderingen.

Udfra resultaterne er beregnet tiden for en 4 log reduktion for de målte mikroorganismer, som mål for mindste garanteret retentionstid (holdetid); begrundelsen herfor er at 4 log reduktion internationalt er et almindeligt anvendt krav til hygiejniseringsprocesser.

Inaktivieringshastigheden for indikatoren fæcale streptococcer er generelt omkring en faktor 10 højere end inaktivieringshastigheden for porcint parvovirus og en faktor 10 lavere end for bovin enterovirus.

Inaktiviseringshastigheden for fæcale streptococcer ved 55°C er som forventet højere end ved 35°C, hvilket betyder at den mindste garanterede retentionstid (her 4 log reduktion) bør være hhv. 1-2 timer og 300 timer. Den hygiejniserende effekt af mesofil udrådning er altså ubetydelig. Inaktivering i fysiologisk saltvand er væsentligt lavere end i kontinuerligt kørende gyllebaserede biogasreaktorer. Dette indikerer en stærkt hæmmende virkning af miljøet i en biogasreaktor med en aktiv biomasse. Sammenlignes de opnåede data med litteraturangivelser ses, at inaktiveringen af FS i rå gylle er 2-3 gange langsommere end i en aktiv biogasreaktor.

Tilsvarende ses for virus en betydeligt højere inaktivieringsrate under termofil udrådning end under mesofil udrådning. For bovin enterovirus er beregnet at den mindste garanterede retentionstid (4 log reduktion) bør være hhv. 23 timer og <0,5 time. Sidstnævnte må tolkes med forbehold, da værdien er fundet ved ekstrapolation ud fra den initiale drabsrate, som dels er beregnet på et spinkelt grundlag, dels er kurven den første del af et formodentlig ikke linært forløb.

For porcint parvovirus under termofile betingelser er der, på grundlag af den hurtige inaktivering initialt, beregnet, at det er nødvendigt at den mindste garanterede retentionstid er 11 timer (gylle) og 12 timer (gylle tilsat husholdningsaffald). På grundlag af den efterfølgende forhalede inaktivering er beregnet en mindste garanteret retentionstid på 54 timer (beregnet ud fra perioden 4-48 timer efter virustilsætning). MGRT i denne størrelsesorden er ikke praktisk gennemførlige.

Inaktiveringen i reaktorer baseret på gylle og gylle tilsat 20% husholdningsaffald udviser en tendens til lavere inaktiveringshastighed (især for virus) i reaktorer tilsat husholdningsaffald. Der er et lidt lavere indhold af både ammonium og svovlbrinte i reaktorer, hvor gyllen er tilsat 20% husholdningsaffald, men dette forsøg giver ikke statistisk grundlag for at relatere ændringerne i den hæmmende virkning hertil. Proteinindholdet er ikke målt, men et højere indhold, som må forventes ved tilsætning af husholdningsaffald, kunne virke beskyttende på virus.

Ved hygiejnisering 70°C i 1 time ses en fuldstændig inaktivering af fæcale streptococcer og bovin enterovirus, mens porcint parvovirus kun reduceres ca. en logaritmeenhed.

Der ses generelt en større forskel mellem virusinaktiveringen i fysiologisk saltvand og i biomasse jo lavere temperaturen er. Varmeinaktivering er tydeligvis væsentlig i biogasreaktorer, men andre faktorer i miljøet i reaktorerne har en væsentlig reducerende effekt på bakterier såvel som virus. Der er indikationer for, at der i de termofile anlæg dannes nogle virucide faktorer, som ikke dannes i de mesofile anlæg, men faktorerne er ikke identificeret.

Ammoniakkoncentrationen er på et niveau hvor en vis virucid effekt er forventelig, især i de mesofile reaktorer må effekten af NH₃ have været væsentlig. Det har imidlertid ikke været muligt at estimere den relative betydning i de forskellige reaktorkørsler.

Forsøgene viser endvidere, at fæcale streptococcer er mindre velegnede som indikator for virusinaktiveringen i mesofile reaktorer. FS-metoden synes derimod at være anvendelig for termofile reaktorer også når det gælder enterovirus og mere labile virus. Det nuværende krav (ved behandling af gylle og affald fra kategori A og B) om en sikret opholdstid på mindst 2 timer i en reaktor ved 55°C synes udfra resultaterne at være et tilstrækkeligt krav for at opnå en hygiejnisering af reaktorindholdet (4 log reduktion af FS), under forudsætning af en god styring af tid/temperaturforhold.

Termofil behandling ved 52°C istedet for 55°C synes på grundlag af de foretagne forsøg at give en tilstrækkelig god hygiejnisering, vurderet ud fra

fæcale streptococcer. Med hensyn til variationer i reaktortemperaturen i området 50°C-56°C tyder den foreliggende litteratur på at en sænkning af driftstemperaturen vil kræve en relativt begrænset øgning af holdetiden (i størrelsesordenen en fordobling) ved en temperatursænkning fra 55°C til 50°C (Lund et al., 1983). Dokumentationen er dog sparsom og det kan ikke udelukkes at nogle virus kunne blive et problem ved sænkning af driftstemperaturen.

Imidlertid må der tages forbehold i vurderingen, hvad angår virusinaktiveringen, idet virus under naturlige forhold vil være delvist indlejret i vævsrester og aggregater af partikulært materiale eller adsorberet hertil, og således vil være bedre beskyttet, end når virus tilsættes som er oprenset cellekultur-virus. Inaktivéringshastighederne for naturligt forekommende virus vil derfor formodentlig være lavere end de her beregnede - for porcint parvovirus muligvis svarende til den lavere hastighed "terminalt". Forholdet mellem den initiale og terminale inaktivering er ca. en faktor 4 for porcint parvovirus. Dette forhold er muligvis endnu større for bovin enterovirus, da dette er mere følsomt for faktorer i biomassen (jf. det hurtige fald i titer ved tilsætning af virus til biomasse). Såfremt forholdet er det samme for de 2 virus, vil 4 logaritmeenheders reduktion af bovin enterovirus kunne opnås på ca. 2 timer ved 55°C. Lund et al. (1982) har fundet en faktor 10 forskel mellem decimeringen i den initiale fase og den senere fase, for et coxackievirus (humant enterovirus) i reaktorer baseret på spildevandsslam. For indeværende er det således ikke muligt at estimere inaktivéringshastigheden for naturligt forekomne virus, men det foreliggende tyder på, at den er i størrelsesordenen mellem 4 og 10 gange lavere end for tilsatte cellekulturvirus (svarende til en MGRT på mellem 2 og 5 timer for BEV ved 55°C).

Der bør søges grundlag for at vurdere i hvilken grad partikelassocieringen virker forhalende på virusinaktiveringen, for at kunne vurdere om fæcale streptococcer er en velegnet indikator for inaktivering af virus, og hvilke krav der bør sættes til mindste garanterede opholdstid.

Parvovirus har været under overvejelse som indikator i temperaturområdet 50-80°C. Parvovirus er velegnet til sammenlignende undersøgelser i dette temperaturområde, da det persisterer længe nok ved de meget høje temperaturer til at inaktiveringen kan følges over en længere periode. Imidlertid er viruset så ekstremt resistent, at det er et spørgsmål om det er rimeligt at ekstrapolere til andre virus; de aktuelle inaktivéringsmekanismer er muligvis meget forskellige. For anvendelsen af PPV taler, at den relative betydning af den termiske inaktivering ved 55°C og 70°C for PPV svarer til hvad Traub et al. (1986) har fundet for bakteriofagen f2.

Ved fastsættelse af krav til biogasreaktorerne er det rimeligt også at tage udgangspunkt i de relativt resiste virus som reovirus og picornavirus.

Ønsker man imidlertid en behandling som modsvarer hygiejniseringen ved 70°C, 1 time er man nødt til at tage udgangspunkt i parvovirus.

I dette forsøg er fundet, at der ved en behandling 1 time ved 70°C opnås ca. 1 log reduktion af porcint parvovirus og ved 55°C opnås en tilsvarende reduktion på ca. 13 timer (beregnet ud fra den terminale fase).

Et krav om en 4 log reduktion af parvovirus (jvf. Strauch & Carrington, 1992) må anses for urealistisk, set i betragtning af at det er ekstremt varmeresistent i forhold til andre virus og de hidtidige krav til hygiejnisering (70°C i en time) i nærværende forsøg kun giver ca. 1 log inaktivering af det porocine parvovirus. For bovine og perocine parvovirus er der tale om endemisk forekommende virus og smitten bør begrænses ved restriktioner i forbindelse med udbringning.

Enterovirus hører som nævnt til de mere resistente virus og er endvidere de mest almindeligt isolerede fra spildevandsslam og husdyrgødning. Der bør som tidligere anbefalet (jvf. Strauch & Carrington, 1992) kræves en 4 log reduktion af disse. Kendskabet til forekomsten af virus i forskellige affaldstyper er desværre stadig meget begrænset, men på grundlag af den eksisterende viden bør som anbefalet kræves en 4 log reduktion af enterovirus. Det må dog tages i betragtning, at enkelte andre patogene virus kan være mere resitive bl.a. reovirus, der er mere resistent overfor ammoniak i biomassen (Ward & Ashley, 1977).

ORDLISTE

BFA: Biogasfællesanlæg. Større biogasanlæg med indsamling af biomasse fra mange kilder (forskellige industrier samt adskillige landbrug i en region).

CFU: Colony forming unit.

CPE: Cytopatogen effekt;
Celleforandring som er synlig ved direkte mikroskopering af celle-kultur.

Decimeringstid:

Den tid der ved en given behandling kræves for at reducere indholdet af infektivt virus eller levedygtige bakterier (bakterier, der er i stand til at danne en koloni på PCA) til en tiendedel.

Drabsrate:

Den hastighed hvormed en given mikroorganisme bliver inaktiv i betydningen ikke i stand til at danne kolonier på PCA. Subletalt beskadigede beskadigede bakterier vil herved kunne blive beregnet som dræbte, selvom de evt. efter en periode genvinder deres vitalitet.

FS-metoden:

Måling af *Enterococcus faecalis* (tidligere *Streptococcus faecalis*) som kontrolparameter for den patogenreducerende effekt.

HRT: Hydralic Retention Time er den gennemsnitlige opholdstid for biomasse i et biogasanlæg. Denne er væsentlig længere end MGRT, typisk 10-15 dage på BFA.

Inaktiveringshastighed:

Den hastighed hvormed en given mikroorganisme bliver inaktiv, i betydningen ikke-infektiøst eller ikke-levedygtig.

MGRT: Minimum Garantied Rentention Time:

Det mindste tidsrum den må være mellem to ind/udpompninger af biomasse på et biogasanlæg for at sikre, at al biomasse har været behandlet minimum dette antal timer. MGRT kaldes i praksis også holdetiden. Denne er typisk få timer på BFA.

Reduktionstid:

Den tid der kræves for at opnå en given reduktion (feks 4 log-enheder) af infektive virus eller viable (levedygtige) mikroorganismer.

TCID: Tissue cell infektive dose.

(her anvendt i betydningen TCID₅₀): Den mindste dosis som er i stand til at give infektion og forandringer i 50% af de podede celle-kulturer.

LITTERATUR

Albrecht, H. & J. Werkele (1983): Inactivation of vaccinia virus and a bovine enterovirus in aerated pig slurry with special regard to pH, temperature and free ammonia modification during aeration. Agricultural Wastes, 7, p. 39-50.

Angelidaki, I. (1992): "Anaerobic thermophilic biogas process: The effect of lipids and ammonia". Ph.D. Thesis, Dept. of Biotechnology, The Technical University of Denmark.

Angelidaki, I. & B.K. Ahring, (1993): Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: The effect of ammonia. Applied Microbiology and Biotechnology, 38 (1993), pp. 560-564.

Anon. (1991): "Husdyrgødning det største affaldsproblem målt i mængde" MiljøDanmark, 1, 25.

Berg, G. & D. Berman, (1980): Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludges. Applied and Environmental Microbiology, 39, no 2, 361-368.

Bendixen H.J. (1991): Hygiejniserig af gødning og affald. Forsøgsmålinger vedr. smitstofreduktion i biogasfællesanlæg. Delprojekt 4. Veterinær Forskning og rådgivning i forbindelse med etablering og drift af biogasfællesanlæg. Veterinærdirektoratet, 51 sider.

Bendixen, H.J. (1993): Kontrol med smitstoffer ved recycling af biomasse. Dansk Veterinær Tidsskrift, 76, 86-100.

Bendixen, H.J. (1993): "Midtvejsrapport for det Veterinære Følgeprogram.

Bendixen, H.J. (1994): Safeguards against pathogens in Danish biogas plants. Proc. 7th. International Symposium on Anaerobic Digestion, Cape Town, South Africa. 629-638.

Bendixen H.J. & S. Ammendrup (1991): Smittebeskyttelse i biogasfællesanlæg. Rådgivning om forebyggelse af smittespredning og krav til hygiejnisering. Delprojekt 4. Veterinærdirektoratet, 32 sider.

Bennetsen, Olaf & U.S. Mikkelsen (1993): FS-metodens anvendelighed som hygiejnisisk kontrolparameter. Dansk Veterinær Tidsskrift 76, 14, 597-656.

Burge, W.D., W.N. Cramer & K.Kawata (1983): Effect of heat on Virus Inactivation by ammonia. Applied and Environmental Microbiology, 1983, p. 446-451.

Bøtner, A. (1990): Modelstudier vedr. overlevelse af virus i gylle under traditionel opbevaring og under udrådning i biogasanlæg. Delprojekt 1. Veterinær forskning og rådgivning i forbindelse med etablering og drift af biogasfællesanlæg. Statens Veterinære Institut for virusforskning, 64 sider.

Dansk Standard (1983): Vandundersøgelser, prøvetagning, transport og opbevaring.

Deng, M.Y. & D.O. Cliver, (1992): Inactivation of Poliovirus Type 1 in Mixed Human and Swine Wastes and Bacteria from Swine Manure. Applied and Environmental Microbiology, Juni 1992, 2016-2021.

Derbyshire, J.B. & E.G. Brown, (1978): Isolation of animal viruses from livestock waste and water. Journal of Hygiene, Camb., 81, 295-302.

Derbyshire, J.B., H.D. Monteith & E.E. Shannon, (1986): Virological Studies on an Anaerobic Digestion System for Liquid Pig Manure. Agricultural Wastes, 18 (1986), p. 309-312.

Herning Kommunale Værker (1993): Behandling af kildesorteret husholdningsaffald med henblik på energi- og gødningsproduktion i biogasfællesanlæg, 65 sider.

Ilsøe, B. (1992): Smitstofreduktion ved affaldsbehandling: Komposteringsprocessens effekt på patogene mikroorganismer i kildesorteret husholdningsaffald og spildevandsslam. Rapport fra Miljøstyrelsen.

Ilsøe, B. (1993): Smitterisici ved genanvendelse af organisk affald. Dansk Veterinær Tidsskrift, 76, 77-86.

Larsen, H.E., B. Munch & J. Schuldt (1993): Overvågning af smitstofreduktion i biogasfællesanlæg. Dansk Veterinær Tidsskrift, 76, 100-106.

Lund, E., B. Lydholm & A.L. Nielsen, (1983): The Fate of viruses during sludge stabilization especially during termophilic digestion. In: Bruce, A.M., Havelaar, A.H. & L. Hermite, P. (Eds.): Disinfektion of Sewage Sludge: Technical, Economic and Microbiological Aspects. Proceedings of a Workshop. Afholdt i Zürich, 11.-13. Maj, 1982.

Lund, E., B. Lydholm & A.L. Nielsen, (1984): Demonstration of Viruses in treated Wastewater, Sludges and Liquid Manures. Monogr. Virol., 15, 87-96.

Lydholm, B. & A.L. Nielsen, (1981): The use of a soluble polyelectrolyte for the isolation of virus in sludge. In Viruses and wastewater treatment. M. Goddard & M. Butler (eds.). Pergamon Press, Oxford.

McKain, N. & P.N. Hobson, (1987): A Note on the Destruction of Porcine Enteroviruses in Anaerobic Digestions. Biological Wastes, 22, 147-155.

Monteith, H.D., E.E. Shannon, & J.B. Derbyshire, (1986): The inactivation of a bovine enterovirus and a bovine parvovirus in cattle manure by anaerobic digestion, heat treatment, gammairradiation, ensilage and composting. - Journal of Hygiene, Camb., 97, 175-184.

Munch, B. & A.B. Larsen, (1990): Delprojekt 2 (VET-BIO-2): forsknings- og overvågningsprogram for biogasfællesanlæg. SVS og KVL, 187 sider.

Nordisk Metodikkomite for levnedsmidler (1992): Bestemmelse af enterococcus i levnedsmidler. UDC 576.851.21.

Mateu, A., J. Mata-Alvarez & R. Pares, (1992): Enterobacterial and viral decay experimental models for anaerobic digestion of piggery waste. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 291-296.

Metodeforslag til Dansk Standard (1993): Miljøbiologisk undersøgelse af fæcale streptococcer i biomasser ved pladespredningsmetode.

Metzler, A.E. (1993): Virusinactivation during anaerobic fermentation of source seperated waste. Foredrag holdt på IEA-biogasgruppemødet 4. okt, 1993. Arbeitsgruppe fur Umvelthygiejne, Veterinamedinishe Fakultät, Universität Zürich, Schweitz. Upubliceret.

Nichelsen, C. et al. (1993): Bathing Water Microbiological Control. Rapport for DK-EPA, p. 9-24.

Sellers, R.F.(1980): Absolute safety. CEC. Communicable diseases resulting from storage, handling, transport and landspreading of manures. 4.-6. November. Ed.: Walton, J.R. & White, E.G.

Srivistava, R.N. & E. Lund, (1980): The stability of bovine parvovirus and its possible use as an indicator for the persistence of enteric viruses. Water Research, 14, 1017-1021.

Strauch & Carrington, (1992): Hygienic aspects related to treatment and sanitary aspects of slurries and manures. In : Treatment and use of sewage sludge and liquid wastes. Review of COST 68/681 programmet 1972-1990. J.L. Hall, P.L L'Hermitte & P.J. Newman (eds.)

Traub, F., S.K. Spillmann & R. Wyler, (1986): Method for Determining Virusinactivation during Sludge Treatment Process. Applied and Environmental Mikrobiology, Sept. 1986, 498-503.

Tafdrup, S. (1994): Centralized biogas plants combine agricultural and environmental benefits with energy production. Proc. 7th. International Symposium on Anaerobic Digestion, Cape Town, South Africa. 460-468.

Ward, R.L., C.S. Ashley & R.H. Moseley, (1976): Heat Inactivation of Poliovirus in Wastewater Sludges. Applied and Environmental Microbiology, 32, no 3 (Sept.1976), pp. 339-346.

Ward, R.L. & Ashley, C.S., (1977): Identification of the Virucidal Agent in Wastewater Sludges. Applied and Environmental Microbiology, 33, no 4 (april 1977), pp. 860-864.

