

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for miljøvitenskap og teknologi
Institutt for matematiske realfag og teknologi

Masteroppgave 2015
30 studiepoeng

Inaktivering av virus ved pasteurisering av svartvann fra Røde Kors' feltsykehus

Inactivation of Viruses by Pasteurisation of
Blackwater from Red Cross' Field Hospitals

Torbjørn Friborg

Sammendrag

Etter store katastrofer følger det ofte en akutt mangel på rent drikkevann og gode sanitære forhold, som fører til spredning av overførbare sykdommer. I denne oppgaven ble en prototype av et hygieniseringsanlegg som pasteuriserer svartvann (toalettløp) fra Røde Kors' feltsykehus testet. I forsøkene ble *Salmonella typhimurium* fag 28b (*S.t.28b*) og ϕ X174 brukt som modellvirus for patogene enteriske virus.

Hygieniseringsanlegget ble testet tre ganger med tilsetning av *S.t.28b* og to ganger med ϕ X174. Svartvann ble hentet fra et kildeseparerende avløpssystem på NMBU.

Hygieniseringsanlegget brukte 95 – 130 minutter på å varme opp 100 liter svartvann til 73 °C. *S.t.28b* ble ikke inaktivert i disse forsøkene. ϕ X174 ble inaktivert med minst 6 log₁₀.

Resultatene viser at partikler i svartvannet påvirker inaktiveringsprosessen negativt.

Basert på utførte forsøk og publiserte data for varmetoleransen til ulike enteriske virus, anbefales det at hygieniseringsanlegget varmer opp svartvannet til 70 °C og holder denne temperaturen i 30 minutter, for å oppnå god hygienisering av svartvannet. Det ble avdekket flere områder hvor hygieniseringsanlegget har forbedringspotensiale. Foreslåtte forbedringer er blant annet å implementere omrøring eller en sirkulasjonspumpe for å unngå sedimentering av partikler i tanken og å rette opp feil i temperaturmålingen.

Varmetoleransen til *S.t.28b* og ϕ X174 ble testet i labskala hygieniseringsforsøk under konstant temperatur (60, 70 og 80 °C). *S.t.28b* inaktiveres sakte i svartvann, selv ved 80 °C. *S.t.28b* anbefales derfor ikke som modellvirus for virus som lar seg inaktivere av temperaturer under 80 °C i pasteurisering av svartvann. ϕ X174 ble inaktivert med 4 log₁₀ i svartvann og 2 log₁₀ i springvann etter 90 minutter ved 60 °C. Ved 70 og 80 °C ble ϕ X174 inaktivert til under deteksjonsgrensen under oppvarmingen (minst 6 log₁₀ reduksjon). Tidligere studier har vist at ϕ X174 er mer varmetolerant enn mange humane enteriske virus. Resultatene i denne oppgaven bekrefter ϕ X174s posisjon som et varmetolerant virus, og ϕ X174 foreslås som modellvirus i pasteuriseringsforsøk.

Hygieniseringsanlegget oppfyller Røde Kors' behov for hygienisering av svartvannet fra feltsykehus. Dette anlegget er et viktig bidrag i jobben mot spredning av avløpsrelaterte, overførbare sykdommer i etterkant av en katastrofesituasjon. Anlegget kan også benyttes av andre organisasjoner som ønsker å hygienisere toalettløp lokalt.

Abstract

In emergencies, there is often an acute shortage of safe drinking water and proper sanitation, leading to the spread of communicable diseases. A prototype of a hygienisation unit, which is planned to pasteurise blackwater from Red Cross' field hospitals, was tested. *Salmonella typhimurium* phage 28b (*S.t.28b*) and ϕ X174 was used as model viruses for pathogen enteric viruses.

The hygienisation unit was tested three times with *S.t.28b* and twice with ϕ X174. Blackwater was taken from a source separating sewage system at NMBU. The hygienisation unit used 95 – 135 minutes to heat 100 litres of blackwater to 73 °C. However, *S.t.28b* was not inactivated in these experiments. ϕ X174 was inactivated by at least 6 log₁₀. Results show that particles in the blackwater affect the inactivation process negatively.

Based on the experiments conducted and published data for the heat tolerance of different enteric viruses, it is recommended that the hygienisation unit heat the blackwater to 70 °C. This temperature should be kept for 30 minutes to achieve good sanitation of the blackwater. Several areas where the hygienisation unit has potential for improvements were revealed. Suggested improvements include implementing stirring or a circulating pump to prevent sedimentation of particles in the tank, and to correct errors in temperature measurement.

Heat tolerance for *S.t.28b* and ϕ X174 was tested in laboratory scale hygienisation experiments under constant temperature (60, 70 and 80 °C). *S.t.28b* was inactivated slowly in blackwater, even at 80 °C. *S.t.28b* is therefore not recommended as model virus for viruses that are inactivated in blackwater by temperatures below 80 °C. ϕ X174 was inactivated by 4 log₁₀ in blackwater and 2 log₁₀ in tapped water after 90 minutes at 60 °C. At 70 and 80 °C, ϕ X174 was inactivated below detection limit during heating phase (at least 6 log₁₀ reduction). ϕ X174 has been reported as more heat tolerant than human enteric viruses, and the experiments conducted confirms that ϕ X174 is a heat tolerant virus. ϕ X174 is suggested as a suitable model virus in further pasteurisation experiments.

The hygienisation unit meets Red Cross' need for sanitation of blackwater from their field hospitals. This unit is an important contribution to the work against the spread of sewage-related, communicable diseases in the aftermath of a disaster situation. The unit may also be used by other organisations that wish to sanitize blackwater locally.

Forord

Denne oppgaven er skrevet våren 2015, og er det avsluttende arbeidet i min mastergrad i vann- og miljøteknikk på NMBU. Hovedveileder har vært Arve Heistad, og Melesse Eshetu Moges har vært biveileder.

Jeg ble interessert i denne oppgaven allerede høsten 2013, fordi den handler om et praktisk problem, og oppgavens resultater vil bli brukt til videreutvikling av et produkt som kan bidra til å hindre spredning av overførbare sykdommer i katastrofesituasjoner. Deler av oppgaven er utført på oppdrag fra A-Aqua, og startet i november 2014. Fordi vi gikk raskt i gang med forsøk i fullskala, visste vi ikke hva vi kunne forvente. På grunn av dette vet vi nå kanskje mer enn det vi hadde visst om alle forsøk hadde vært gjort i riktig rekkefølge. Det har vært spennende å bidra med ny kunnskap inn i et felt som er lite utforsket pr. i dag.

Målgruppen for denne oppgaven er ingeniører og andre som arbeider med sanitærforhold i utviklingsland og katastrofesituasjoner. Jeg håper at oppgaven kan sette hygienisering av svartvann på dagsorden, og at det forskes videre på dette.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere, Arve Heistad og Melesse Eshetu Moges; dere har begge har lært meg mye. Takk til Melesse Eshetu Moges, Fasil Ejigu Eregno, Vegard Nilsen, Torbjørn Søndena og Maria Backe for god hjelp med forsøkene. Rannei Tjåland, Else Marie Aasen og Jon Fredrik Hansen på IKBM har bistått med laboratorie plass, materialer, og veiledning, og fortjener en stor takk for det. Takk til Mette Myrmell, som donerte $\phi X174$. Takk til Vegard Nilsen, Anne Willumsen, Magnus Reiakvam, Marie Rødsten Sagen og Birgitte Brennhovd for gode innspill under arbeidet og oppgaveskrivingen.

Til slutt en stor takk til Ingrid og Elias. Takk for at dere har vært tålmodige med meg denne våren, og hjulpet meg med å holde motet oppe.

Torbjørn Friborg

Ås, 15.5.2015

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	I
Abstract	II
Forord	III
Innholdsfortegnelse	IV
Ordforklaringer.....	VII
Liste over forkortelser	VII
Liste over figurer	VIII
Liste over tabeller.....	IX
1. Introduksjon	1
1.1 Avløpsvann og katastrofesituasjoner	1
1.1.1 Sykdomsutbrudd i katastrofesituasjoner	1
1.1.2 Røde Kors' utfordringer	2
1.2 Avløpsvann	4
1.2.1 Avføringsrelaterte patogene mikroorganismer og sykdommer.....	4
1.2.2 Enteriske virus	7
1.2.3 Sykehusavløp	8
1.2.4 Svartvann.....	8
1.3 Modellorganismer.....	9
1.3.1 Indikator- og modellorganismer brukt i forbindelse med avløpsvann	9
1.3.2 <i>Salmonella typhimurium</i> fag 28b	11
1.3.3 ϕ X174.....	11
1.4 Pasteurisering.....	12
1.4.1 Inaktiveringskinetikk.....	13
1.4.2 Faktorer som påvirker termisk inaktivering	15
1.4.3 Termisk inaktivering av enteriske virus	16
1.5 Sonikering.....	18
1.6 Mål for oppgaven.....	19
1.6.1 Problemstilling	20
2 Materialer og metode	21
2.1 Materialer.....	22
2.1.1 Svartvann og springvann	22
2.1.2 Hygieniseringsanlegget	24
2.2 Formler og statistiske analyser	25
2.2.1 Inaktivering	25

2.2.2	Viruskonsentrasjon i prøver	26
2.2.3	Deteksjonsgrense.....	26
2.3	Fullskala hygieniseringsforsøk	27
2.4	Labskala hygieniseringsforsøk	31
2.5	Sonikeringsforsøk.....	32
2.6	Virusanalyse <i>S.t.28b</i>	33
2.6.1	Vertskultur.....	33
2.6.2	Propagering	33
2.6.3	Virustelling.....	35
2.7	Virusanalyse ϕ X174	36
2.7.1	Vertskultur.....	36
2.7.2	Propagering	36
2.7.3	Virustelling.....	37
2.8	Tørrstoffanalyser	39
2.8.1	Totalt tørrstoff	39
2.8.2	Suspendert tørrstoff	39
2.8.3	Flyktig suspendert tørrstoff	40
3	Resultater.....	41
3.1	Fullskala hygieniseringsforsøk	41
3.1.1	Temperatur	41
3.1.2	Forsøk med <i>S.t.28b</i>	42
3.1.3	Forsøk med ϕ X174.....	43
3.2	Labskala hygieniseringsforsøk	46
3.2.1	Forsøk med <i>S.t.28b</i>	46
3.2.2	Forsøk med ϕ X174.....	48
3.3	Sonikeringsforsøk.....	50
4	Diskusjon.....	51
4.1	Fullskala hygieniseringsforsøk	51
4.1.1	Temperatur	51
4.1.2	Forsøk med <i>S.t.28b</i>	52
4.1.3	Forsøk med ϕ X174.....	52
4.2	Labskala hygieniseringsforsøk	54
4.2.1	Forsøk med <i>S.t.28b</i>	55
4.2.2	Forsøk med ϕ X174.....	57
4.3	Sonikering.....	59
4.4	Oppsummering forsøk	60
4.4.1	Inaktiveringskinetikk og modeller.....	60

4.4.2	Sammenligning av full- og labskala.....	61
4.5	Drift av hygieniseringsanlegget.....	62
4.5.1	Anbefaling for drift	62
4.5.2	Risikovurdering	65
4.5.3	Energiforbruk	66
4.5.4	Sluttdisponering	66
4.6	Veien videre.....	67
4.6.1	Forbedringspotensialer	67
4.6.2	Et ekstra rensetrinn.....	68
4.6.3	UASB-reaktor.....	69
5	Konklusjon	71
6	Kilder.....	73
	Vedlegg A – Beskrivelse av materialer til S.t.28b	i
	Vedlegg B – Beskrivelse av materialer til φX174.....	ii
	Vedlegg C – Primærdata for fullskala hygieniseringsforsøk	iv
	Vedlegg D – Primærdata for labskala hygieniseringsforsøk.....	viii
	Vedlegg E – Primærdata for sonikeringsforsøket	xi

Ordforklaringer

Enterisk	Stammer fra mage/tarm-kanalen
Endemisk	Stedegen
Endemisk sykdom	Sykdom som har en hyppigere forekomst innenfor et begrenset geografisk område enn andre steder
Fekal	Har sammenheng med avføring
Indikatororganisme /-virus	Organisme/virus som er naturlig forekommende i avløpsvann og som brukes for å påvise fekal forurensing
Modellorganisme /-virus	Organisme/virus som tilsettes avløpsvannet for å studere hva som skjer med en gruppe organismer/virus med liknende egenskaper
Patogen	Sykdomsfremkallende
Svartvann	Avløpsvann fra toaletter

Liste over forkortelser

ATCC	American Type Culture Collection
cfu	Koloniformende enheter (colony forming units)
DNA	Deoksyribonukleinsyre (deoxyribonucleic acid) (arvemateriale)
KPG	Kjøtt Pepton Gjær (agar og næringsmedium)
MSA	Modified Scholtens' agar
MSB	Modified Scholtens' broth (næringsmedium)
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
pfu	Plakkformende enheter (plaque forming units)
QMRA	Kvantitativ mikrobiell risikovurdering (quantitative microbial risk assessment)
RNA	Ribonukleinsyre (ribo nucleic acid) (arvemateriale)
<i>S.t.28b</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> fag 28b
UASB	Oppadstrømmende anaerob slamteppe (Upflow anaerobic sludge blanket) (reaktor)

Liste over figurer

Figur 1.1: Fekal-orale smitteveier (F-diagram).....	7
Figur 1.2: Termisk inaktivering av ulike patogene mikroorganismer i laboratorieforsøk (Strauch 1998 i Carrington 2001).....	18
Figur 2.1: Illustrasjon av rekkefølgen forsøkene har blitt utført i (fra øverst til nederst).	21
Figur 2.2: Illustrasjon av innsamlings- og overføringsystemet mellom Kaja Studentboliger og vann- og avløpslaboratoriet ved IMT, Fløy IV, NMBU.	23
Figur 2.3: Hygieniseringsanlegget sett forfra.....	24
Figur 2.4: Sirkulasjonspumpa som ble brukt. Innløpet var ca. 2 cm fra bunnen, utløpet var ca. 10 cm under vannoverflaten.....	28
Figur 2.5: Stang og slange som ble benyttet til prøvetaking. Det røde merket viser hvor høyt stangen skulle løftes for å ta prøver av øverste prøvepunkt.	28
Figur 2.6: Illustrasjon av tanken i hygieniseringsanlegget med mål.....	29
Figur 3.1: Temperatur i hygieniseringsanlegget (målt med anleggets egen temperaturføler) som funksjon av tiden for alle fem gjentak.	42
Figur 3.2: Viruskonsentrasjon (<i>S.t.28b</i>) som funksjon av tid i hygieniseringsanlegget.....	43
Figur 3.3: Temperatur og viruskonsentrasjon (ϕ X174) i hygieniseringsanlegget som funksjon av tiden under første gjentak med ϕ X174.	44
Figur 3.4: Totalt tørrstoff (TS) og suspendert tørrstoff (SS) i prøvene som funksjon av tiden under første gjentak med ϕ X174.....	44
Figur 3.5: Temperatur og viruskonsentrasjon (ϕ X174) i hygieniseringsanlegget som funksjon av tiden under andre gjentak med ϕ X174.	45
Figur 3.6: Totalt tørrstoff (TS) og suspendert tørrstoff (SS) i prøvene som funksjon av tiden under andre gjentak med ϕ X174.	45
Figur 3.7: Termisk inaktivering av <i>S.t.28b</i> ved 60 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 60 °C.	46
Figur 3.8: Termisk inaktivering av <i>S.t.28b</i> ved 70 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 70 °C.	47
Figur 3.9: Termisk inaktivering av <i>S.t.28b</i> ved 80 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 80 °C. Ved -7 min var temperaturen i prøven 60 °C. Punktet som ligger på førsteaksen (tid=15 min) har verdi under deteksjonsgrensen. ..	48

Figur 3.10: Termisk inaktivering av ϕ X174 ved 60 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 60 °C.	49
Figur 3.11: Viruskonsentrasjon som funksjon av sonikeringstid, to gjentak for hver tid. Merk at andreaksen ikke er logaritmisk.	50
Figur 4.1: Termisk inaktivering av ϕ X174 ved 60 °C med modeller for Svartvann 1 og Springvann. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 60 °C.	59
Figur 4.2: Prinsippskisse av UASB-reaktor (Tilley et al. 2014 s. 122).	70

Figurer i Vedlegg D:

Figur D - 1: Termisk inaktivering av ϕ X174 ved 70 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 70 °C. Punkt som ligger på førsteaksen har verdier under deteksjonsgrensen.	x
Figur D - 2: Termisk inaktivering av ϕ X174 ved 80 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 80 °C. Ved -10 min var temperaturen i prøven 60 °C. Punkt som ligger på førsteaksen har verdier under deteksjonsgrensen.	x

Liste over tabeller

Tabell 1.1: Eksempler på patogene mikroorganismer som kan komme fra menneskelig avføring, med tilhørende sykdommer og symptomer (Tilpasset fra: Heistad 2008; Schönning & Stenström 2004; Strande et al. 2014; World Health Organization 2006)	5
Tabell 2.1: Prøvetakingsregime for lab skala hygieniseringsforsøk. Tiden måles fra prøvene når ønsket temperaturintervall.	31
Tabell 3.1: Inaktiveringsparametere for <i>S.t.</i> 28b i springvann ved 70 og 80 °C.	48
Tabell 3.2: Inaktiveringsparametere for ϕ X174 i to gjentak med svartvann og ett med springvann ved 60 °C.	50
Tabell 4.1: 95 % konfidensintervall for D-verdi (minutter) for ϕ X174 (basert på tall fra Bertrand et al. 2012). n er antall studier verdiene er basert på.	58
Tabell 4.2: 95 % konfidensintervall for gjennomsnittlig D-verdi (t_{90}) (minutter) ved 70 °C, basert på data fra Bertrand et al. (2012). n er antall studier verdiene er basert på.	63

1. Introduksjon

En akutt mangel på rent drikkevann og dårlige sanitære forhold følger ofte i kjølvannet av store katastrofer. Dette er en av hovedårsakene til spredning av overførbare sykdommer i slike situasjoner. Å sørge for at ubehandlet avløpsvann ikke slippes ut til ytre miljø er en viktig måte å forhindre smitte på.

I denne oppgaven er en prototype av et hygieniseringsanlegg som pasteuriserer svartvann testet. Anlegget er tenkt brukt for å hygienisere toalettavløp fra Røde Kors' feltsykehus. I forsøkene er *Salmonella typhimurium* fag 28b (S.t.28b) og φX174 brukt som modellvirus for patogene enteriske virus.

1.1 Avløpsvann og katastrofesituasjoner

1.1.1 Sykdomsutbrudd i katastrofesituasjoner

Høy befolkningstetthet i midlertidige bosetninger, utilstrekkelige hygiene- og sanitærforhold og dårlig vannforsyning er hovedårsakene til den økte forekomsten av overførbare sykdommer etter katastrofesituasjoner (Noji, E. K. 2005). Det er derfor viktig med gode løsninger for vann og avløp i katastrofesituasjoner for å motvirke spredning av smittsomme sykdommer.

Det er en etablert misforståelse at katastrofer vil føre til store epidemier av smittsomme sykdommer i dagene, ukene og månedene etterpå (Lemonick 2011). Med katastrofer menes for eksempel humanitære katastrofer (epidemier, krig og voldelige opprør) og naturkatastrofer (jordskjelv, tsunami, vulkanutbrudd og flom). Utviklingsland er mer sårbare for katastrofer, fordi de mangler ressurser, infrastruktur, medisinsk nødhjelp og katastrofehandlings-systemer til å takle katastrofen (Watson et al. 2007). Sykdomsutbruddene etter en katastrofe gjenspeiler som regel den endemiske (stedegne) sykdomssituasjonen i befolkningen før katastrofen. Sykdommer som er endemiske før katastrofen vil spres, men det er lite sannsynlig at nye sykdommer dukker opp (unntak kan forekomme).

Risikoen for overføring av smittsomme sykdommer i kjølvannet av en katastrofesituasjon vil være mest avhengig av størrelsen og karakteristikken av befolkningen som har måttet flytte på seg (Noji, Eric K. 2005). Forflytninger av mennesker øker trykket på vann- og matforsyninger og grunnleggende helsehjelp, og øker risikoen for kontaminering av drikkevann. Faktorer som påvirker hvor store konsekvenser dette får for befolkningen er tilgang på rent drikkevann, sanitære forhold, mat, helsetjenester og immunitet mot vaksine-

forebyggende sykdommer (som meslinger og polio). Eksempler på vannbårne sykdommer som spres etter katastrofer er kolera, diaré, dysenteri, kryptosporidiose, gastroenteritt, salmonellose, tyfoidfieber, hepatitt A og E og schistosomiasis.

Det er som regel i perioden fra noen dager til noen uker etter katastrofen (post-disaster phase) at luftbårne, matbårne, vannbårne og vektorbårne sykdommer spres i størst grad (Lemonick 2011). Faren for smitte fra døde kropp er liten, spesielt dersom dødsårsaken var traume (krig, ulykke, naturkatastrofe), men kan være vesentlig dersom dødsårsaken var sykdom som tar liv, for eksempel kolera eller ebola (Noji, Eric K. 2005). De overlevende utgjør som regel en større smitterisiko enn døde kropp.

Det er likevel mulig at sykdommer som ikke er endemiske introduseres i et katastrofeområde. Det mest kjente tilfellet er kanskje koleraepidemien i Haiti, som startet i oktober 2010, ti måneder etter jordskjelvet i januar 2010. Epidemien har til nå ført til mer enn 700.000 smittede og 8.500 døde (Pan American Health Organization 2014). Undersøkelser har vist at utbruddet stammet fra en base for nepalske FN-soldater (Cravioto et al. 2011). Avløpsvann fra leiren forurenset elven Artibonite, som ble brukt som drikkevannskilde av befolkningen lenger nede. I sin rapport foreslår Cravioto et. al. at FN-styrker som hjelper til i et katastrofeområde må ha løsninger som hygieniserer toalettavløp, for å unngå liknende hendelser i fremtiden.

1.1.2 Røde Kors' utfordringer

Den internasjonale Røde Kors- og Røde Halvmånebevegelsen (omtales fra nå av som Røde Kors) er en internasjonal humanitær organisasjon som har nesten 100 millioner frivillige og ansatte verden over og arbeid i alle verdens land (Røde Kors 2011). Arbeidet er lokalt forankret i 186 nasjonale foreninger. Et av arbeidsområdene til Røde Kors er nødhjelp i katastrofesituasjoner. Arbeidet koordineres av Den internasjonale Røde Kors- og Røde Halvmånebevegelsen (katastrofer som ikke skyldes krig) eller Den internasjonale Røde Kors komiteen (krigssituasjoner), men utføres i stor grad av utsendinger fra de nasjonale Røde Kors-foreningene.

Hovedbjelken i det internasjonale nødhjelpsarbeidet er *Emergency Response Units (ERU)* (IFRC 2014). Nasjonale Røde Kors-foreninger bidrar med standardisert utstyr og trent personell, som raskt kan sendes til katastrofeområdet. Det finnes ulike typer ERUer, for eksempel logistikk, vann- og sanitærløsninger, basecamp (husly for personell) og helsetjenester (grunnleggende helsehjelp, feltsykehus og mobile klinikker). Røde Kors Norge

har spesialisert seg på medisinsk nødhjelp og tilhørende støttefunksjoner, i form av teltbaserte feltsykehus (Internasjonal avdeling 2014). I et lager på Gardermoen står feltsykehus og klinikker i forskjellige størrelser. Det største feltsykehuset har opptil 200 sengeposter og det minste, som ligner mer på en medisinsk poliklinikk, har 10 sengeposter. Sammen med feltsykehusene sendes det husly for personell, medisiner, mat og drikke for opptil fire måneder. Det er ikke bare fra Oslo det sendes ERUer; Røde Kors har lagre over hele verden (IFRC 2014).

Uansett størrelse trenger feltsykehusene en toalettløsning. Måten Røde Kors håndterer avløp på vil være avhengig av de lokale forholdene. Det er stor variasjon i hvor mye infrastruktur som finnes i områdene hvor Røde Kors opererer. Under noen katastrofer kan infrastrukturen være tilnærmet upåvirket, for eksempel under ebolaepidemien i Vest-Afrika. Det vil da være mye lettere å kvitte seg med avløpsvann på en god måte, enn under naturkatastrofer, hvor det meste av infrastrukturen er ødelagt. Som regel er infrastrukturen i områdene der Røde Kors setter opp feltsykehus dårlig, og eksisterende sanitærløsninger er gjerne ødelagte (Bolleurs 2015). I sjeldne tilfeller kan man benytte eksisterende toaletter i området, for eksempel om det er en idrettsarena eller annet stort bygg i nærheten av sykehuset.

Feltsykehusene kan utstyres med vakuumpoletter fra JetsTM ved behov. Toalettene bruker omtrent 1 liter vann pr. spyling. I følge Bolleurs (2015) eksisterer det få gode løsninger for avløpsvannhåndtering som Røde Kors kan benytte i katastrofesituasjoner. Toalettavløpet (svartvannet) samles derfor i en tett tank. Størrelsen på tanken varierer etter størrelsen på feltsykehuset, men kan være opp til 5 m³. Røde Kors finner så en lokal slamkjører som kan tømme tanken. De sjekker alltid at slamkjøreren har de nødvendige lokale tillatelsene til å gjøre denne typen arbeid. Hittil har det alltid løst seg med å finne en som kan kjøre, ifølge Bolleurs (2015). Avløpet fraktes til et behandlingsanlegg eller lagringsplass. En slik lagringsplass kan være et jorde eller en stor grop, som flere organisasjoner går sammen om. Avløpet behandles da med brent kalk (CaO). Etter tyfonen Haiyan i Filippinene (november 2013) satte UNICEF opp et slikt hull for alle organisasjoner.

Om det eksisterer et avløpsnett, sendes gråvannet til dette. Dersom det ikke er mulig, slippes gråvannet ut på et egnet sted. Som regel har naturkatastrofene bare ødelagt overbygningene (toaletter, renselanlegg, hus osv.), mens eventuelle rørsystemet er noenlunde intakt (Bolleurs 2015).

Det er i hovedsak syke mennesker som oppsøker feltsykehusene, og disse er ekstra utsatt for smitte av to årsaker: redusert immunforsvar og sår i huden (Tortora et al. 2013 s. 430).

Brannsår, operasjonssår og traumer (skader) er alle svakheter i de i utgangspunktet sterke barrierene mot patogene mikroorganismer som huden og slimhinner utgjør. Syke mennesker kan også ha en høyere konsentrasjon av patogene mikroorganismer i avføringen enn friske mennesker.

En av grunnene til at virus er fokuset i denne oppgaven er ebolaepidemien i Vest-Afrika i 2014 – 2015. I forbindelse med denne epidemien har et av Røde Kors Norges feltsykehus vært stasjonert i Sierra Leone. Røde Kors har derfor et ønske om at hygieniseringsanlegget er i stand til å inaktivere ebolavirus.

Det er viktig å ha gode løsninger for behandling av avløpsvann fra feltsykehusene. Røde Kors Norge har lenge ønsket å ha bedre kontroll på svartvannet. Målet er å sørge for en forsvarlig sluttdisponering av svartvann, som ikke påfører ytre miljø og mennesker skade. Hygienisering av svartvannet vil redusere risikoen for smitte til personer som oppholder seg i nærheten av sykehusene og den endelige deponeringsplassen. Røde Kors Norge har derfor tatt initiativet til å se på en løsning for å klare dette. De har samarbeidet med Røde Kors Sverige og A-Aqua, og sammen kommet frem til at varmebehandling er den foretrukne hygieniseringsmetoden for svartvann.

1.2 Avløpsvann

1.2.1 Avføringsrelaterte patogene mikroorganismer og sykdommer

Avløpsvann kan inneholde mange sykdomsfremkallende mikroorganismer. Tilstedeværelsen skyldes at individer er smittet, selv om dette ikke nødvendigvis gir utslag i symptomer hos den enkelte. Hvilke patogene mikroorganismer som finnes i avløpsvannet er derfor avhengig av den aktuelle sykdomsbelastningen.

Avføringsrelaterte sykdommer overføres via patogene mikroorganismer som slippes ut i avføringen til syke mennesker eller dyr. Det finnes en stor mengde ulike patogene mikroorganismer i avløpsvann. De fleste av disse vil forårsake gastrointestinale symptomer (symptomer som er relatert til magen og tarmene), som diaré, kvalme og magesmerter. De patogene mikroorganismene kan komme inn i en ny vert gjennom munnen eller huden (for

eksempel innvollsormer). De fleste patogene mikroorganismer i avløpsvann kommer fra avføring; det er få organismer som skilles ut i urinen (Stenström et al. 2011 s. 2).

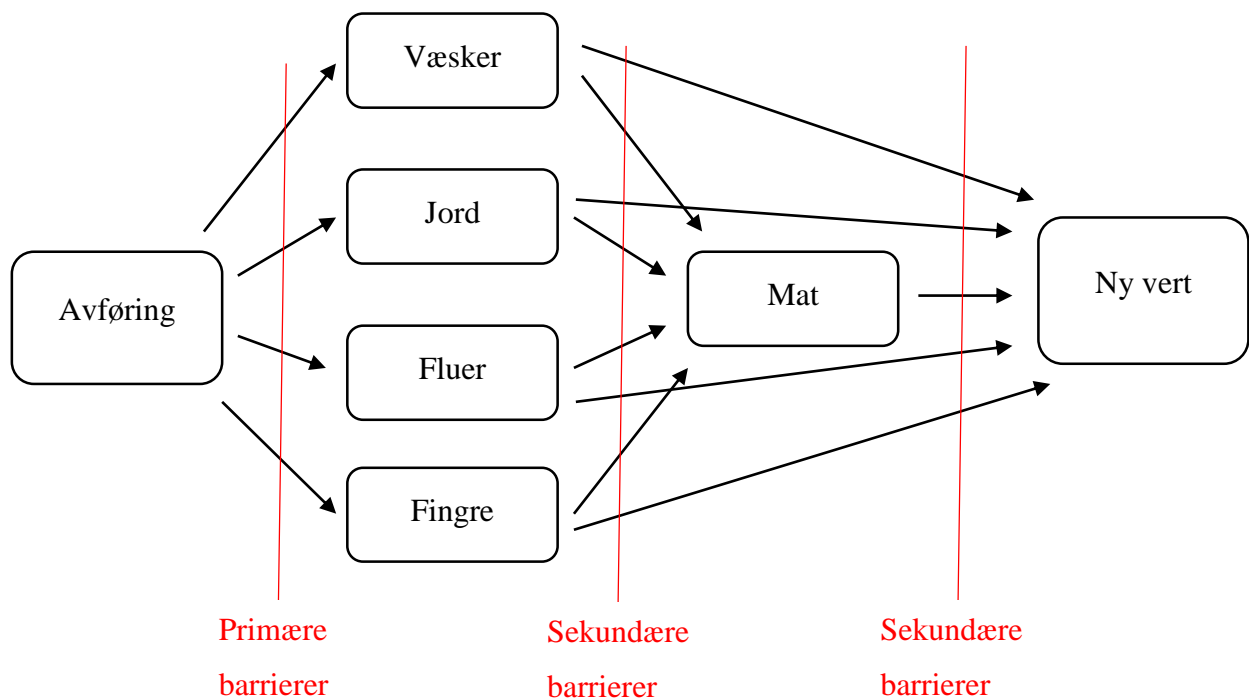
En oversikt over de patogene mikroorganismene, med tilhørende sykdommer og symptomer, som er mest vanlig i menneskelig avføring er gitt i Tabell 1.1. Det er vanlig å dele dem i fire grupper: bakterier, virus, parasittiske protozoer og helminter. De patogene mikroorganismene som lever lenge i miljøet, har lav infeksjonsdose, utløser liten eller ingen immunitet hos mennesker og har lang inkubasjonstid er de som mest sannsynlig vil forårsake infeksjoner gjennom vannbåren smitte (Stenström et al. 2011 s.5).

Tabell 1.1: Eksempler på patogene mikroorganismer som kan komme fra menneskelig avføring, med tilhørende sykdommer og symptomer (Tilpasset fra: Heistad 2008; Schönning & Stenström 2004; Strande et al. 2014; World Health Organization 2006)

Gruppe	Mikroorganisme	Sykdom og symptomer
Bakterier	<i>Aeromonas</i> spp.	Gastroenteritt – magesmerter, kramper, diaré, dehydrering og feber; Guillain-Barré-syndrom
	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	Campylobakterinfeksjon – diaré, kramper, magesmerter, feber, kvalme
	<i>Escherichia coli</i> (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC)	Gastroenteritt – magesmerter, kramper, diaré, dehydrering og feber
	<i>Pleisimonas shigelloides</i>	Gastroenteritt – magesmerter, kramper, diaré, dehydrering og feber
	<i>Salmonella typhi/paratyphi</i>	Tyfoid-/paratyfoidgeber – hopepine, feber, allmenn sykdomsfølelse, anoreksi, forstoppelse, bradykardi, splenomegali, hoste
	<i>Salmonella</i> spp.	Salmonellose – diaré, feber, magekramper
	<i>Shigella</i> spp.	Shigellose – dysenteri (blodig diaré), oppkast, kramper, feber; Reiters sykdom – artritt, konjunktivitt, uretritt
	<i>Vibrio cholerae</i>	Kolera – vanntynn diaré, stort væsketap, dødelig om alvorlig og ubehandlet
	<i>Yersina</i> spp.	Yersinose – diaré, feber, magesmerter, leddsmerter, utslett
Virus	Enterisk adenovirus 40 og 41	Gastroenteritt – magesmerter, kramper, diaré, dehydrering og feber
	Adenovirus (flere typer)	Luftveisinfeksjoner, øyeinfeksjoner
	Astrovirus, Calicivirus (inkludert norovirus), Rotavirus	Gastroenteritt – magesmerter, kramper, diaré, dehydrering og feber
	Coxsackievirus (A og B)	Coxsackievirusinfeksjon – infeksjon i for eksempel munn, svelg, muskulatur, hjernehinne (meningitt), lungesekk, og hjerte; Luftveisinfeksjoner; Gastroenteritt
	ECHO-virus	Aseptisk meningitt – hodepine, kvalme, svimmelhet, lysskyhet og nakkestivhet; encefalitt – ofte uten symptomer, men sterke psykiske forstyrrelser forekommer
	Hepatitt A-virus, Hepatitt E-virus	Hepatitt – infeksjon i leveren, feber, allmenn sykdomsfølelse, anoreksi, kvalme, magesmerter, gulsott

Gruppe	Mikroorganisme	Sykdom og symptomer
	Poliovirus	Poliomyelitt – ofte asymptomatisk, feber, kvalme, oppkast, hodepine, lammelser
	Parechovirus	Parechovirusinfeksjon – gastroenteritt, luftveisinfeksjon, meningitt, encefalitt og neonatal sepsis. Infiserer som regel bare små barn
Parasittiske protozoer	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Kryptosporidiose – vanntynn diaré, magekramper og - smerte
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Ofte asymptomatisk; diaré og magesmerter
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Amøbedysenteri – blodig diaré, feber, nedsatt almenntilstand, men ofte asymptomatisk
	<i>Giardia intestinalis</i>	Giardiasis – diaré, magesmerter, vekttap, allmenn sykdomsfølelse
Helminter (innvollsormer)	<i>Ascaris lumbricoides</i> (rundorm)	Ascariasis – generelt asymptomatisk, tung pust, hosting, feber, forstoppelse
	<i>Trichuris trichiura</i> (piskeorm)	Trichuriasis – generelt asymptomatisk, diaré hos små barn
	<i>Ancylostoma duodenale/Necator americanus</i> (hakeorm)	Ankylostomiasis – blodmangel, magesmerter, diaré; hakeorminfeksjon – ofte asymptomatisk, diaré og jernmangelanemi
	<i>Schistosoma</i> spp. (blodsnyltere)	Schistosomiasis (bilharzia)– kløe, betennelser i urinblæren, urinveier, tykktarmsveggen, fibrose, blodig diaré, blodig urin

Avføringsrelaterte sykdommer kan spre seg på mange måter. En vanlig måte å fremstille dette på er med et F-diagram (Figur 1.1), som har fått sitt engelske navn etter de fem smitteveiene fra avføring: væske (fluids), jord (fields), fluer, fingre og mat (food). Alle disse smitteveiene er aktuelle i katastrofesituasjoner, og man må forsøke å bryte dem. Det er vanlig å skille mellom to typer barrierer: primære (skiller avføring fra smittebærer) og sekundære (stopper smitten mellom smittebærer og vert). Gode sanitære forhold og adekvat avløpsvannbehandling vil være primære barrierer, og er fokuset i denne oppgaven.



Figur 1.1: Fekal-orale smitteveier (F-diagram)

1.2.2 Enteriske virus

Enteriske virus (virus som skilles ut i avføring) er en viktig overfører av avføringsrelaterte sykdommer (Jimenez 2003). Dette skyldes at det kreves få virus for å infisere mange individer, de er små, transporteres lett mellom individer, persistente i ugjestmilde miljøer og tåler ytre påvirkning (for eksempel desinfeksjon og varme) bedre enn bakterier. De vanligste patogene enteriske virusene er tatt med i Tabell 1.1.

Virus er den minste mikrobiologiske smitteagenten. De varierer i størrelse og form, men er som regel mellom 20 og 1000 nm store (Tortora et al. 2013 s.383). Som arvestoff har de enten DNA eller RNA; dette kan være enkelt- eller dobbeltkjedet. Arvestoffet er beskyttet av en proteinkappe, som utgjør størstedelen av virusvekten. Proteinkappen kan igjen være beskyttet av en lipidmembran. Det er proteinkappen og lipidmembranen som beskytter virusets arvestoff mot ødeleggelse fra omgivelsene (for eksempel ved varme eller enzymer fra vertens immunforsvar). Virus kan bare formere seg i en vertscelle.

Det finnes mer enn 140 patogene enteriske virus som formerer seg i tarmene og skilles ut i avføringen (Jimenez 2003). De fleste virus vil ikke formere seg i avløpsvann/i miljøet, men de vil heller ikke inaktiveres. Et menneske som er infisert av virus kan utskille store mengder virus i avføringen. For eksempel kan rotavirus ha en konsentrasjon på opptil 10^{12} virus pr. gram avføring (Flewett 1982 sitert i Jimenez 2003). Friske mennesker skiller normalt ikke ut

patogene virus, men noen sykdommer fører til at virus utskilles lenge etter at personen er symptomfri (Jimenez 2003). Menneskets immunforsvar danner antistoffer mot en del av virusene, slik at man blir immun mot senere infeksjoner. Men mange av virusene muterer, og immuniteten gjelder ikke lenger. Man kan derfor bli syk av disse virusene flere ganger.

Hovedfokuset angående patogene mikroorganismer vil i denne oppgaven derfor være rettet mot enteriske virus.

1.2.3 Sykehusavløp

Konsentrasjonen av patogene mikroorganismer i avløpsvann vil være avhengig av den endemiske sykdomsbelastningen og utbrudd av andre sykdommer. For sykehus, der konsentrasjonen av syke mennesker er høyere enn normalt, er det naturlig å anta at konsentrasjonen i avløpsvannet også vil være høyere enn for «vanlig» avløpsvann. Mange studier viser at sykehusavløp inneholder flere antibiotikaresistente bakterier enn avløpsvann generelt (for eksempel Bouki et al. 2013; Chitnis et al. 2000; Fekadu et al. 2015; Galvin et al. 2010). I tillegg inneholder sykehusavløp mange andre patogene mikroorganismer. Sykehusavløp kan derfor utgjøre en stor risiko for befolkningen i nærheten, og bør behandles på stedet, før det eventuelt fortynnes under transporten til et sentralt renseanlegg (Gusbeth et al. 2009).

Avløpsvann fra sykehus inneholder også medisinrester som ikke tas fullstendig opp i kroppen (Beier et al. 2011; Fekadu et al. 2015). Antibiotika i avløpsvannet kan ha en positiv effekt på inaktivering av patogene bakterier, men kan også føre til miljøskader og spredning av flere antibiotikaresistente bakterier. Ikke alle typer antibiotika ødelegges av varme. Traub og Leonhard (1995) undersøkte varmetoleransen til 62 typer antibiotika, og fant ut at nesten halvparten tålte 121 °C i 15 minutter. Noen av disse kan forårsake mutasjoner hos bakterier selv etter varmebehandling (Hsieh et al. 2011). Ettersom sykehusavløp inneholder høyere konsentrasjoner av medisinrester enn «vanlig» avløpsvann, skal man være forsiktig med sluttdisponeringen av avløpsvannet.

1.2.4 Svartvann

Svartvann er fraksjonen av avløpsvann som kommer fra toaletter. Svartvann har høye konsentrasjoner av organisk materiale og næringsstoffer, som fosfor og nitrogen (Larsen et al. 2009; Todt et al. 2015). De fleste patogene mikroorganismer som finnes i blandet avløpsvann (svartvann og gråvann) stammer fra svartvannet (Jackson & Ord 2000 i; Ottoson & Stenstrom 2003). Siden 1990-tallet har det vært en økende interesse for systemer som separerer

svartvann og gråvann, og behandler disse fraksjonene hver for seg (Larsen et al. 2009). Ettersom feltsykehusene til Røde Kors samler toalettavløp opp for seg selv, har denne oppgaven bare fokus på behandling av svartvann.

1.3 Modellorganismer

1.3.1 Indikator- og modellorganismer brukt i forbindelse med avløpsvann

Konsentrasjonen av menneskelige patogene mikroorganismer i avløpsvannet vil være avhengig av smittebyrden befolkningen er utsatt for i øyeblikket, og vil dermed variere (Borrego et al. 1990). Det kan være vanskelig og dyrt å kvantifisere enteriske patogene mikroorganismer, og analysearbeidet kan utgjøre en helserisiko for forskere. Derfor er det sjelden hensiktsmessig å bruke enteriske patogene mikroorganismer som indikatororganismer i eksperimenter. En modellorganisme kan i stedet innføres (Pettersen & Ashbolt 2003). Denne må ha den samme, eller sterkere, motstand mot ytre påvirkninger (for eksempel temperatur, trykk, tørke og lys), og liknende overflateegenskaper (form, størrelse, elektrisk ladning) som organismene den erstatter.

Escherichia coli og andre koliforme bakterier har vært brukt som indikator for fekal forurensning i over 100 år (Ashbolt et al. 2001). Koliforme bakterier finnes bare i tarmene til mennesker og varmblodige dyr, og er derfor en sikker indikator på fekal forurensning om de er tilstede (Paruch & Mæhlum 2012). Likevel har mange studier konkludert med at *E. coli* og koliforme bakterier ikke er gode indikatororganismer for andre fekale organismer, spesielt ikke for virus, parasittiske protozoer og helminter (Ashbolt et al. 2001; Moce-Llivina et al. 2003; Pettersen & Ashbolt 2003; Skraber et al. 2004). Koliforme bakterier er lite persistent utenfor human vert, og tåler temperatur dårligere enn mange virus og helminter. Fravær av koliforme bakterier betyr derfor ikke nødvendigvis fravær av andre grupper av fekale patogene mikroorganismer.

Clostridium perfringens og bakteriofager (spesielt somatiske kolifager) foreslås i mange studier som bedre modellorganismer for menneskelige patogene mikroorganismer (Ashbolt et al. 2001; Brezina & Baldini 2008; Carrington 2001; Grabow 2001; Mandilara et al. 2006; Payment & Franco 1993; Skraber et al. 2004). *C. perfringens* er en sporeformende bakterie, og er på grunn av det meget persistent i mange hardføre miljøer. Sporene har liknende egenskaper som *Cryptosporidium*-egg og *Giardia*-egg, og *C. perfringens* er derfor en god modellorganisme for disse to. Ulempen er at *C. perfringens* kan være patogen.

I studier av slambehandling i utviklingsland brukes ofte helmint-egg som indikatororganisme, ettersom de har høy forekomst i avføringen i utviklingsland (Strande et al. 2014 s. 39).

Helmint-egg fra ett menneske kan infisere flere hundre mennesker. Egg fra *Ascaris lumbricoides* regnes som de mest persistente eggene mot inaktivering (Feachem et al. 1983), og er oftest brukt som indikator. Helmint-egg kan overleve flere ganger lengre enn andre indikatororganismer (bakterier og virus), uten å miste sin evne til å infisere. Fordi det mikrobielle fokuset er på virus i denne oppgaven, er det valgt å ikke benytte helmint-egg som modellorganisme.

Bakteriofager er virus som infiserer bakterier, og regnes ikke som patogener for mennesker (Grabow 2001). De er enkle å propagere, kvantifisere og jobbe med i laboratoriet.

Bakteriofager er mer persistente i miljøer utenfor verten enn enteriske virus. Det brukes i hovedsak tre typer bakteriofager som modellvirus: F-spesifikke RNA-fager (infiserer bakterien ved å angripe sex-pilus), somatiske kolifager (infiserer bakterien ved å feste seg til celleveggen); bakteriofager som infiserer *Bacteroides fragilis*. Bakteriofager er gode modellvirus for enteriske virus, da de deler mange fundamentale egenskaper som struktur, komposisjon, morfologi, størrelse og replikasjonsmåte. Bakteriofager er minst like resistente mot forhold som opptrer i vannbehandling og desinfeksjonsprosesser som enteriske virus. Det eksisterer likevel ikke en direkte sammenheng mellom antall bakteriofager og antall enteriske virus i avløpsvann. Det er utviklet internasjonale standarder for kvantifisering av F-spesifikke RNA-fager, somatiske kolifager og fager som infiserer *B. fragilis* (henholdsvis ISO standard 10705-1:1995, 10705-2:2000 og 10705-4:2001).

I denne oppgaven var det viktig å benytte et modellvirus som tåler varme minst like godt som de fleste enteriske virus, men likevel lar seg inaktivere i hygieniseringsanlegget. Dette er nødvendig for at inaktiveringen av modellviruset skal kunne sammenlignes med inaktiveringen av enteriske virus. F-spesifikke RNA-fager er den typen bakteriofager som er mest brukt for å modellere menneskelige virus (Ashbolt et al. 2001), men somatiske kolifager er mer resistente mot varme enn F-spesifikke RNA-fager i avløpsvann (Moce-Llivina et al. 2003). Det er derfor benyttet to somatiske bakteriofager, *Salmonella typhimurium* fag 28b, og ϕ X174, som begge er kjent for å være relativt varmetolerante.

1.3.2 *Salmonella typhimurium* fag 28b

Salmonella typhimurium fag 28b (*S.t.28b*) (Lilleengen 1948) er et somatisk virus med RNA som arvemateriale, og er ca. 60 nm stor (Allestam & Carlander 2000). Verten er *Salmonella typhimurium* type 5. *S.t.28b* er meget varmetolerant (Eller et al. 1996; Sahlström et al. 2008), og er dermed et konservativt valg som modellvirus. *S.t.28b* er persistent i avløpsvann, men forekommer ikke naturlig.

Sammenlignet med andre modellvirus er *S.t.28b* foreløpig lite brukt, men brukes mer og mer i forsøk med avløpsvann, nå over store deler av verden. *S.t.28b* har blant annet blitt benyttet i sporingsforsøk for å undersøke fekal forurensning av grunnvann (Carlander et al. 2000), studier av virusinaktivering i kildeseparert urin og fekalier (Höglund et al. 2002; Nordin 2010; Nordin et al. 2013; Tonner-Klank et al. 2007) og filtreringsforsøk med drikkevann (Heidary Rad 2014) og gråvann (Heistad 2008). Metoden for kvantifisering av *S.t.28b* er svært robust, og Svenska Folkhälsomyndigheten, Enheten för parasitologi, livsmedels- och vattenburen smitta, oppgir at de jobber nå nesten utelukkende med *S.t.28b* i sporingsforsøk (Hallin 2014). *S.t.28b* er valgt som modellvirus på grunn av sin relativt gode varmetoleranse og enkle kvantifiseringsmetode.

1.3.3 ϕ X174

ϕ X174 er en somatisk kolifag med DNA som arvemateriale, og er ca. 30 nm stort (Ashbolt et al. 2001). Verten er *E. coli*. ϕ X174 er mer varmeresistent enn de fleste enteriske virus, uavhengig av medium (Bertrand et al. 2012), og er derfor foreslått som et godt modellvirus i inaktiveringsforsøk.

ϕ X174 har blitt brukt i mange ulike typer forsøk, blant annet virusinaktivering ved varmebehandling av slam (Moce-Llivina et al. 2003), studie av virusinaktivering ved høyfrekvente lydbølger og lys (Chrysikopoulos et al. 2013), virusadsorpsjon i et småskala desentralisert renseanlegg for én husholdning (Heistad et al. 2009) og for å se hvor godt virus fra dyreavløpsvann adsorberes til jord ved infiltrasjon (Davis et al. 2006). Arraj et al. (2005) brukte blant annet ϕ X174 i en studie av sammenhengen mellom fjerning av somatiske kolifager og enteriske virus i anaerob nedbrytning. De fant ut at somatiske kolifager gir et godt bilde av hva som skjer med andre enteriske virus. I likhet med *S.t.28b*, er ϕ X174 valgt som modellvirus på grunn av sin relativt gode varmetoleranse og enkle kvantifiseringsmetode.

1.4 Pasteurisering

Hygienisering er å fjerne eller inaktivere de fleste patogene mikroorganismer (Tortora et al. 2013 s. 182). Hygieniseringsmetoder for avløpsvann og slam kan være fysiske (varmebehandling, tørking, mikrobølgestråling, UV-lys og ultralyd), biologiske (aerob og anaerob nedbrytning og kompostering) og/eller kjemiske (syrebehandling, behandling med kalk, ozon, klor eller hydrogenperoksid) (Carrington 2001). Klorering er den mest benyttede måten å hygienisere avløpsvann på, men har den bieffekten at det dannes giftige forbindelser når klor reagerer med organisk materiale (Monarca et al. 2000). UV-bestråling er ikke effektivt i vann med høy turbiditet, slik som avløpsvann. Mange studier har vist at ulike kjemiske desinfeksjonsmidler danner giftige stoffer og fører til mutasjoner hos ulike organismer i avløpsvannet (se kildeliste i Monarca et al. (2000) og Gusbeth et al. (2009)). Disse metodene kan ha god effekt når det gjelder desinfeksjon, men kan også øke innholdet av giftige forbindelser i avløpsvannet. Smitterisikoen fra patogene mikroorganismer må likevel vurderes som den største trusselen fra avløpsvann mot folkehelsen.

Biologisk nedbrytning av patogene mikroorganismer krever mye lenger oppholdstid enn varmebehandling (Astals et al. 2012; Carrington 2001). Bakterier blir lettere brutt ned i anaerob nedbrytning enn virus. Spillmann et al. (1987) fant ut at mesofil anaerob nedbrytning ikke er effektivt for å redusere rotavirus og coxsackievirus.

Pasteurisering er å varme opp avløpsvann til minst 70 °C så lenge at bakterier og parasitt-egg blir inaktivert (Ødegaard 2012 s. 593). Pasteurisering brukes i dag hovedsakelig til hygienisering av meieriprodukter og andre matvarer (Tortora et al. 2013 s.187). Da brukes gjerne 72 °C i 15 sekunder, for å unngå at smaken skal forringes, samtidig som de fleste patogene organismer eller organismer som kan ødelegge maten inaktiveres. Pasteurisering er energikrevende, men vil ikke danne giftige forbindelser, og varmebehandling har også vist seg å ha god effekt på inaktivering av alle grupper patogene mikroorganismer.

Det er til nå ikke gjort forsøk med pasteurisering av svartvann, men flere studier har undersøkt effekten av pasteurisering av avløpsvann eller slam fra avløpsrensing (Astals et al. 2012; Bonjoch & Blanch 2009; Foliguet & Doncoeur 1972; Keller et al. 2004; Moce-Llivina et al. 2003; Pike et al. 1988; Spillmann et al. 1987). Basert på disse resultatene er det interessant å vurdere pasteurisering som hygieniseringsmetode for svartvann.

1.4.1 Inaktiveringskinetikk

Den regjerende modellen for å beskrive inaktivering av mikroorganismer er en førsteordens differensiallikning (Chicks lov). Denne ble først beskrevet av Chick (1908), og sier at inaktiveringsraten er proporsjonal med konsentrasjonen (formel 1.1). Denne modellen antar at alle individer i populasjonen har samme følsomhet for inaktiveringsmekanismen.

$$\frac{dC_t}{dt} = -kC_t \quad (1.1)$$

$\frac{dC_t}{dt}$ er inaktiveringsraten, k er en inaktiveringskonstant og C_t er konsentrasjonen ved tid t .

Modellen kan skrives om til formelen for konsentrasjonen ved tid t (formel 1.2).

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (1.2)$$

C_0 er konsentrasjonen ved start ($t=0$). Formel 1.2 kan videre omformes til formel 1.3 og 1.4.

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = -kt \quad (1.3)$$

$$\log_{10} \frac{C_t}{C_0} = -\frac{kt}{\ln 10} \quad (1.4)$$

Merk at noen studier opererer med k' i stedet for k , hvor $k' = \frac{k}{\ln 10}$. Phelps (1911) foreslo hvordan man kan gjøre k temperaturavhengig, ved å introdusere Arrhenius likning.

Tiden det tar å inaktivere de første 90 % av mikroorganismene (1 \log_{10} reduksjon, $C_t/C_0 = 0,1$) blir (formel 1.5):

$$t_{90} = \frac{\ln 10}{k} = \frac{1}{k'} \quad (1.5)$$

Så lenge man forutsetter en førsteordens inaktiveringsmodell kan man nå multiplisere tiden det tar å redusere konsentrasjonen 1 \log_{10} (t_{90}) med antall \log_{10} -enheter man ønsker å redusere, for å finne nødvendig behandlingstid. t_{90} omtales også som D-verdi. For eksempel blir da 4D tiden det tar for å oppnå 4 \log_{10} reduksjon. I denne oppgaven brukes både D-verdi og t_{90} for å betegne tiden det tar å oppnå 1 \log_{10} reduksjon.

En annen modell for inaktivering er Weibull-modellen, beskrevet av van Boekel (2002).

Denne antar at til at det finnes en underliggende sannsynlighetsfordeling for inaktiveringen av

enkeltorganismer. Ved å innføre en ny inaktiveringsparameter, β , kan man ta korrigere for at inaktiveringskurven ikke alltid danner en rett linje i et semi-logaritmisk plot (formel 1.6).

$$C_{(t)} = C_0 e^{-(kt)^\beta} \quad (1.6)$$

C_t er viruskonsentrasjonen etter tid t , C_0 er startkonsentrasjonen, k og β er inaktiveringsparametere (k forklarer stigningen og β forklarer formen på kurven). Formel 1.6 kan videre skrives om til formel 1.7 og 1.8. Merk at førsteordenslikningen (formel 1.2) er en spesialversjon av Weibull-modellen hvor $\beta=1$.

$$\ln \frac{C_t}{C_0} = -(kt)^\beta \quad (1.7)$$

$$\log_{10} \frac{C_t}{C_0} = -\frac{(kt)^\beta}{\ln 10} \quad (1.8)$$

Weibull-modellen tar hensyn til de mange ikke-lineære inaktiveringskurvene for konsentrasjon som oppstår når man plotter semi-logaritmiske grafer (logaritmen av konsentrasjonen plottet mot tiden). Modellen bygger på antagelsen om at tiden som trengs for å inaktivere en mikroorganisme er en underliggende sannsynlighetsfordeling som endrer seg med tiden.

Dersom inaktiveringskurven er konveks (bøyer oppover, $\beta < 1$), kan det skyldes at virusene i avløpsvannet opplever en form for beskyttelse fra partikler i vannet, men denne beskyttelsen er ikke homogen. Virusene som ikke er bundet til partikler vil først inaktiveres, og dette går raskt. Deretter vil virus som er bundet til partikler inaktiveres, men dette tar lenger tid på grunn av beskyttelsen. Dersom virusene påvirkes av varmen slik at det er en kumulativ skade på virusene, som gjør det stadig mer vanskelig å unngå inaktivering, er inaktiveringskurven konkav (bøyer nedover, $\beta > 1$). Ved $\beta=1$ (førsteordens inaktivering) er sannsynligheten for å inaktiveres i neste tidsintervall like stor for alle virus, og den endres ikke med tiden.

Weibull-modellen kan kontrolleres ved å plote dobbellogaritmen av relativ konsentrasjon mot logaritmen av tid. Dersom modellen stemmer, skal de målte punktene ligge på en rett linje. Ved å gjøre lineær regresjon for denne linjen (formel 1.9) kan man finne parameterne k og β . Merk at målingen ved $t=0$ ikke kan inngå i denne formelen, for man kan ikke finne $\ln\left(-\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right)\right)$ ettersom $\frac{C_t}{C_0} = 1$, og $\ln(1) = 0$. Formel 1.9 ligner på formelen for rett linje, $y = b + ax$, hvor $\ln(t)$ er variabelen vår.

$$\ln\left(-\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right)\right) = \beta \ln(k) + \beta \ln(t) \quad (1.9)$$

Weibull-modellen har én inaktiveringsparameter mer enn Chicks lov; derfor kreves det et ekstra datapunkt for å finne parameterne. Startkonsentrasjonen kan ikke tegnes inn når det gjøres lineær regresjon, og Weibull-modellen vil derfor få høyere r^2 -verdier enn Chicks lov i noen tilfeller. van Boekel (2002) og Tuladhar et al. (2012) har sammenlignet publiserte inaktiveringsdata og funnet ut at for mange av forsøkene gir Weibull-modellen en bedre beskrivelse av inaktiveringsprosessen enn Chicks lov.

På sikt kan det være ønskelig å modellere virusinaktiveringen i hygieniseringsanlegget. Da trengs det data på inaktivering av modellvirus i svartvann. Denne oppgaven vil finne inaktiveringsparametere for Chicks lov og Weibull-modellen for *S.t.28b* og ϕ X174 i svartvann og springvann der det er mulig.

Det finnes mange andre modeller som også kan beskrive ikke-førsteordens inaktivering, men det blir utenfor målet med denne oppgaven å gå inn på alle disse. Weibull-modellen er valgt som ett av alternativene til Chicks lov, fordi den er en tilpasningsdyktig modell som ikke er for vanskelig matematisk.

1.4.2 Faktorer som påvirker termisk inaktivering

De fleste publiserte data på inaktivering av patogene mikroorganismer er fra kontrollerte laboratorieeksperimenter, og det er store forskjeller i dataene som er rapportert (Bertrand et al. 2012; Lang & Smith 2008). Dette kommer av de mange ulike tilnærmingene og forholdene som er testet. Variasjoner kan gå på størrelsen på forsøket (laboratorieforsøk eller pilotforsøk), forskjeller i mediet som er testet (næringsmedium, slam, avløpsvann, mat, rent vann), forskjeller i organismene som er testet (modellorganismer, kontrollkulturer eller kulturer som er isolert fra mediet) og forskjeller i kvantifiseringsmetoder.

Virus kan binde seg til partikler i avløpsvann og slam. Dette vil gjøre dem mer persistent i ugjestmilde miljøer, og kan føre til en lavere inaktivering ved varmebehandling (Bonjoch & Blanch 2009; Gerba et al. 1978; Moce-Llivina et al. 2003; Popat et al. 2010; Scheuerman et al. 1991; Straub et al. 1992). Selv om mange har slått fast at partikkelinnholdet påvirker inaktiveringen, er det ingen som har sammenlignet inaktiveringen i ulike vannkvaliteter av avløpsvann og slam.

Pike et al. (1988) konkluderte med at det ved pasteurisering er best å drive i satsvise prosesser for å være sikker på at alt avløpsvann er eksponert for den samme varmen og å unngå kortslutningsstrømmer gjennom anlegget. Varmetransporten og -fordelingen i systemet vil i stor grad påvirke inaktivering av mikroorganismer, det vil også driftsparametere og karakteristikken på avløpsvannet (Lang & Smith 2008).

1.4.3 Termisk inaktivering av enteriske virus

Varme kan inaktivere virus ved å ødelegge proteinkappen (dominant ved lave temperaturer) eller arvematerialet (dominant for høye temperaturer) (Dimmock 1967; Mitchell & McCormick 1984). Det er stor diversitet i varmetoleransen for virus. Hepatitt A virus er det mest varmeresistente viruset som er nevnt i Tabell 1.1 (Emerson et al. 2005; Gibson & Schwab 2011).

For å kunne gi en anbefaling om drift av anlegget er vi nødt til å vite hvordan enteriske virus reagerer på varme. De fleste studier som er gjort på termisk inaktivering av virus i avløpsrelaterte medier er gjort i slam. Det finnes derfor få publiserte resultater på termisk virusinaktivering i avløpsvann, og ingen i svartvann.

Moce-Llivina et al. (2003) sammenlignet naturlig forekommende bakteriofager (blant annet ϕ X174, MS2, B40-8) i avløpsvann med enterovirus (poliovirus 1, Coxsackievirus B4 og B5 og ECHO-virus 1 og 2) i pasteurisering ved 60 °C i 30 minutter. ϕ X174 ble inaktivert med 2,1 \log_{10} , mens enterovirus ble inaktivert med 4,3 – 5,4 \log_{10} .

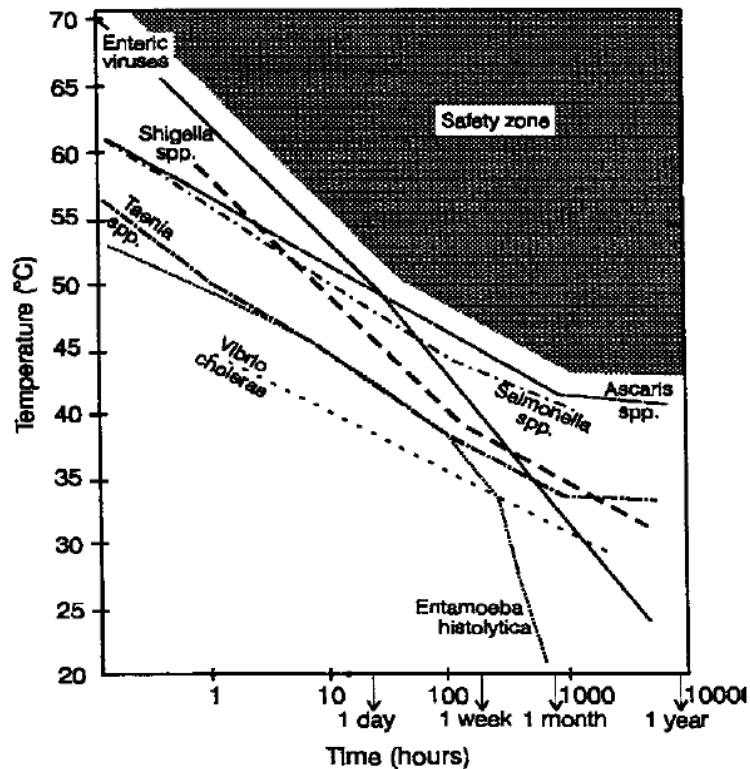
Tuladhar et al. (2012) fant varmetoleransen for norovirus, poliovirus, adenovirus type 5 og parechovirus som alle stammer fra avføring ved 73 °C i bufferløsning. Alle virusene, unntatt parechovirus, ble inaktivert med mer enn 4 \log_{10} i løpet av 3 minutter (parechovirus 3,5 \log_{10}). De fant også ut at en førsteordens inaktiveringsmodell forklarte inaktivering best ved 73 °C.

Bertrand et al. (2012) gjorde et litteraturstudie som sammenlignet 73 publiserte studier om termisk inaktivering av virus i ulike medier. Mediene som ble sammenlignet ble fordelt i to grupper: enkle medier (syntetiske medier, drikkevann og grunnvann) og komplekse medier (ferskvann med høy turbiditet, sjøvann, avløpsvann, jord, meieriprodukter, mat og urin). I artikkelen gis det en formel for å regne ut D-verdier (t_{90}) for ulike temperaturer og virus i enkle og komplekse medier. Blant virusene som er med i oversikten for komplekse medier er det både modellvirus (feline calicivirus, murine norovirus, F-spesifikke RNA fager, ϕ X174 og somatiske kolifager) og patogene mikroorganismer (poliovirus, hepatitt A-virus, ECHO-virus og coxsackievirus). De fant ut at ved temperaturer over 50 °C var den første

\log_{10} -inaktivering er raskere i komplekse enn i enkle medier for samtlige virus som var tatt med i studien. Virus i enkle medier var mer følsomme for temperaturendringer, og inaktiveringshastigheten endret seg raskere med temperaturen enn virus i komplekse medier. Det vises til side 63 for resultatene fra denne studien.

Mitchell og McCormick (1984) undersøkte varmetoleransen til lassa-, ebola- og marburgvirus i blodprøver. De fant ut at tiden som skal til for å inaktivere de tre virusene med 5 \log_{10} ved 60 °C er henholdsvis 37, 22 og 37 minutter. Det finnes ikke data på termisk inaktivering av ebolavirus i avløpsvann. Ved Ullevål sykehus, molekylærdiagnostisk og virologisk enhet, benyttes oppvarming til 60 °C i 60 minutter for å inaktivere ebolavirus i pasientprøver (Jakobsen 2015).

Strauch (Strauch 1998 i Carrington 2001) lagde en oversikt over det som da var kjent angående inaktivering av patogene mikroorganismer (Figur 1.2). Denne tegner alle inaktiveringskurvene i samme diagram, og oppe til høyre for alle kurvene ligger «sikkerhetssonen». Dersom driftsparametrene ligger i dette området, er slammet nesten fritt for patogener. Dette diagrammet foreslår at varmebehandlingen må være minst 20 minutter ved 70 °C og 1 time ved 65 °C. Dataene som er lagt til grunn for diagrammet er fra forsøk med renkulturer av organismene i laboratorieforsøk, og er derfor ikke direkte sammenlignbare med inaktivering i svartvann, men diagrammet gir en indikasjon på hva som kan forventes.



Figur 1.2: Termisk inaktivering av ulike patogene mikroorganismer i laboratorieforsøk (Strauch 1998 i Carrington 2001).

1.5 Sonikering

I denne oppgaven er viruskonsentrasjonen funnet som antall plakkformende enheter (pfu) pr. volumenhet (side 22). Som nevnt kan virus binde seg til partikler i avløpsvannet. Dersom virus aggregerer, vil viruskonsentrasjonen underestimeres, ettersom flere virus danner samme plakk. Sonikering er en metode for å løse opp aggregater, hvor vannprøven utsettes for ultralydbølger. Flere studier har brukt sonikering for å deaggregere virus, blant annet i renkultur (Tree et al. 2003), avløpsvann og slam (Arraj et al. 2005; Hejkal et al. 1981; Wellings et al. 1976), biofilm (Ferreira et al. 2013; Fontenete et al. 2013; Scott & Skaarer 2005; Storey 2002) og ultrafiltreringsfilter (Jones et al. 2009).

Wellings et al. (1976) fant ut at opptil 100 % av virusene i avløpsvann, slam og jord kan være bundet til partikler, og at sonikering derfor er nødvendig for å finne riktig viruskonsentrasjon. De konkluderer også med at man kan riste lenge for å løse opp aggregatene. Hejkal et al. (1981) studerte effekten av virus bundet til partikler i behandling av avløpsvann, og fant ut at de fleste virus er frie eller bundet til partikler mindre enn 0,3 μm store. Sonikering i 15 minutter førte til en tredobling av antall infiserende virus. På den andre siden fant Storey

(2002) ut at sonikering i 2 minutter ikke påvirket viruskonsentrasjonen. Sonikering kan imidlertid også inaktivere virus. Phull et al. (1997) undersøkte om ultralyd kan benyttes som desinfeksjonsmetode for drikkevann, og fikk gode resultater.

Forskningsgruppa er delt i spørsmålet om sonikering av prøver med virus kan deaggregere virus slik at dette gir en økning i viruskonsentrasjonen eller ikke. I denne oppgaven vil dette derfor bli undersøkt med *S.t.28b*.

1.6 Mål for oppgaven

Svartvann fra Røde Kors' feltsykehus inneholder mange patogene mikroorganismer, og det er viktig å behandle dette for å unngå spredning av overførbare sykdommer. Røde Kors Norge, Røde Kors Sverige og A-Aqua har sammen utviklet et hygieniseringsanlegg som pasteuriserer svartvannet, og har engasjert NMBU til å teste en prototype av dette. Denne testingen utgjør hoveddelen av denne oppgaven. Hovedmålet for oppgaven har derfor vært å finne ut om pasteurisering er en hensiktsmessig hygieniseringsmetode for svartvann fra Røde Kors' feltsykehus, og å gi en anbefaling om hvordan hygieniseringsanlegget skal driftes optimalt. Anlegget som testes skal videreutvikles, og det er derfor også et mål å gi konkrete anbefalinger om hvordan anlegget kan forbedres. Dette utgjør de to første hovedpunktene i problemstillingen.

For å beskrive hvordan anlegget presterer skal inaktivering av modellvirus beskrives. I forsøkene skal *Salmonella typhimurium* fag 28b og ϕ X174 benyttes som modellvirus for enteriske patogene virus. Oppgaven vil finne ut om disse er passende modellvirus for enteriske virus, ved å finne varmetoleransen til modellvirusene og sammenligne denne med det som tidligere er publisert om enteriske virus. Hygieniseringsanlegget kan varme svartvannet opp til 76 °C. Oppgaven vil derfor etablere data for termisk inaktivering av *S.t.28b* og ϕ X174 i svartvann i temperaturområdet 60 – 80 °C.

1.6.1 Problemstilling

Arbeidet med oppgaven har hatt følgende problemstilling:

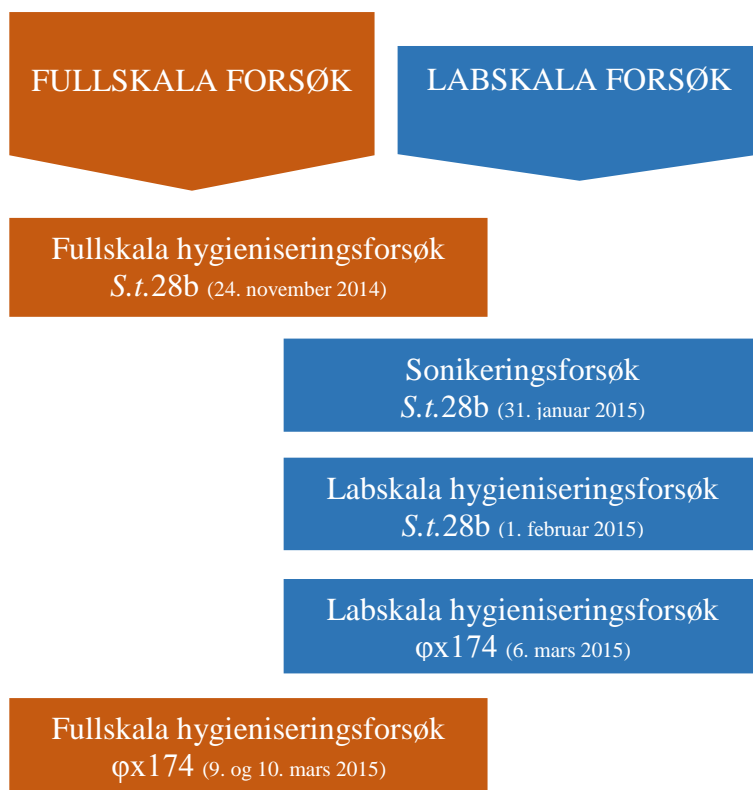
- Er pasteurisering en hensiktsmessig hygieniseringsmetode for svartvann fra Røde Kors' feltsykehus?
- Hvordan bør hygieniseringsanlegget driftes for å gi optimal hygieniseringen av svartvannet?
 - Hvilke forbedringspotensialer har hygieniseringsanlegget?
 - Dersom det skal innføres et ekstra rensetrinn, hva bør det være?
- Er *Salmonella typhimurium* fag 28b og ϕ X174 passende modellvirus for å studere inaktivering av enteriske virus i pasteuriseringsforsøk?
 - Hvordan reagerer modellvirusene på varmebehandling i temperaturområdet 60 – 80 °C når de er suspendert i svartvann?
 - Hva tåler modellvirusene sammenlignet med andre enteriske patogene mikroorganismer?
 - Vil sonikering av prøver med *S.t.28b* gi en endring i viruskonsentrasjonen?

2 Materialer og metode

I dette kapittelet blir først svartvannet og hygieniseringsanlegget beskrevet, deretter fullskala og labskala hygieniseringsforsøk og sonikeringsforsøket. Til slutt kommer en gjennomgang av den generelle metoden for å propagere og telle virus, samt tørrstoffanalyser.

Alle forsøkene er gjennomført på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), campus Ås. Testene av hygieniseringsanlegget i fullskala ble gjennomført i vann- og avløpslaboratoriet på TF fløy IV. Tørrstoffanalyser ble gjennomført på vannlaboratoriet på TF fløy V. Det øvrige laboratoriearbeidet ble gjort på kurssalen for mikrobiologi i Bioteknologibygningen.

Deler av oppgaven er utført på oppdrag av A-Aqua, som ønsket å teste hygieniseringsanlegget for virusinaktivering (fullskala hygieniseringsforsøk). *Salmonella typhimurium* fag 28b (*S.t.28b*) ble benyttet som modellvirus i november 2014. I begynnelsen av 2015 ble først sonikeringsforsøket gjennomført. Deretter ble data for varmetoleransen for *S.t.28b* og ϕ X174 etablert (labskala hygieniseringsforsøk), før de siste forsøkene med hygieniseringsanlegget ble gjennomført, denne gangen med ϕ X174 som modellvirus. Rekkefølgen og dato for forsøkene er illustrert i Figur 2.1.



Figur 2.1: Illustrasjon av rekkefølgen forsøkene har blitt utført i (fra øverst til nederst).

I denne oppgaven er viruskonsentrasjonen i prøvene funnet som antall plakkformende enheter (pfu) pr. volumenheter. Plakkformende enheter er et mål på hvor mange virus i løsningen som danner plakker i et lag av bakterier. Det registreres med andre ord antall virus som er i stand til å infisere verten, og ikke et absolutt tall på antall virus i løsningen.

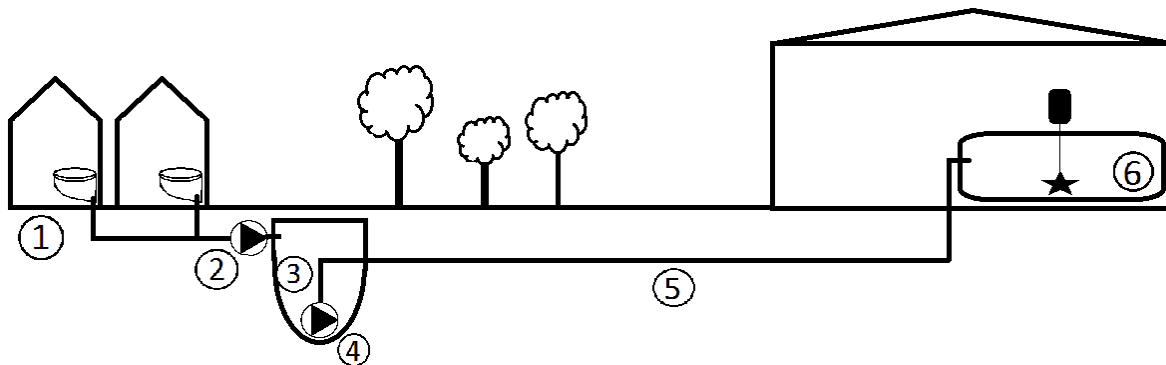
Dobbelagar-metoden er benyttet for å kvantifisere virus, og følger metodene beskrevet i Allestam og Carlander (2000) og ISO-standard 10705-2:2000 (ISO 2000), men med noen unntak. Prinsippet er å støpe en blanding av fortynnet agar (softagar) med vertskultur (bakterier) og prøven på en petriskål (forhåndstøpt med agar). Bakteriene vil vokse og danne et lag på agaren. Virusene i prøven vil infisere bakteriene, og danne plakk (steder hvor bakteriene ikke vokser). Antall plakk kan telles etter en bestemt inkubasjonstid.

2.1 Materialer

2.1.1 Svartvann og springvann

Svartvannet som er benyttet i denne oppgaven kommer fra Kaja studentboliger ved NMBU, der det bor 48 studenter (Todt et al. 2015). Leilighetene har vakuumpoletter fra Jets, og er blant de første store prosjektene i Vest-Europa med kildeseparert avløp. Systemet har blitt benyttet i flere studier ved NMBU (blant annet Heistad et al. 2006; Moges et al. 2015; Svete 2012; Todt et al. 2014). En kvernpumpe (Vacuumarator™ 25MB, Jets™) sørger for undertrykk og pumper vannet til en nedgravd pumpesump (500 liter). En ny pumpe (Tsurumi 40U) pumper toalettavløpet videre til vann- og avløpslaboratoriet (Fløy IV) gjennom en 150 meter lang overføringsledning (Ø40mm) til en oppholdstank (700 liter, rustfritt stål) med omrøring (30 rpm). Fra denne tanken hentes svartvannet i laboratoriet. Pumpa i pumpesumpen har store åpninger og stort pumpehus, for å unngå å påvirke partikkelstørrelsen i svartvannet. En illustrasjon av systemet er vist i Figur 2.2.

Total oppholdstid i tank og rør, før vannet når vann- og avløpslaboratoriet, er estimert til 36 – 48 timer (Todt et al. 2015). Volumstrømmen av svartvann fra Kaja studentboliger er 327 ± 26 l/d. Vakuumpolettene bruker 1,2 liter pr. spyling, noe som ligner på det som benyttes i Røde Kors sine feltsykehus (Bolleurs 2015; Todt et al. 2015).



Figur 2.2: Illustrasjon av innsamlings- og overføringssystemet mellom Kaja Studentboliger og vann- og avløpslaboratoriet ved IMT, Fløy IV, NMBU.

(1) Studentboliger med vakuumtoaletter, (2) Vakuumpumpe (Vacuumerator™ 25MB), (3) Nedgravd pumpestasjon (500 liter), (4) Pumpe (Tsurumi 40U), (5) Overføringsledning (Ø40 mm, L=150 m), (6) Oppholdstank Fløy IV (700 liter, rustfritt stål, omrøring 30 rpm)

Kvaliteten på avløpsvannet fra Kaja studentboliger, både svartvann og gråvann, er grundig beskrevet av Todt et al. (2015). De viktigste funnene for svartvann for denne oppgaven er at verdiene for total tørrstoff (TS) ligger mellom 7 og 8,5 g/l og suspendert stoff (SS) ligger mellom 4,5 og 6 g/l. Verdiene er gitt som 25 % og 75 % persentiler for prøvene som er undersøkt i studien (n = 63). Svartvannet står for 69 % av det organiske materialet (målt som COD) i alt avløpsvann fra Kaja.

Todt et al. (2015) har også sammenlignet avløpsvannet fra Kaja studentboliger med andre kildeseparerte systemer. I sin studie konkluderer de med at konsentrasjonene av organisk materiale, fosfor og nitrogen i svartvannet er sammenlignbare med resultater fra andre studier av systemer med vakuumtoaletter. Sammenlignet med andre kildeseparerte systemer (som ikke nødvendigvis har vakuumtoaletter), er forholdene mellom organisk materiale, fosfor og nitrogen i svartvannet sammenlignbare, selv om konsentrasjonene varierer. Dette tyder på at sammensetningen av svartvannet er lik, men konsentrasjonene avhenger av hvor mye vannet fortynnes av spylevann i toalettene.

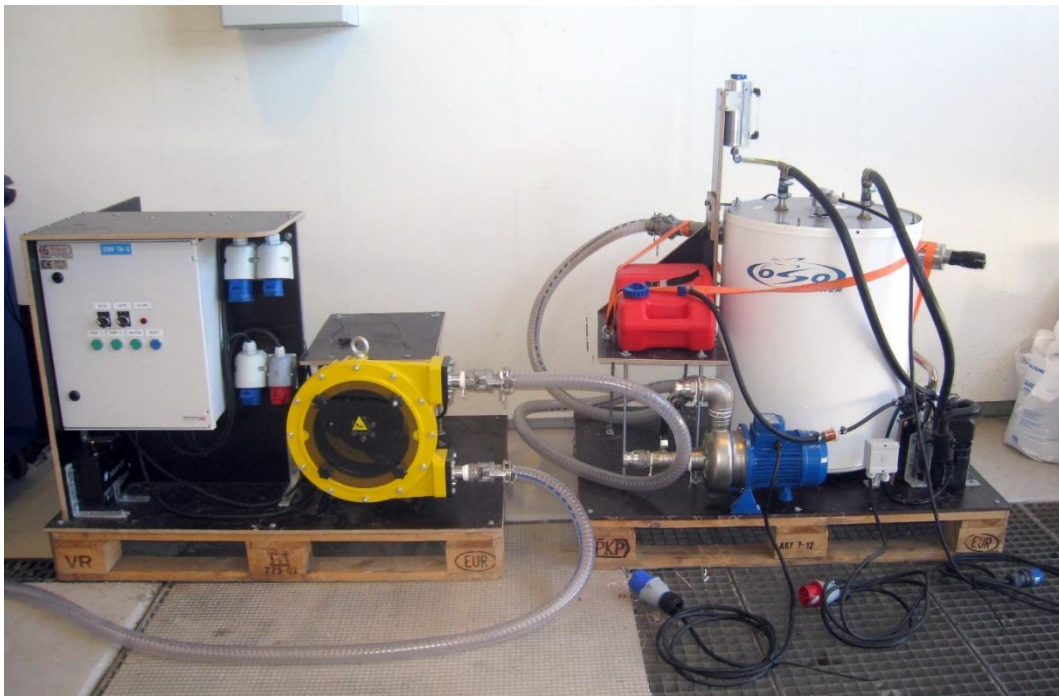
Springvann leveres fra Nordre Follo Renseanlegg, som har Gjersjøen som vannkilde. Kaldt vann ble tappet fra springen etter å ha latt vannet renne i minst 1 minutt.

2.1.2 Hygieniseringsanlegget

Hygieniseringsanlegget som er benyttet til fullskala forsøk er utviklet av A-Aqua.

Hovedkomponenten i anlegget er en varmtvannsberedertank (OSO Energy saver 120, 120 liter, diameter ca. 50 cm, produksjonsår 2013) for svartvann. Denne inneholder en varmeveksler (et metallrør i spiral, overflateareal 1,2 m²) som ligger i ytterkanten av tanken. I varmeveksleren sirkulerer varmtvann, som varmes i en dieselvarmer (Webasto Thermo Top Z/C med pumpe for sirkulering av varmtvann), for å varme svartvannet. Vannstrømmen er nedover i spiralen, altså fra topp til bunn i tanken. Anlegget jobber satsvis; svartvann pumpes inn til tanken er full, det varmes opp til ønsket temperatur, holdes i tanken den ønskede tiden og pumpes ut.

Alle prosessene styres av en PLC (Siemens Logo! 12/24RC). Svartvann pumpes inn av en slangepumpe (Boyser® FMP-30), og dieselvarmeren starter. Når svartvannet har blitt eksponert for den ønskede dosen varme, pumpes svartvannet ut, og en ny sats startes. Slangepumpa styres av en frekvensomformer (Emotron VSA23-03). Denne benyttes til å pumpe inn svartvann i tanken, og den ble også brukt til å pumpe ut ferdig behandlet svartvann i denne oppgaven. Dette er en prototype av hygieniseringsanlegget, og den inneholder ingen form for omrøring eller mekanisme for å få sirkulasjon av svartvannet i tanken.



Figur 2.3: Hygieniseringsanlegget sett forfra.

Fra venstre: Styreskap med PLC, pumpe som ble brukt til fylling/tømming av tanken, dieseltank, pumpe som ikke ble brukt, svartvannstank (reaktor) og dieselvarmer.

Temperaturen i tanken måles av en temperaturføler (ME-50, elementtype PT100, levert av Elteco AS, Norge), og nivået i tanken måles av en nivåmåler (Carlo Gavazzi VNI3). Dette benyttes av PLC-en for styring. Signalet fra temperaturføleren forsterkes av en temperaturtransmitter (T120, levert av Elteco AS, Norge), da motstanden i kabelen kan påvirke signalet. Denne transmitteren kan programmeres.

Produktdatabladet til dieselvarmeren (Webasto Thermosysteme GmbH 2000) oppgir at dieselvarmeren vil gå med full effekt til varmtvannet som sirkuleres når 72 °C. Deretter vil den gå med halv effekt og varme vannet opp til maksimalt 76,5 °C. Dieselvarmeren går inn i hvilemodus når vannet når 76,5 °C, men varmtvannet sirkuleres kontinuerlig. Det samme vil skje etter 76 minutter med kontinuerlig drift. Først når vannet kjøles ned til 71 °C starter dieselvarmeren igjen, med halv effekt. Skulle temperaturen komme ned i 56 °C, vil dieselvarmeren igjen gå med full effekt opp til 72 °C. Dieselvarmeren har et dieselforbruk på 0,5 kg/time ved full effekt, og leverer da 5 kW varme til vannet som sirkuleres. Ved halv effekt er dieselforbruket 0,25 kg/time, og 2,5 kW varme leveres. Det kreves elektrisitet for å styre dieselvarmeren og å sirkulere varmtvannet. Dette leveres fra styreskapet til hygieniseringsanlegget, som også starter og stopper varmesystemet.

2.2 Formler og statistiske analyser

2.2.1 Inaktivering

Inaktivering av virus blir i denne oppgaven oppgitt som antall \log_{10} -enheter reduksjon. Med dette menes \log_{10} -verdien av forholdet mellom aktuell (C_t) og opprinnelig (C_0) konsentrasjon. Dette regnes ut med formel 2.1.

$$\text{antall } \log_{10} \text{ reduksjon} = -\log_{10} \frac{C_t}{C_0} \quad (2.1)$$

Eksempelvis vil en 3 \log_{10} reduksjon tilsvare at antallet virus reduseres med 1/1000, eller at 99,9 % blir inaktivert. Gjennomsnittet av reduksjoner gis som gjennomsnittet av \log_{10} verdiene (formel 2.2).

$$\text{gjennomsnittlig reduksjon} = \frac{-\log_{10} \left(\frac{C_{t1}}{C_0} \right) - \log_{10} \left(\frac{C_{t2}}{C_0} \right)}{2} \quad (2.2)$$

2.2.2 Viruskonsentrasjon i prøver

Det må antas at virusene er tilfeldig fordelt i prøven, og at de ikke danner aggregater. Antallet virus som støpes på en petriskål vil da være en tilfeldig variabel, X , som er Poissonfordelt (Haas et al. 1999). For å regne ut viruskonsentrasjonen i prøvene er formel 2.3 benyttet. Denne gir oss det beste estimatet, \hat{c} , av konsentrasjonen av plakkformende enheter i prøven.

$$\hat{c} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i}{\sum_{i=1}^k r_i V_i} \quad (2.3)$$

k er antall individuelle plattetellinger, x_i er antall plakk på petriskål i , V_i er prøvevolum på petriskål i og r_i er fortynningsfaktoren for petriskål i (for eksempel 10^{-4}). Denne formelen gjør at bidraget fra de mest fortynnede fortynningsstegene vektlegges mindre enn fra mindre fortynnede fortynningssteg.

2.2.3 Deteksjonsgrense

For å finne deteksjonsgrense for metoden må den minste konsentrasjonen c_L som gjør det usannsynlig (mindre enn 5 % sannsynlighet) at det ikke er plakk på petriskålene bestemmes. Dersom det ikke observeres plakk på noen av petriskålene, kan det med 95 % sikkerhet sies at konsentrasjonen i prøven er mindre enn c_L . Det antas også her at antall plakk på en petriskål følger Poissonfordelingen (Haas et al. 1999). Siden summen av Poisson-fordelte variabler også er Poisson-fordelt, kan det antas at summen av antall plakk på alle petriskålene er Poisson-fordelt. Den forventede summen av antall plakk på petriskålene fra mange tester av samme prøve er parameteren i Poisson-fordelingen, kalt λ (formel 2.4).

$$\lambda = c \sum_{i=1}^k r_i V_i \quad (2.4)$$

Hvor c er konsentrasjon i prøven, r_i er fortynningsfaktor petriskål i , V_i er prøvevolum petriskål i , k er totalt antall petriskåler. Sannsynligheten for å få x plakk på k petriskåler er (formel 2.5):

$$P(X = x) = \frac{\lambda^x}{x!} e^{-\lambda} \quad (2.5)$$

λ_L må bestemmes slik at $P(X = 0) \leq 0,05$.

$$P(X = 0) = e^{-\lambda_L} \leq 0,05 \quad (2.6)$$

$$\lambda_L \geq \ln 20 \quad (2.7)$$

Ved å kombinere formel 2.4 og 2.7 til formel 2.8, finner vi den minste viruskonsentrasjonen som kan detekteres med metodene beskrevet i kapittel 2.6.3 og 2.7.3. Med andre ord er det mindre enn 5 % sannsynlighet for at konsentrasjonen er høyere enn c_L om alle petriskålene er uten plakk.

$$c_L \geq \frac{\ln 20}{\sum_{i=1}^k r_i V_i} \quad (2.8)$$

I analysen av prøver med *S.t.28b* er det brukt 0,5 ml prøvevolum, og med $\phi X174$ er det brukt 1 ml prøvevolum. Dette gir en deteksjonsgrense for *S.t.28b* og $\phi X174$ på henholdsvis 3 og 1,5 pfu/ml dersom to petriskåler dyrkes med ufortynnet prøve.

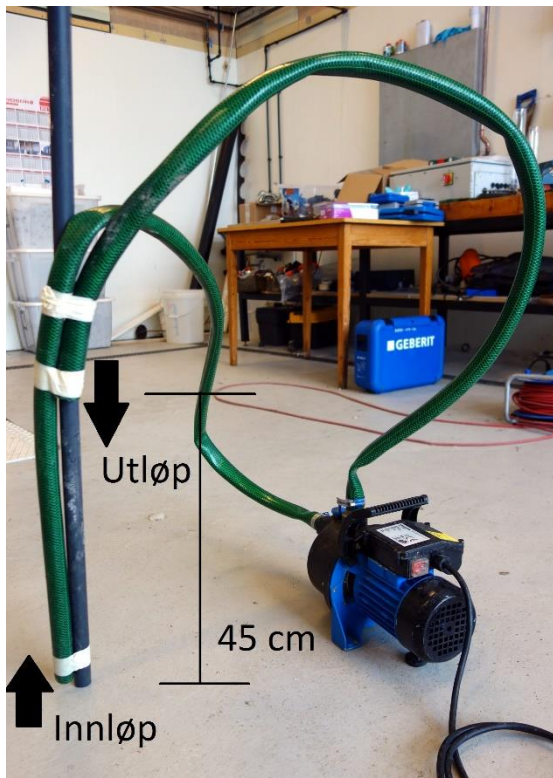
2.3 Fullskala hygieniseringsforsøk

Virusinaktivering i hygieniseringsanlegget fra A-Aqua har blitt testet totalt fem ganger i denne oppgaven. Tre gjentak med *S.t.28b* som modellvirus og to gjentak med $\phi X174$ som modellvirus. De fem gjentakene ble gjort så like som mulig. Oppholdstanken med svartvann fra Kaja studentboliger ble tømt kvelden før anlegget skulle testes, og ble fylt i løpet av natten. Dette ble gjort for at svartvannet skulle være så ferskt som mulig.

I forsøkene ble det brukt 100 liter svartvann. Den første gangen ble dette målt opp med 10 10-litersbøtter, og vannivået ble målt til 56 cm fra bunnen i tanken. De fire neste gangene ble tanken fylt opp til 56 cm.

Hygieniseringsanlegget har tidligere blitt testet av Melesse Eshetu Mogens og Fasil Ejigu Eregno med *E. coli* som indikatorbakterie (Moges & Eregno, manuskript under utarbeiding). I det nevnte forsøket ble svartvannet varmet opp så mye som mulig, og prøver ble tatt ut når den interne temperaturføleren viste 60, 68 og 78 °C. Forsøkene som er gjort i denne oppgaven er utført på samme måte, med samme prøvetakingsregime. I gjentakene med *S.t.28b* ble det bare tatt prøver fra bunnen (2 cm fra bunnen), mens det for gjentakene med $\phi X174$ ble tatt prøver både i bunnen og i toppen (40 cm fra bunnen). Topp-prøven ble tatt først når det ble tatt prøver både av topp og bunn, ettersom de ble forventet lavere viruskonsentrasjon i toppen enn i bunnen. I siste gjentak med $\phi X174$ ble det i tillegg tatt prøve fra bunnen 0,5 og 1 time etter at dieselvarmeren var slått av.

For å få sirkulasjon og å unngå sedimentering av svartvannet i tanken ble en ekstern pumpe (Biltema BP 800 W, maks kapasitet 60 l/min) koblet til (Figur 2.4). En slange (Ø2,5 cm) ble ført ned til bunnen av tanken (2 cm fra bunnen) og koblet til innløpet på pumpa. Utløpet fra pumpa gikk tilbake til toppen av tanken (ca. 10 cm under vannoverflaten). Pumpa stod ved siden av anlegget, og slangene var så korte som mulig, for å unngå varmetap. Det var ikke mulig å kvantifisere sirkulasjonen, den kunne bare beskrives som relativt bra/dårlig. Sirkulasjonspumpa ble slått av under prøvetaking.

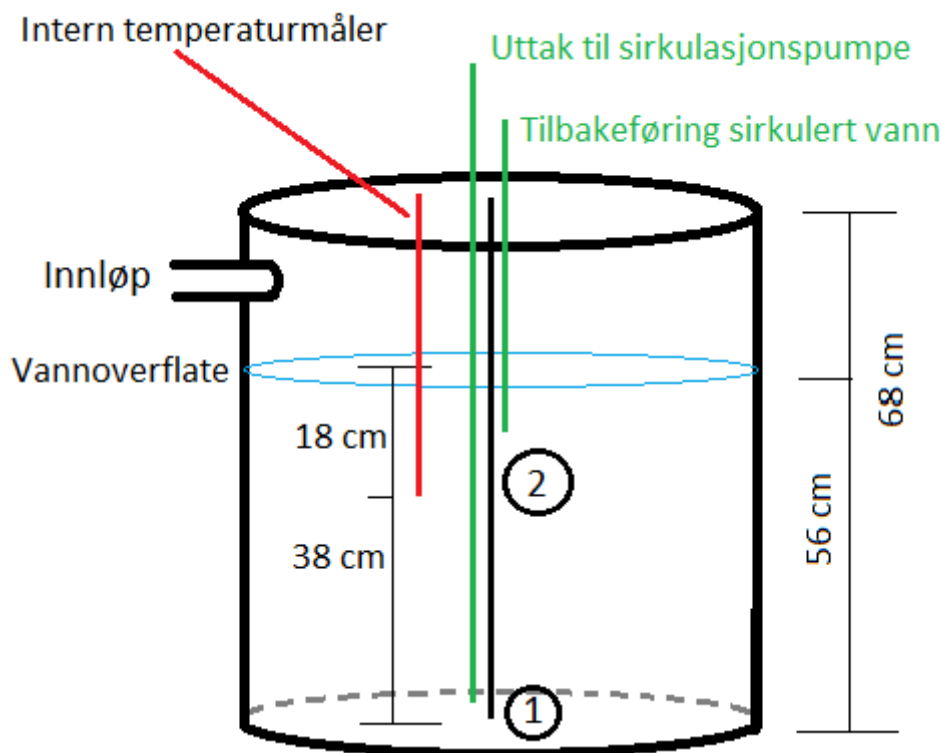


Figur 2.4: Sirkulasjonspumpa som ble brukt. Innløpet var ca. 2 cm fra bunnen, utløpet var ca. 10 cm under vannoverflaten



Figur 2.5: Stang og slange som ble benyttet til prøvetaking. Det røde merket viser hvor høyt stangen skulle løftes for å ta prøver av øverste prøvepunkt.

For å ta prøver ble en tynn stang med en påteipet slange (Ø4 mm, lengde 180 cm, Figur 2.5) ført ned til ønsket nivå fra et hull på toppen av tanken. Et merke viste hvor høyt stangen skulle holdes for å ta prøver av det øvre punktet. Ved prøvetaking fra bunnen ble stangen ført helt til bunns. Det ble benyttet fire sprøyter til prøvetaking (til start, 60, 68 og 78 °C). I det siste gjentaket ble sprøyten for 78 °C også benyttet til prøvene etter 0,5 og 1 time etter at dieselvarmeren var slått av. Mellom prøvetakingene ble slangen lagt i en Erlenmeyerkolbe med vann, og varmet opp i mikrobølgeovn til vannet hadde kookt i tre minutter. Sprøytene ble skylt i varmt vann mellom gjentakene.



Figur 2.6: Illustrasjon av tanken i hygieniseringsanlegget med mål.

Bunnen av tanken er konkav, men dette kommer ikke frem på figuren. (1) prøvepunkt bunn (2 cm fra bunn), (2) prøvepunkt topp (40 cm fra bunn). Termometermålingene med håndholdt termometer ble gjort på samme sted som prøvetakingene.

Materialer:

Svartvann

Pumpe til sirkulasjon (Biltema BP 800 W) og slanger (Ø2,5 cm)

Sentrifugerør (Greiner, 50 ml)

Sprøyter (BD plastipakTM) og slange for prøvetaking (Ø4 mm)

Isoporboks med is

Termometer (TENMA 72-7715) med K-type prober

Prosedyre:

1. Tanken med svartvann fra Kaja studentboliger ble tømt kvelden før anlegget skulle testes, og fylt i løpet av natten
2. Hygieniseringsanlegget ble fylt halvveis opp med svartvann, og sirkulasjonspumpa ble startet.

3. Virusløsningen ble først blandet ut i 1 liter svartvann i et målebeger. Dette ble så tilført tanken, og tanken ble videre fylt med svartvann til nivået var 56 cm (målt fra bunnen).
4. Etter 10 minutter med sirkulasjon ble første prøve tatt, og dieselvarmeren startet.
5. Temperatur ble notert hvert 10. minutt.
6. Underveis i oppvarmingen ble prøvene tatt da den interne temperaturføleren viste 60, 68 og 78 °C. Slangen og sprøyta ble skylt med vann fra prøveområdet tre ganger ved å pumpe med sprøyta, før vannet fikk renne fritt (hevert-prinsippet). Prøvene ble tappet på 50 ml sentrifugerør, avkjølt på smeltende is og lagt i kjøleskap (4 °C).
7. Dieselvarmeren ble slått av når temperaturen nådde 78 °C. Tanken ble tømt og spylt med springvann for klargjøring til neste runde. Sirkulasjonspumpa ble brukt for å tømme tanken helt, deretter ble også den spylt.

I de to gjentakene med ϕ X174 oppstod det skumdannelse. Skummet ble fjernet ved å pumpe det ut fra innløpet med samme pumpe som ble brukt til å fylle tanken. Dette førte til at vannivået i tanken ble redusert under forsøket. I slutten av første gjentak var nivået redusert til 48 cm. Vannivået ved forsøksslutt for andre gjentak, i.e. én time etter at varmen var slått av, var 38 cm. Altså ble omtrent 14 liter svartvann pumpet ut i løpet av første gjentak, og 32 liter i løpet av andre gjentak.

Viruskonsentrasjonene ble funnet som beskrevet i kapittel 2.6.3 og 2.7.3. Prøvene med *S.t.28b* ble analysert dagen etter forsøket. Noen prøver måtte dyrkes om igjen, da fortytningene som ble dyrket ikke ga petriskåler med 20 – 200 plakk. Dette ble gjort fire dager etter forsøket. Gjentakene med *S.t.28b* ble gjort før sonikeringsforsøket (jfr. Figur 2.1). Basert på den kunnskapen forskergruppa hadde på det tidspunktet, ble det valgt å sonikere 10^{-1} -fortytningene i 1 minutt før de ble fortynt videre. Prøvene med ϕ X174 ble analysert for virus samme dag og for tørrstoff etter tre og to dager.

2.4 Labskala hygieniseringsforsøk

For å kunne vurdere virusenes egnethet som modellvirus har varmetoleransen blitt testet.

Forsøket med *S.t.28b* og forsøket med ϕ X174 ble gjort så like som mulig. Virus ble tilsatt til 200 ml svartvann eller springvann, og dette ble varmet opp i vannbad til 60, 70 eller 80 °C (alle ± 2 °C) i Erlenmeyerkolber. Tiden måles fra prøvene når ønsket temperaturintervall (dvs. 58, 68 og 78 °C). For hver kombinasjon av temperatur og virus ble to kolber med svartvann og en kolbe med springvann varmet opp, totalt ni kolber for hvert virus. Underveis ble det tatt ut prøver etter prøvetakingsregimet i Tabell 2.1.

Tabell 2.1: Prøvetakingsregime for labskala hygieniseringsforsøk. Tiden måles fra prøvene når ønsket temperaturintervall.

60 °C:	0 min	30 min	60 min	90 min	
70 °C:	0 min	15 min	30 min	45 min	
80 °C:	Ved 60 °C	0 min	5 min	10 min	15 min

Materialer:

Svartvann

Erlenmeyerkolber (250 ml) (autoklavert)

Vannbad (GFL 1083)

Termometer (TENMA 72-7715) med K-type prober

UGB-flasker (autoklavert)

Isoporboks med smeltende is

Prosedyre:

1. Tanken med svartvann fra Kaja studentboliger ble tømt kvelden før svartvann skulle hentes, og fylt i løpet av natten.
2. 200 ml svartvann ble målt opp i målesylinder og overført til seks Erlenmeyerkolber. Kolbene ble umiddelbart fraktet til mikrobiologilaboratoriet og satt i kjøleskap.
3. På mikrobiologilaboratoriet ble 200 ml kaldt springvann målt opp i målesylinder og overført til 3 kolber. Disse ble også satt i kjøleskap.
4. Virus ble tilsatt slik:
 - a. *S.t.28b* (1. februar 2015): 0,5 ml av en 10^{-1} -fortynning av virusløsningen (konsentrasjon 4×10^{10} pfu/ml, kapittel 2.6.1) i hver kolbe.
 - b. ϕ X174 (6. mars 2015): 8 ml virusløsning (konsentrasjon 1×10^8 pfu/ml, kapittel 2.7.2) i hver kolbe.

5. Tre prøver ble tatt ut; fra to kolber med svartvann og én med springvann. Felles startkonsentrasjon for alle kolbene ble funnet som gjennomsnittet av konsentrasjonene i disse kolbene.
6. Kolbene ble satt tilbake i kjøleskapet frem til de skulle brukes.
7. Vannbadet ble varmet opp til 60 °C, ristingen ble satt til 100 rpm.
8. To kolber med svartvann og én med springvann ble satt i vannbadet. Kolbene stod i vannbadet samtidig. Termometeret (TENMA 72-7715) målte temperaturen i den ene kolben med svartvann. Under oppvarmingen ble kolbene ristet ekstra for hånd for å ha jevn temperatur.
9. Første prøve ble tatt da temperaturen nådde 58 °C (nedre grense i intervallet 60 °C ± 2 °C). Deretter ble prøvene tatt etter prøvetakingsregimet i Tabell 2.1. Prøvene ble tatt i samme rekkefølge som kolbene ble satt i vannbadet. 5 ml prøve ble overført til sterile UGB-flasker, som ble nedkjølt på smeltende is før de ble plassert i kjøleskap (4 °C).

Punkt 7 – 9 ble gjentatt for 70 og 80 °C. I forsøkene med 70 og 80 °C ble kolbene plassert i vannbadet med ett minuts mellomrom for å kompensere for tidsbruken ved prøvetaking. Rekkefølgen de ble satt ned i vannbadet var: kolben med svartvann og temperaturmåling, den andre kolben med svartvann og til slutt kolben med springvann.

For å se hvor mye φX174 inaktiveres i romtemperatur ble virus tilsatt 100 ml svartvann i to Erlenmeyerkolber (100 ml). Prøver ble tatt ut umiddelbart etter omrøring, og oppbevart i kjøleskap (4 °C). Kolbene stod i romtemperatur i 7 timer, og nye prøver ble tatt.

Analysen av viruskonsentrasjoner (kapittel 2.6.3 og 2.7.3) ble utført samme dag. Noen prøver måtte likevel dyrkes om igjen dagen etter, da fortyningene som ble dyrket ikke ga petriskåler med 20 – 200 plakk.

2.5 Sonikeringsforsøk

For å undersøke om sonikering av svartvann med *S.t.28b* kunne øke viruskonsentrasjonen i prøvene, ble det gjennomført et forsøk hvor prøver ble sonikert med ulik varighet.

Sonikeringsapparatet som ble benyttet var Transsonic 420/H fra Elma. Det sender ut lydbølger med en frekvens på 35 kHz. Apparater av samme type har blitt brukt i flere andre studier for å løse opp biofilm, både på NMBU og i andre forskningsgrupper (for eksempel Barros et al. 2013; Ferreira et al. 2013; Fontenete et al. 2013; Scott & Skaarer 2005).

Materialer:

Svartvann

Erlenmeyerkolbe (500 ml)

Ristebord

Sterile UGB-flasker

Sonikeringsapparat (Transsonic 420/H, Elma)

Prosedyre:

1. 400 ml svartvann ble hentet i en Erlenmeyerkolbe (500 ml).
2. Kolben ble tilsatt 1 ml av en 10^{-3} -fortynning av virusløsningen (konsentrasjon 4×10^{10} pfu/ml, kapittel 2.6.1). Dette ble blandet på ristebord (150 rpm) i 30 minutter.
3. 12 UGB-flasker ble fylt med 10 ml svartvann (vha. pipette).
4. Sonikatoren ble fylt med kaldt springvann til merket «max».
5. UGB-flaskene med ufortynnet svartvann ble sonikert i 0; 0,5; 1; 2; 3; 4 eller 5 minutter. Svartvannet fra én flaske ble fortynnet før neste UGB-flaske ble sonikert. Fortynningene ble oppbevart i kjøleskap til de skulle dyrkes.
6. Antall virus i løsningene ble funnet ved virustelling, som beskrevet i kapittel 2.6.3, samme dag.

2.6 Virusanalyse *S.t.28b*

Metoden som ble brukt for å analysere konsentrasjonen av *S.t.28b* følger dobbelagar-metoden beskrevet i Allestam og Carlander (2000), men med noen unntak. Metoden er derfor beskrevet under. KPG, KPG-agar og Softagar er beskrevet i Vedlegg A.

2.6.1 Vertskultur

Vertsbakterien til *S.t.28b* er *S. typhimurium* type 5 (Lilleengen 1948). Denne ble fryst ned i glyserol (-80 °C) av Ekaterina Yarovitsyna i forbindelse med et annet forsøk som gikk samtidig som arbeidet med denne oppgaven. Frysekulturer av *S. typhimurium* type 5 ble tint i romtemperatur før bruk.

2.6.2 Propagering

Virusene som ble brukt til forsøket med hygieniseringsanlegget ble propagert av Vegard Nilsen i september 2014, og var oppbevart i kjølerom (4 °C) siden det. Av disse virusene ble det propagert nye virus til forsøkene med sonikering og varmetoleranse.

Det ønskede forholdet mellom virus og bakterier i starten av propageringen er 1/200 (Allestam & Carlander 2000). Det ble ikke undersøkt konsentrasjonen av bakterier i løsningen, men det ble gjettet på en konsentrasjon på $2 \cdot 10^8$ celler/ml.

Materialer:

Erlenmeyerkolber (300 ml) med 75 ml KPG-næringsmedium (autoklavert) (Vedlegg A)

Sterile, tomme Erlenmeyerkolber (300 ml)

KPG-næringsmedium (autoklavert)

Kloroform

Sprøyter (60 ml, BD plastipakTM) og sprøytefilter (0,45 μ m, Sarsted)

Prosedyre:

1. 100 μ l vertsbakteriekultur ble overført til 75 ml KPG (forvarmet til 37 °C) og satt til inkubering i vannbad (37 °C, med risting 100 rpm) over natten (18 ± 4 timer).
2. Dagen etter ble det laget en 1:10 fortykning av denne, ved å overføre 8,33 ml fra overnattkulturen til en ny Erlenmeyerkolbe med 75 ml KPG (forvarmet til 37 °C). Denne ble inkubert i 2 timer.
3. I ti tomme kolber (300 ml) ble det tilsatt 5 ml bakteriekultur fra kulturen i punkt 2.
4. 1 ml av en 10^{-3} -fortyning av virusløsningen laget av Vegard Nilsen (konsentrasjon 6×10^9 pfu/ml) ble tilsatt i kolbene.
5. Dette ble inkubert i 12 minutter, deretter ble det fylt på med ca. 100 ml. KPG, og inkubert videre i 4 timer.
6. 1 ml kloroform ble tilsatt hver kolbe. Dette fikk reagere i 10 minutter i vannbad med risting, før kolbene ble satt i kjøleskap (4 °) til neste dag.
7. Innholdet i kolbene ble blandet, og løsningen ble filtrert gjennom 0,45 μ m sprøytefilter.
8. Viruskonsentrasjonen ble bestemt som beskrevet i kapittel 2.6.3.

Denne propageringen ga virusløsning med konsentrasjon 4×10^{10} pfu/ml. Virusløsningen ble oppbevart i kjøleskap (4 °C) til den skulle benyttes.

2.6.3 Virustelling

Prinsippene for denne metoden er beskrevet i introduksjonen til metodekapittelet. For å bestemme konsentrasjonen av *S.t.28b* ble virusene dyrket i petriskåler med *S. typhimurium* type 5 som vertsbakterie. Antall virus ble bestemt ved å telle antall plakk i bakterielaget som viste seg etter 18 timer inkubering. Gjennomføringen fulgte dobbelagar-metoden som er beskrevet i Allestam og Carlander (2000), men med noen unntak. Unntakene gjelder spesielt punkt 1,2, 4 og 5. Flere kolber med vertskultur ble laget til dersom mange prøver skulle dyrkes.

Materialer:

Erlenmeyerkolber (300 ml) med 75 ml KPG-næringsmedium (autoklavert) (Vedlegg A)

UGB-flasker med 9 ml fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl) (autoklavert)

Softagar (Vedlegg A)

Sentrifugerør (15 ml, Greiner)

Petriskåler (9 cm, Heger AS) forhåndsstøpt med 18 ml KPG-agar (Vedlegg A)

Prosedyre:

1. 100 µl vertsbakteriekultur ble overført til 75 ml KPG (forvarmet til 37 °C) og satt til inkubering i vannbad (37 °C, med risting 100 rpm) over natten (18 ± 4 timer).
2. Dagen etter ble det laget en 1:10 fortynning av denne, ved å overføre 8,33 ml fra overnattenkulturen til en ny kolbe med 75 ml KPG (forvarmet til 37 °C). Denne ble inkubert i 4-6 timer, avhengig av hvor lengde det var til prøvene var klar til å dyrkes.
3. Prøvene ble fortynnet i fysiologisk saltvann slik at den antatte viruskonsentrasjonen var 40 – 400 pfu/ml.
4. Flasker med 100 ml softagar ble kokt i 30 minutter, og satt til avkjøling i varmeskap (55 °C). Når softagaren var avkjølt, ble 4 ml softagar helt i sentrifugerør (15 ml), og satt tilbake i varmeskapet.
5. 0,5 ml prøve og 0,5 ml vertsbakteriekultur ble tilsatt i røret og blandet. Hele innholdet ble helt på petriskåler med KPG. Det ble laget to skåler av hvert fortynningssteg som skulle dyrkes.
6. Petriskålene tørket med lokket delvis av, til kondensen på lokket var borte, før de ble pakket i plast og inkubert opp-ned i varmeskap (37 °C) i 18 ± 4 timer.
7. Petriskåler med under 300 plakk ble telt, hvert plakk ble antatt å stamme fra ett virus i prøven.

Viruskonsentrasjonen ble beregnet med formel 2.3. Dersom fortynningene som ble dyrket ikke ga 20 – 200 plakk på petriskålene, ble andre fortynninger av samme prøve dyrket dagen etter. I slutten av analysen ble en prøve av bakteriekulturen dyrket for å kontrollere at denne ikke var blitt kontaminert av virus under analysen; det ble den ikke.

2.7 Virusanalyse ϕ X174

Metoden som ble brukt for å analysere konsentrasjonen av ϕ X174 følger dobbelagar-metoden beskrevet i ISO-standard 10705-2:2000 (ISO 2000), men med noen unntak. Metoden er derfor beskrevet under. MSA, ssMSA, MSB og nalidiksinsyre er beskrevet i Vedlegg B.

2.7.1 Vertskultur

Som vertskultur for ϕ X174 ble *E. coli* CN13 (ATCC:700609) benyttet. Denne ble fryst ned i glyserol (-80 °C) av Arve Heistad i 2007. For å ha en fersk vertskultur, ble det fryst ned nye ampuller med arbeidskultur av *E. coli* CN13 i log-fasen. Disse kulturene ble senere brukt for å lage vertskultur til propagering og virustelling.

Materialer:

Erlenmeyerkolber (300 ml) med 50 ml MSB (autoklavert) (Vedlegg B)

Sterile fryserør (1,5 ml)

Prosedyre:

1. Én ampulle med *E. coli* CN13 ble inkubert i 50 ml MSB (forvarmet til 37 °C) i 24 timer i vannbad (37 °C, med risting 100 rpm).
2. 400 ml av denne kulturen ble overført til en ny Erlenmeyerkolbe med 50 ml MSB (forvarmet til 37 °C) og inkubert i 5 timer i vannbadet.
3. 1 ml bakteriesuspensjon ble overført til fryserør, og fryst ned ved -80 °C.

Frysekulturer av *E. coli* CN13 ble tint i romtemperatur før bruk til propagering og virustelling.

2.7.2 Propagering

Frysekultur av ϕ X174 ble donert av Mette Myrmell. Denne ble fraktet på smeltende is fra Adamstuen til Ås, og ϕ X174 ble propagert samme dag. Det ble forsøkt flere varianter av propageringen; den metoden som ga høyest viruskonsentrasjon er gjengitt under. Virusene som ble propagert ble benyttet til alle forsøk med ϕ X174.

Materialer:

Erlenmeyerkolber (300 ml) med 50 ml MSB (autoklavert) (Vedlegg B)

Kloroform

Sentrifuge (Beckman Coulter® Allegra™ 25R) og Sentrifugerør (50 ml, Greiner)

Sprøyter (60 ml, BD plastipak™) og sprøytefilter (0,45 µm, Sarsted)

Prosedyre:

1. Én ampulle med *E. coli* CN13 ble inkubert i 50 ml MSB (forvarmet til 37 °C) i 18 timer i vannbad (37 °C, med risting 100 rpm).
2. Fire Erlenmeyerkolber med 50 ml MSB ble forvarmet til 37 °C, og ble tilsatt 0,5 ml av kulturen som hadde stått i 18 timer. Disse inkuberte videre i 1,5 timer.
3. Kolbene ble tilsatt φX174 til en konsentrasjon på 10⁷ pfu/ml og inkubert videre i 5 timer.
4. 4 ml kloroform ble tilsatt hver kolbe. Dette fikk reagere i 10 minutter i vannbad med risting, før kolbene ble satt i kjøleskap (4 °) til neste dag.
5. Løsningen ble overført til sentrifugerør (50 ml) og sentrifugert ved 3000 rpm i 20 minutter.
6. Supernatantene fra alle rør ble blandet, og filtrert gjennom 0,45 µm sprøytefilter.
7. Viruskonsentrasjonen ble bestemt som beskrevet i kapittel 2.7.3

Denne propageringen ga virusløsning med konsentrasjon 1x10⁹ pfu/ml. Virusløsningen ble oppbevart i kjøleskap (4 °C) til den skulle benyttes.

2.7.3 Virustelling

Prinsippene for denne metoden er beskrevet i introduksjonen til metodekapittelet. For å bestemme konsentrasjonen av φX174 ble virusene dyrket i petriskåler med *E. coli* CN13 som vertsbakterie. Antall virus ble bestemt ved å telle antall plakk i bakterielaget som viste seg etter 6 timer inkubering. Gjennomføringen fulgte dobbelagar-metoden som er beskrevet i ISO-standard 10705-2:2000 (ISO 2000), men med noen unntak. Unntakene gjelder spesielt punkt 1, 5, 6 og 7. Nalidiksinsyre (SIGMA-ALDRICH N8878-5G) ble brukt som antibiotikum, for å unngå vekst av andre bakterier enn *E. coli* CN13. Dersom mange prøver skulle dyrkes, ble flere kolber med vertskultur laget til.

Materialer:

Erlenmeyerkolber (300 ml) med 50 ml MSB (autoklavert) (Vedlegg B)

UGB-flasker med 9 ml fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl) (autoklavert)

ssMSA (Vedlegg B)

1M CaCl₂-løsning, filtrert gjennom 0,22 µm sprøytefilter

Nalidiksinsyre (25 mg/ml) (Vedlegg B)

Sentrifugerør (15 ml, Greiner)

Petriskåler (9 cm, Heger AS) forhåndsstøpt med 18 ml MSA (Vedlegg B)

Prosedyre:

1. Én ampulle med *E. coli* CN13 ble inkubert i 50 ml MSB (forvarmet til 37 °C) i 3 timer i vannbad (37 °C, med risting 100 rpm). Bakteriekulturen ble oppbevart på smeltende is, og brukt i løpet av få timer.
2. Prøvene ble fortynnet i fysiologisk saltvann slik at den antatte viruskonsentrasjonen var 20 – 200 pfu/ml.
3. Flasker med 100 ml ssMSA (softagar) ble kokt i 30 minutter, og satt til avkjøling i varmeskap (55 °C).
4. Når softagaren var avkjølt, ble det tilsatt 0,6 µl 1M CaCl₂-løsning. Dersom det skulle dyrkes svartvannsprøver, ble det også tilsatt 1 ml nalidiksinsyre.
5. 4 ml ssMSA ble helt i sentrifugerør (15 ml), og satt tilbake i varmeskapet.
6. 1 ml prøve og 1 ml vertsbakteriekultur ble tilsatt i røret og blandet. Hele innholdet ble helt på petriskåler med MSA. Det ble laget to skåler av hvert fortynningssteg som skulle dyrkes.
7. Petriskålene tørket med lokket delvis av, til kondensen på lokket var borte, før de ble pakket i plast og inkubert opp-ned i varmeskap (37 °C) i 6 timer.
8. Petriskåler med under 300 plakk ble telt, hvert plakk ble antatt å stamme fra ett virus i prøven.

Viruskonsentrasjonen ble beregnet med formel 2.3. Dersom fortykningene som ble dyrket ikke ga 20 – 200 plakk på petriskålene, ble andre fortyninger av samme prøve dyrket dagen etter. I slutten av analysen ble en prøve av bakteriekulturen dyrket for å kontrollere at denne ikke var blitt kontaminert av virus under analysen; det ble den ikke.

2.8 Tørrstoffanalyser

Prøvene fra fullskala hygieniseringsforsøk med φX174 som modellvirus ble analysert for totalt tørrstoff (TS), suspendert tørrstoff (SS) og flyktig suspendert tørrstoff (FSS).

2.8.1 Totalt tørrstoff

Totalt tørrstoff (TS) er alt materiale som er igjen fra vannprøven når vannet i prøven er fordampet. For å finne totalt tørrstoff ble 20 ml av vannprøven tørket ved 105 °C.

Materialer:

Tørkeskap (Termaks)

Aluminiumformer (Ø5,5 cm)

Prosedyre:

1. Aluminiumformene ble vasket og veiet.
2. 20 ml vannprøve ble overført til aluminiumformene og tørket i varmeskap (105 °C) i tre timer.
3. Formene ble veiet, og totalt tørrstoff ble regnet ut (formel 2.9):

$$TS \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{\text{vekt tørr aluminiumsform (g)} - \text{vekt tom aluminiumsform (g)}}{0,020 \text{ liter}} \quad (2.9)$$

2.8.2 Suspendert tørrstoff

Suspendert tørrstoff (SS) er partikler som holdes flytende i vannet, og som kan filtreres ut. For å finne suspendert tørrstoff ble 7 – 20 ml av vannprøven filtrert gjennom 1,2 µm glassfiberfilter og tørket.

Materialer:

Vakuumpumpe (VWR VP86) med filteroppsats

Glassfiberfilter (Whatman® GF/C 1,2 µm)

Tørkevekt (Ohaus MB-45)

Prosedyre:

1. Tørt filter ble veiet.
2. 7 – 20 ml vannprøve ble filtrert gjennom 1,2 µm glassfiberfilter. Volumet ble avgjort avhengig av hvor tykk prøven så ut.
3. Filteret ble tørket i tørkevekten (105 °C, til en konstant vekt var oppnådd), og veiet.

4. Suspendert tørrstoff ble regnet ut (formel 2.10):

$$SS \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{\text{vekt tørt filter med prøve (g)} - \text{vekt tørt filter (g)}}{\text{volum filtrert (l)}} \quad (2.10)$$

2.8.3 Flyktig suspendert tørrstoff

Glødetap er et mål på organisk stoff i prøven. Prøven varmes opp til 550 °C i 30 min, og det organiske stoffet forbrennes. Asken som er igjen er uorganiske stoffer. Flyktig suspendert tørrstoff (FSS) er glødetap av suspendert tørrstoff. For å finne flyktig suspendert tørrstoff ble filteret fra kapittel 2.8.2 varmet opp til 550 °C i 30 min.

Materiale:

Forbrenningsovn (W.C. Heraeus Hanau MR170)

Keramikkskåler

Eksikator med silikagel

Prosedyre:

1. Keramikkskålene ble vasket og veiet.
2. Filteret med suspendert stoff ble lagt i keramikkskål og plassert i ovnen (550 °C) i 30 minutter.
3. Keramikkskålene ble kjølt ned i en eksikator med silikagel
4. Keramikkskålene ble veiet, og flyktig suspendert tørrstoff ble regnet ut som differansen mellom vekten av skålene med filter før og etter forbrenning.
5. Flyktig suspendert stoff ble også regnet ut som prosent av suspendert tørrstoff (formel 2.11):

$$FSS (\%) = \frac{FSS}{SS} \times 100 \% \quad (2.11)$$

3 Resultater

3.1 Fullskala hygieniseringsforsøk

Hygieniseringsanlegget ble testet tre ganger med tilsetning av *S.t.28b* og to ganger med ϕ X174. Anlegget brukte 95 – 130 minutter på å varme opp 100 liter svartvann til 73 °C. *S.t.28b* ble ikke inaktivert i noen av gjentakene. I det første gjentaket med ϕ X174 ble viruskonsentrasjonen redusert med 6 og 4 log₁₀ i henholdsvis topp og bunn av tanken. I det andre gjentaket ble ϕ X174 inaktivert med minst 6 log₁₀ både i toppen og bunnen.

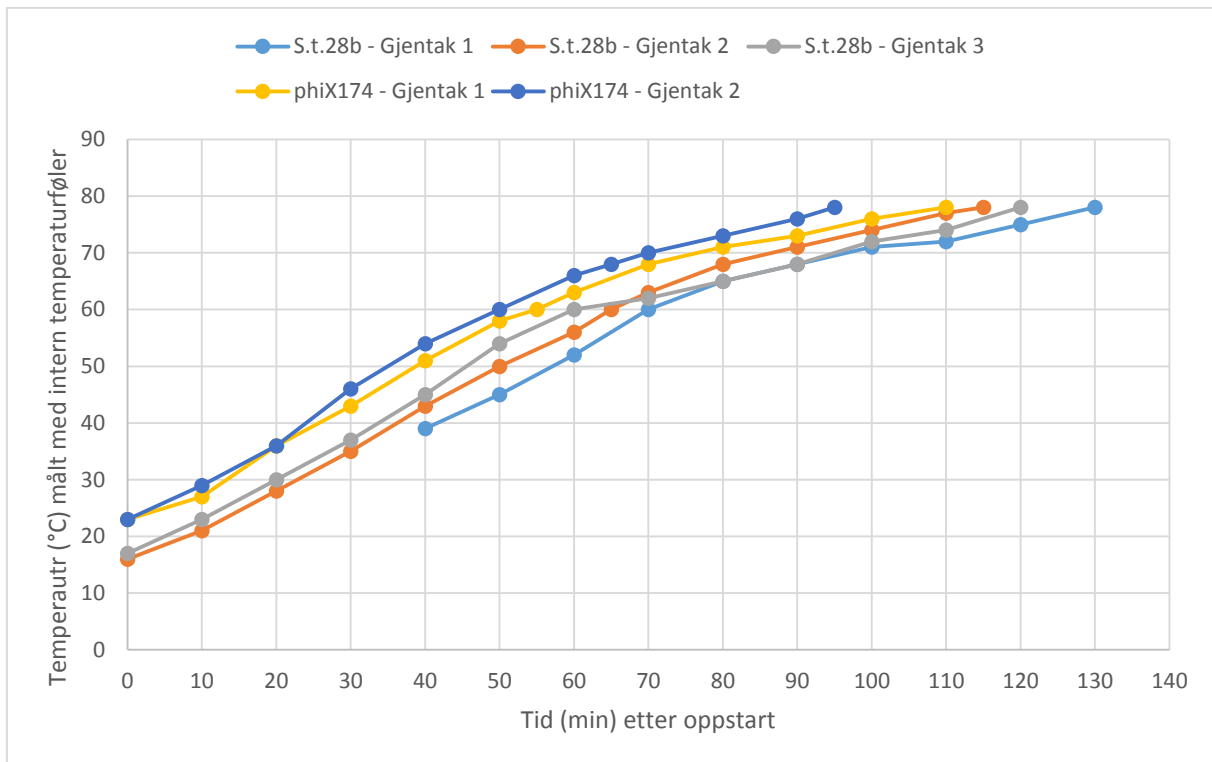
3.1.1 Temperatur

Målinger gjort med enkle termometre i gjentakene med *S.t.28b* avslørte at den interne temperaturføleren ikke gav riktige verdier. Under gjentakene med ϕ X174 ble temperaturen målt med håndholdt, kalibrert termometer med to prober. Disse målingene viste at den interne temperaturføleren viser gjennomsnittlig 5 °C for mye. Alle temperaturer som er målt av anlegget vil derfor fra nå av bli markert med en *, for å skille disse fra korrekte temperaturer.

Den eneste registreringen av temperaturen i hygieniseringsanlegget under alle gjentak er gjort med anleggets egen temperaturføler. Det tok 95 – 130 minutter å varme 100 liter svartvann opp til 73 °C (78* °C) (Figur 3.1). Svartvannet som ble brukt i gjentakene med ϕ X174 hadde en høyere starttemperatur enn gjentakene med *S.t.28b*, og brukte kortere tid på å nå 73 °C. Svartvannet i oppholdstanken på Fløy IV hadde en temperatur på 10 °C under gjentakene med *S.t.28b* og 17 °C under gjentakene med ϕ X174.

Ved oppstarten av første gjentak med *S.t.28b* var det vanskelig å få kontinuerlig drift på dieselvarmeren. Dette førte til at det tok 1,5 time å nå 40* °C; dieselvarmeren hadde da gått i ca. 40 minutter. Etter dette hadde den et stopp på 10 minutter under oppvarmingen.

Temperaturene fra dette gjentaket er derfor bare lagt inn fra 40 minutter i Figur 3.1. Alle primærdata for alle gjentak finnes i Vedlegg C.

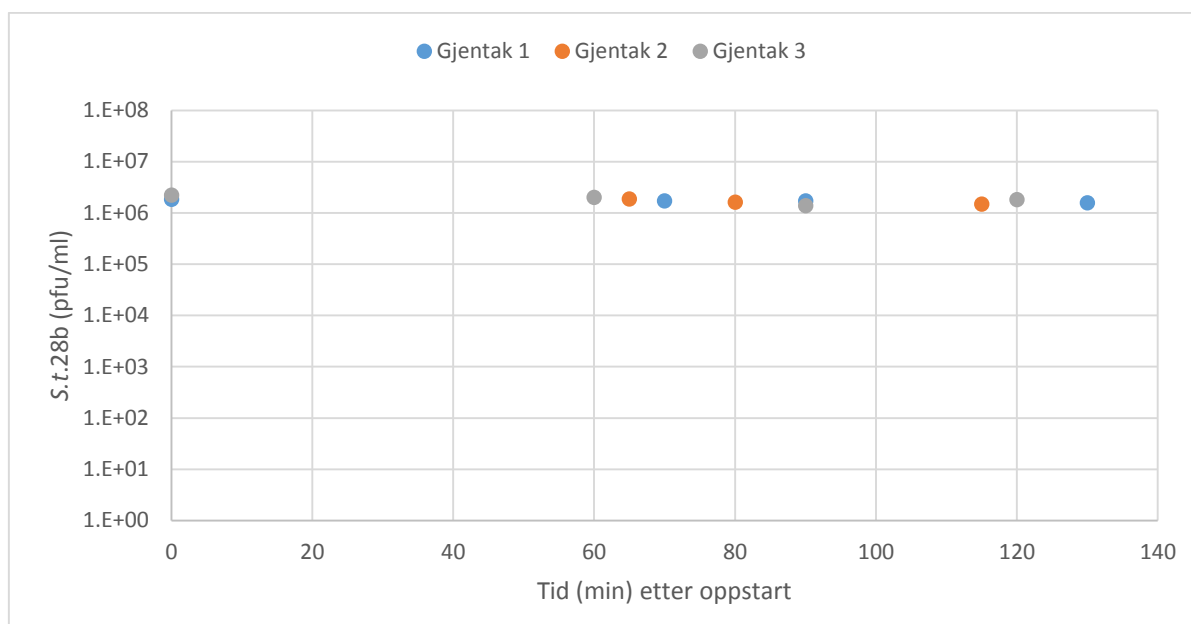


Figur 3.1: Temperatur i hygieniseringsanlegget (målt med anleggets egen temperaturføler) som funksjon av tiden for alle fem gjentak.

Under det siste gjentak med ϕ X174 ble temperaturen målt i toppen og bunnen av tanken. Varmen i anlegget var jevnt fordelt frem til temperaturen kom over 60 °C, da steg temperaturen mer i toppen enn i bunnen (Figur 3.5).

3.1.2 Forsøk med S.t.28b

Viruskonsentrasjon i anlegget som funksjon av tid, for alle tre gjentak, er vist i Figur 3.2. For alle gjentakene synker viruskonsentrasjonen med tiden, unntatt i gjentak tre, der konsentrasjonen er høyere ved 78* °C enn for 68* °C. Virusinaktivering fra start til 78* °C er i størrelsesorden 0,1 log₁₀ for alle gjentakene.



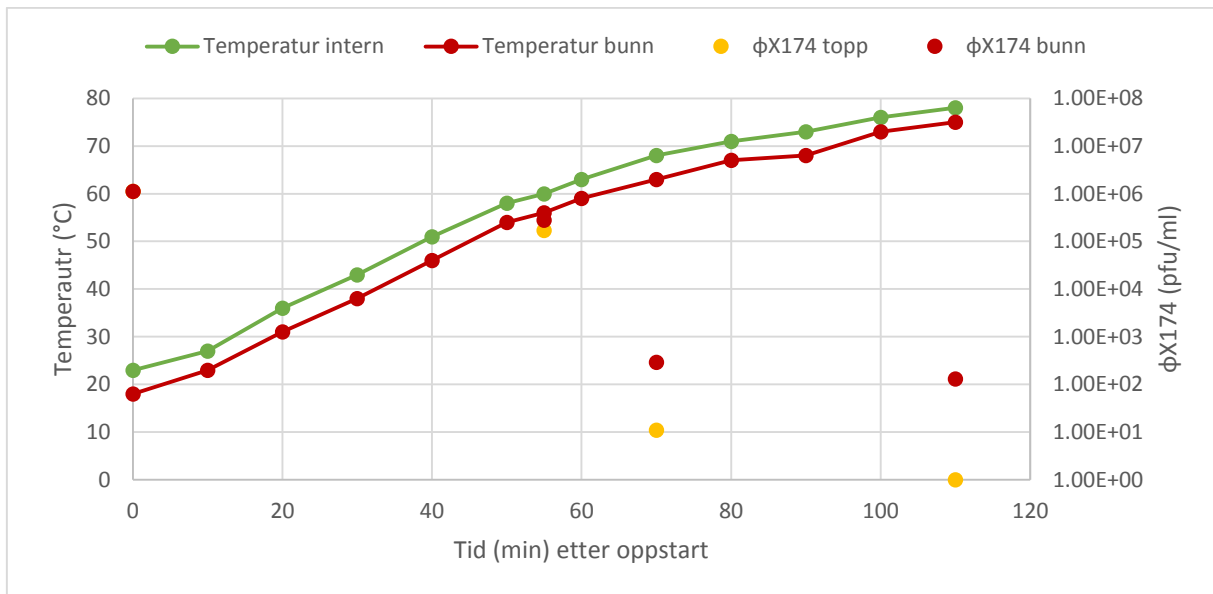
Figur 3.2: Viruskonsentrasjon (S.t.28b) som funksjon av tid i hygieniseringsanlegget.

3.1.3 Forsøk med ϕ X174

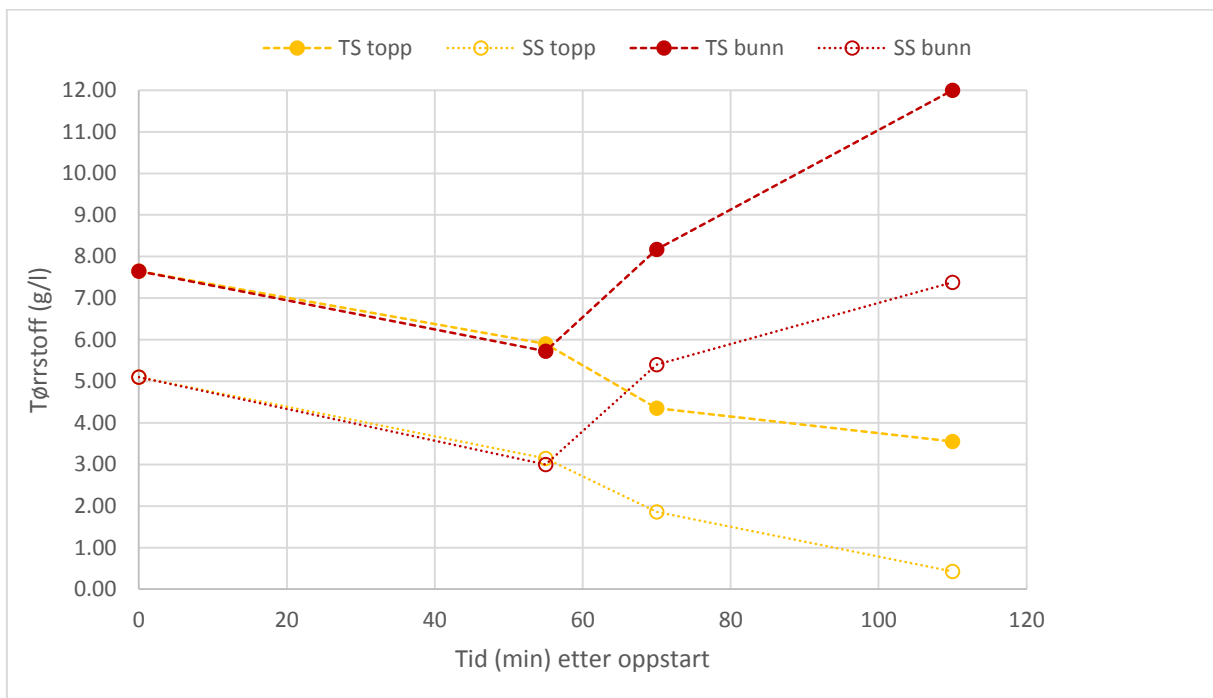
Under gjentakene med ϕ X174 ble temperaturen registrert med et kalibrert termometer i tillegg til anleggets egen temperaturføler. I tillegg til viruskonsentrasjon, ble alle prøvene analysert for totalt tørrstoff, suspendert tørrstoff og flyktig suspendert tørrstoff. Alle prøvene hadde flyktig suspendert tørrstoff mellom 90 og 100 % av suspendert tørrstoff.

I begge gjentakene med ϕ X174 skummet svartvannet. Dette ble pumpet ut fra innløpet på tanken, og førte til at vannivået i tanken ble redusert. Omtrent 14 liter svartvann ble pumpet ut i løpet av første gjentak, og 32 liter i løpet av andre gjentak.

I det første gjentaket med ϕ X174 var det fra ca. 60 minutter og ut forsøket dårlig sirkulering av svartvannet, på grunn av problemer med sirkulasjonspumpa. Dette førte til sedimentasjon av partikler i tanken (Figur 3.4). Analysen viser at virusene ble inaktivert i toppen, der det var tynt vann, men ikke i bunnen, der vannet var tykkere (mye partikler) (Figur 3.3). Svartvannet var homogent til og med 55 minutter ut i forsøket, men etter dette startet partikler å sedimentere (Figur 3.4). Totalt tørrstoff i bunnen steg til først 8 og så 12 g/l, mens totalt tørrstoff i toppen fortsatte å synke, ned til 3,5 g/l. I toppen var viruskonsentrasjonen under deteksjonsgrensen etter 110 minutter; det vil si mer enn 6 \log_{10} reduksjon. I bunnen var viruskonsentrasjonen 4 \log_{10} lavere ved slutt enn ved start, men bare 0,3 \log_{10} reduksjon skyldtes inaktivering de siste 40 minuttene, med temperaturer i bunnen på over 60 °C.



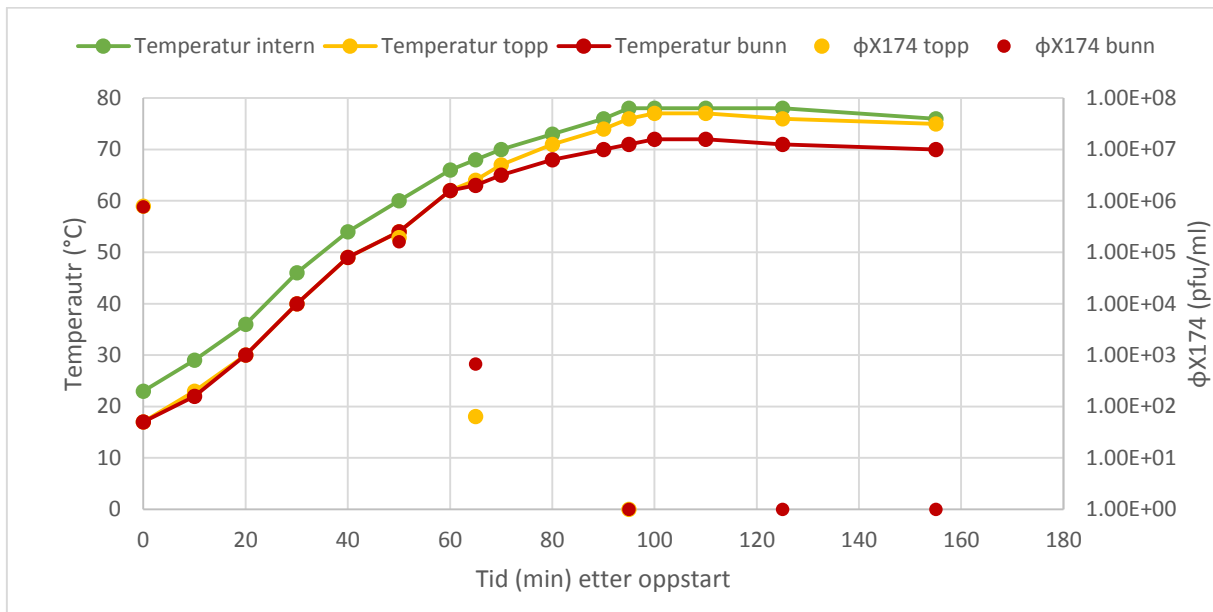
Figur 3.3: Temperatur og viruskonsentrasjon (ϕ X174) i hygieniseringsanlegget som funksjon av tiden under første gjentak med ϕ X174.



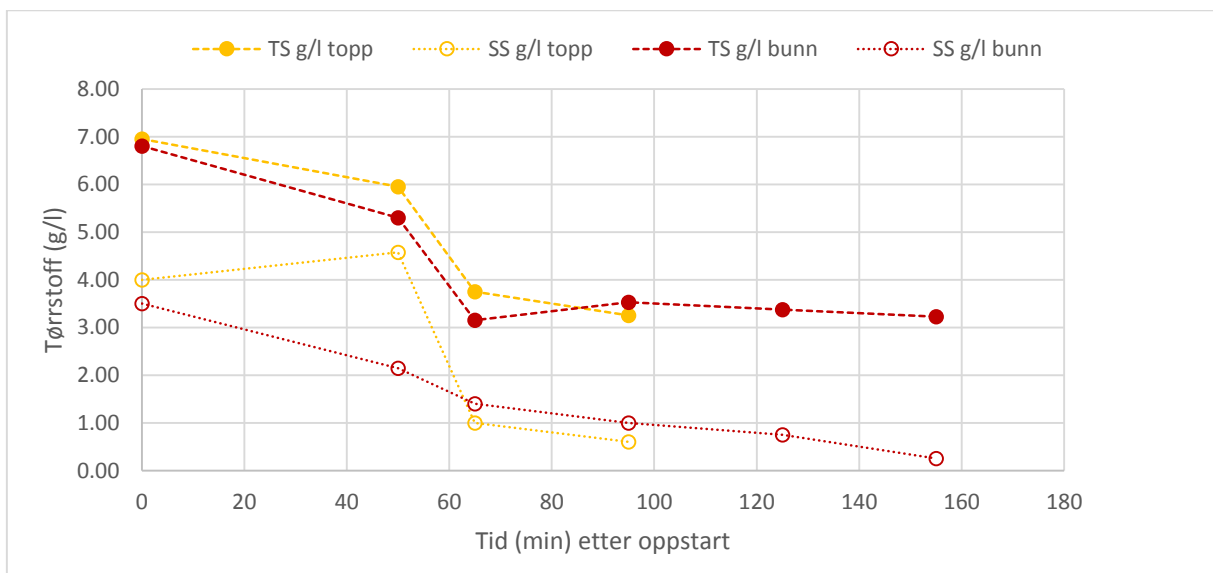
Figur 3.4: Totalt tørrstoff (TS) og suspendert tørrstoff (SS) i prøvene som funksjon av tiden under første gjentak med ϕ X174.

I det andre gjentak med ϕ X174 fungerte sirkulasjonspumpa godt i hele forsøket. Både viruskonsentrasjonen (Figur 3.5) og tørrstoffinnholdet (Figur 3.6) viser at svartvannet var homogent i hele forsøket. Dette gjentaket hadde den raskeste oppvarmingen til 78* °C, dette tok 95 minutter. Temperaturen etter 95 minutter var 76 °C og 71 °C i henholdsvis toppen og

bunnen av tanken. I løpet av oppvarmingstiden ble ϕ X174 inaktivert til under deteksjonsgrensen både i toppen og bunnen; dette tilsvarer minst 6 \log_{10} reduksjon. Dieselvarmeren ble slått av da temperaturføleren viste 78* °C (95 minutter etter oppstart), og det ble tatt prøver 0,5 og 1 time etter dette. Det var ikke detekterbare viruskonsentrasjoner i disse prøvene.



Figur 3.5: Temperatur og viruskonsentrasjon (ϕ X174) i hygieniseringsanlegget som funksjon av tiden under andre gjentak med ϕ X174.



Figur 3.6: Totalt tørrstoff (TS) og suspendert tørrstoff (SS) i prøvene som funksjon av tiden under andre gjentak med ϕ X174.

3.2 Labskala hygieniseringsforsøk

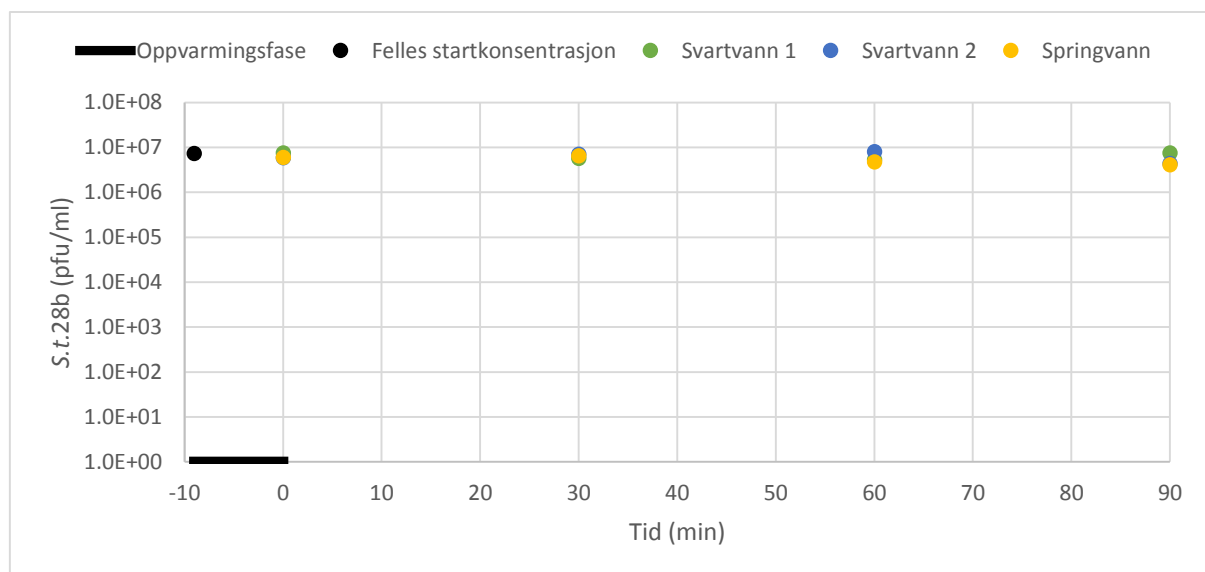
Både *S.t.28b* og ϕ X174 ble valgt som modellvirus i fullskala hygieniseringsforsøk på grunn av sin relativt gode varmetoleranse. Varmetoleransen til disse to virusene ble testet i labskala hygieniseringsforsøk under konstant temperatur. 200 ml svartvann eller springvann med tilsatt virus ble varmet opp til 60, 70 og 80 °C i vannbad med risting.

S.t.28b ble inaktivert sakte i svartvann; ved 80 °C i 15 minutter ble *S.t.28b* inaktivert med 0,2 log₁₀. I springvann ble *S.t.28b* inaktivert med mer enn 2 log₁₀ ved 80 °C i 15 minutter. Etter 90 minutter ved 60 °C var ϕ X174 inaktivert med 4 log₁₀ reduksjon i svartvann og 2 log₁₀ i springvann. Ved 70 °C ble ϕ X174 inaktivert med over 4 log₁₀ reduksjon under oppvarmingsfasen og var ikke detekterbart etter 15 minutter. ϕ X174 ble inaktivert til under deteksjonsgrensen allerede under oppvarmingen til 80 °C. Alle primærdata for alle forsøk finnes i Vedlegg D.

3.2.1 Forsøk med *S.t.28b*

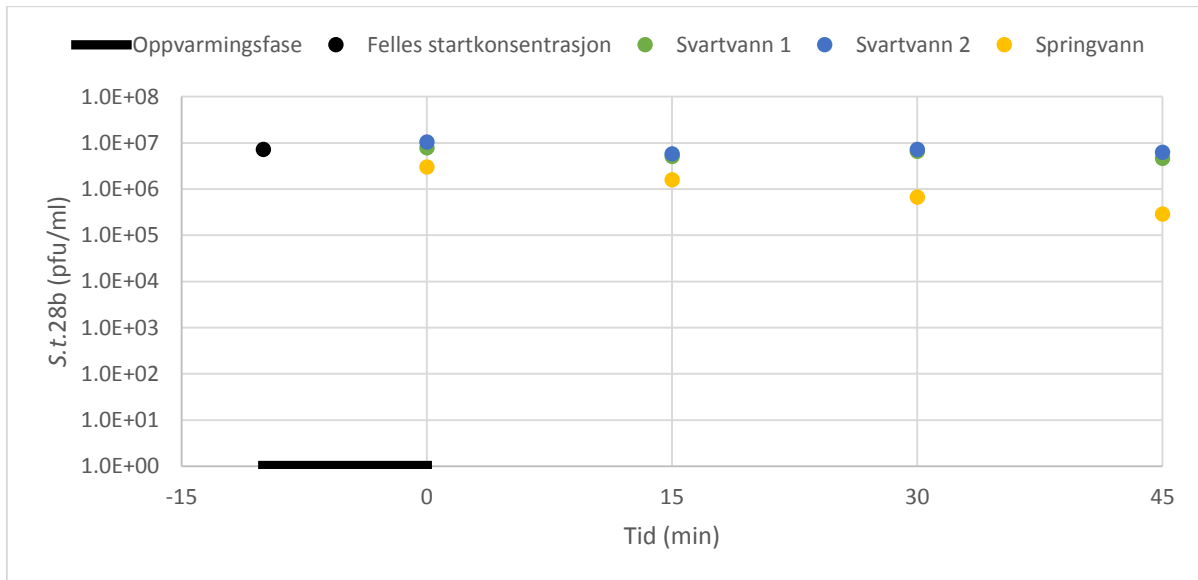
Felles startkonsentrasjon for alle kolbene var 7,23x10⁶ pfu/ml. Dette ga en deteksjonsgrense for inaktivering på 6,4 log₁₀ reduksjon.

Det tok 9 minutter å varme opp kolbene til 60 °C. Forsøket varte så i 90 minutter. Prøvene fra det første gjentaket med svartvann har høyere viruskonsentrasjon etter 90 minutter enn ved 0 minutter. Det andre gjentaket med svartvann har en reduksjon på 0,1 log₁₀. I springvann ble *S.t.28b* inaktivert med 0,2 log₁₀. Resultatene fra dette forsøket er illustrert i Figur 3.7.



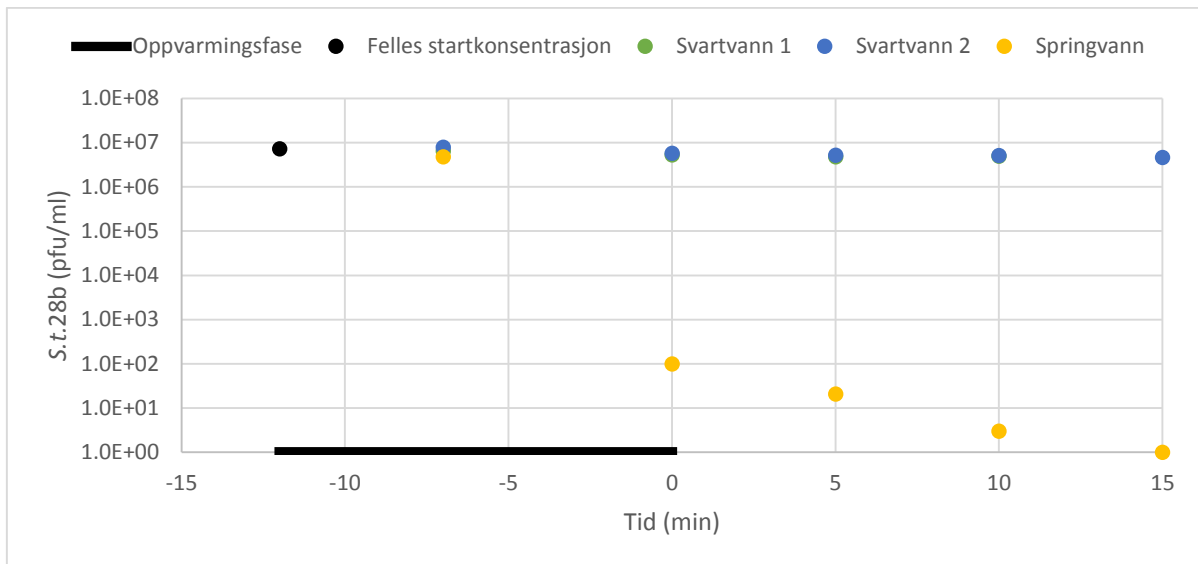
Figur 3.7: Termisk inaktivering av *S.t.28b* ved 60 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 60 °C.

Det tok 10 minutter å varme opp kolbene til 70 °C. Etter 45 minutter var *S.t.28b* i svartvann inaktivert 0,2 log₁₀. I springvann ble viruskonsentrasjonen redusert med 1,0 log₁₀. Resultatene fra dette forsøket er illustrert i Figur 3.8.



Figur 3.8: Termisk inaktivering av *S.t.28b* ved 70 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 70 °C.

Det tok 12 minutter å varme opp kolbene til 80 °C. Etter 15 minutter ved 80 °C var viruskonsentrasjonen i svartvann redusert med 0,2 log₁₀. I springvann ble *S.t.28b* inaktivert med ca. 5 log₁₀ i løpet av oppvarmingsfasen. Videre ble *S.t.28b* inaktivert til under deteksjonsgrensen etter 15 min, med andre ord en inaktivering på minst 2 log₁₀ reduksjon. Resultatene fra dette forsøket er illustrert i Figur 3.9.



Figur 3.9: Termisk inaktivering av S.t.28b ved 80 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 80 °C. Ved -7 min var temperaturen i prøven 60 °C. Punktet som ligger på førsteaksen (tid=15 min) har verdi under deteksjonsgrensen.

Inaktiveringsparametere for springvann er vist i Tabell 3.1. Det minnes om at $k' = \frac{k}{\ln 10}$.

Ettersom prøven etter 15 minutter ved 80 °C har viruskonsentrasjons under deteksjonsgrensen, kan dette punktet ikke inngå i utarbeidelsen av inaktiveringskonstanter.

Tabell 3.1: Inaktiveringsparametere for S.t.28b i springvann ved 70 og 80 °C.

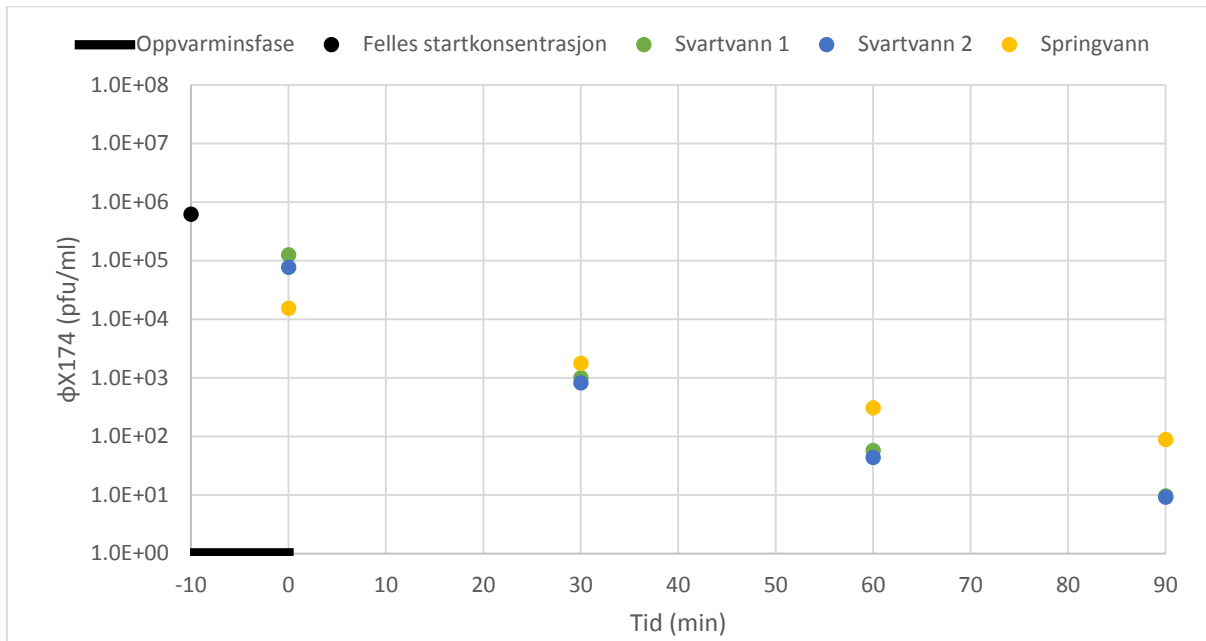
Gjentak	Modell	k' (min ⁻¹)	D-verdi (min)	k (min ⁻¹)	β	r ²
Springvann 70 °C	Chicks lov	0,022	45	0,051		0,99
	Weibull			0,047	1,17	0,99
Springvann 80 °C	Chicks lov	0,15	6,7	0,34		0,99
	Weibull			0,29	1,17	1

3.2.2 Forsøk med ϕ X174

Felles startkonsentrasjon for alle kolbene var $6,20 \times 10^5$ pfu/ml. Dette ga en deteksjonsgrense for inaktivering på $5,6 \log_{10}$. I et kontrollforsøk, hvor to Erlenmeyerkolber med svartvann tilsatt ϕ X174 stod i romtemperatur i 7 timer, ble gjennomsnittlig virusinaktivering $0,65 \log_{10}$.

Det tok 10 minutter å varme opp kolbene til 60 °C. Oppvarmingen til 60 °C førte til en reduksjon i viruskonsentrasjonen på $0,6 - 0,9 \log_{10}$ for svartvann og $1,6 \log_{10}$ for springvann. I løpet av de første 30 minuttene ved 60 °C ble ϕ X174 inaktivert med $1,9 - 2,1 \log_{10}$ i svartvann, og $0,9 \log_{10}$ i springvann. Totalt ble ϕ X174 inaktivert med $3,9 - 4,1 \log_{10}$ i

svartvann og 2,2 log₁₀ i springvann i løpet av 90 minutter ved 60 °C. Resultatene fra dette forsøket er illustrert i Figur 3.10.



Figur 3.10: Termisk inaktivering av φX174 ved 60 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 60 °C.

Det tok 12 minutter å varme opp kolbene til 70 °C. Oppvarmingen førte til at φX174 ble inaktivert med 4,6 – 4,8 log₁₀ i svartvann, og 4,2 log₁₀ i springvann. Etter 15 minutter ved 70 °C var viruskonsentrasjonen under deteksjonsgrensen i alle tre kolbene. Dette tilsvarer minst en reduksjon i viruskonsentrasjonen på 5,6 log₁₀ i løpet av oppvarmingen og de første 15 minuttene ved 70 °C.

Det tok 13 minutter å varme opp kolbene til 80 °C. Underveis ble det tatt ut prøve da temperaturen var 60 °C, dette skjedde etter tre minutter. Viruset var da inaktivert med 0,8 – 1,0 log₁₀ reduksjon i alle prøvene. Da prøvene nådde 80 °C, etter ytterligere 10 minutter, var det ikke detekterbare viruskonsentrasjoner i noen av kolbene. φX174 har blitt inaktivert med minst 5,6 log₁₀ i løpet av de 13 minuttene oppvarmingen varte.

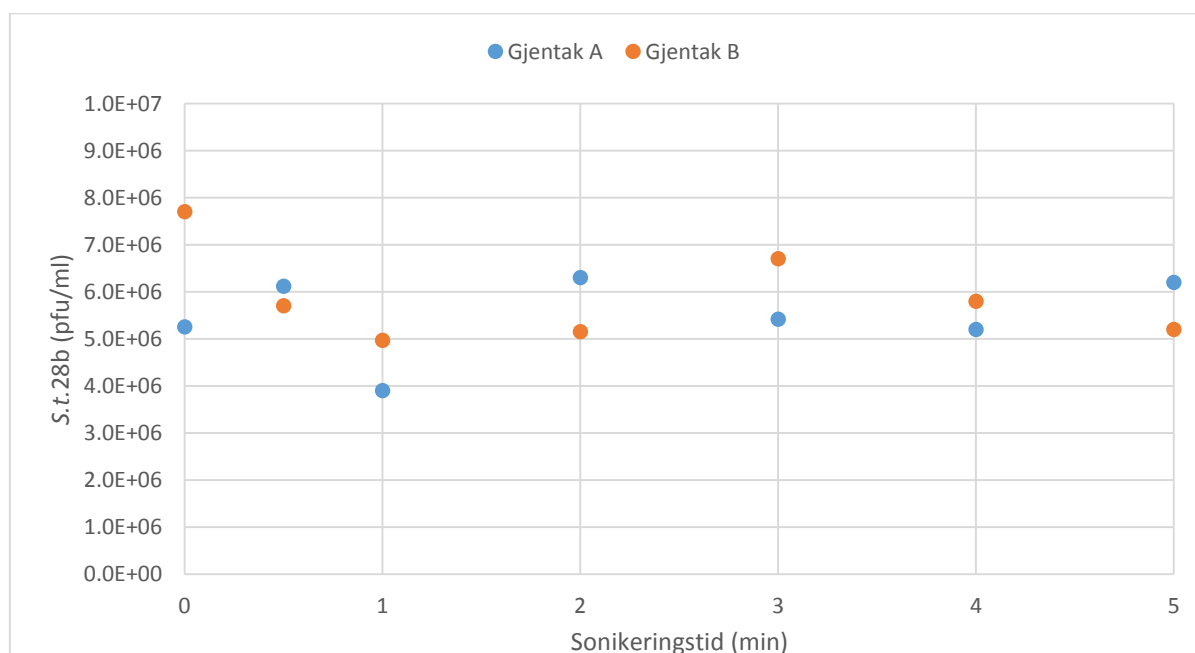
Inaktiveringsparametere for alle tre gjentak ved 60 °C ble funnet, og er gitt i Tabell 3.2. Det minnes om at $k' = \frac{k}{\ln 10}$. Fordi inaktivering under oppvarming til 70 og 80 °C var så kraftig, var det ikke mulig å finne inaktiveringsparametere.

Tabell 3.2: Inaktiveringsparametere for ϕX174 i to gjentak med svartvann og ett med springvann ved 60 °C.

Gjentak	Modell	k' (min^{-1})	D-verdi (min)	k (min^{-1})	β	r^2
Svartvann 1	Chicks lov	0,052	19	0,12		0,94
	Weibull			0,43	0,62	0,99
Svartvann 2	Chicks lov	0,048	21	0,11		0,94
	Weibull			0,37	0,64	0,99
Springvann	Chicks lov	0,026	38	0,061		0,98
	Weibull			0,089	0,80	1

3.3 Sonikeringsforsøk

For å se om sonikering påvirker viruskonsentrasjonen i svartvann, ble svartvannsprøver med *S.t.28b* sonikert i 0 – 5 minutter. Viruskonsentrasjonen av *S.t.28b* i prøvene er vist i Figur 3.11. Det ble gjort to gjentak, A og B. En variansanalyse av resultatene (ANOVA, 5 % signifikansnivå, Minitab® 16) viser at det ikke er signifikant forskjell i viruskonsentrasjonene mellom sonikeringstidene (p-verdi 0,51, felles standardavvik 911598). Den høyeste viruskonsentrasjonen i én enkelt prøve var i en av prøvene som ikke ble sonikert. Likevel har alle tidsgrupper, bortsett fra 1 min, minst én verdi som er høyere enn den laveste usonikerte prøven. Primærdata for dette forsøke finnes i Vedlegg E.



Figur 3.11: Viruskonsentrasjon som funksjon av sonikeringstid, to gjentak for hver tid. Merk at andreaksen ikke er logaritmisk.

4 Diskusjon

4.1 Fullskala hygieniseringsforsøk

Hygieniseringsanlegget har tidligere blitt testet med *E. coli* som indikatorbakterie (Moges & Eregno, manuskript under utarbeiding). Fordi *E. coli* ikke er like varmeresistent som mange andre patogene mikroorganismer (kapittel 1.3.1), er det interessant å teste hygieniseringsanlegget for inaktivering av virus. Begrunnelsen for å bruke bakteriofagene *S.t.28b* og ϕ X174 er gitt i kapittel 1.3.

Gjentakene med *S.t.28b* i november avdekket en del ting ved anlegget som ikke var tatt høyde for i forsøksplanleggingen; temperaturen som ble målt av anlegget var ikke riktig, virusinaktiveringen var kanskje ikke lik i hele tanken og svartvannet var ikke homogent. Under gjentakene med ϕ X174 ble det derfor innført et grundigere prøvetakingsregime. Temperaturmålinger ble gjort med et kalibrert termometer, prøver ble tatt fra både topp og bunn i tanken og alle prøvene ble analysert for tørrstoff.

4.1.1 Temperatur

Temperaturkurven i hygieniseringsanlegget har samme form for alle gjentak (Figur 3.1). Det er rimelig å anta at varmeoverføringen mellom varmeveksleren og svartvannet vil være proporsjonal med temperaturforskjellen (jfr. Newtons avkjølingslov). Dette forklarer hvorfor temperaturen stiger saktere og saktere under oppvarmingen.

Problemer med dieselvarmeren gjennom deler av første gjentak med *S.t.28b* førte til at det i tok lenger tid å få temperaturen opp til 78* °C enn i de andre gjentakene. Dette resulterte likevel ikke i en høyere inaktivering av virus i forhold til de to andre gjentakene med *S.t.28b* (Figur 3.2). De to gjentakene med ϕ X174 i mars har en høyere starttemperatur enn gjentakene med *S.t.28b* i november, og følgelig når de også 78* °C raskere. I de to gjentakene med ϕ X174 ble det pumpet ut en del skum, som reduserte vannvolumet. Dette ser ikke ut til å ha påvirket temperaturøkningen i anlegget, da denne følger samme kurve som gjentakene med *S.t.28b* (Figur 3.1).

Forsøkene i denne oppgaven ble avsluttet når temperaturen i anlegget var 78* °C (73 °C). Det er usikkert om temperaturen vil kunne stige vesentlig mer, ettersom dieselvarmeren ikke varmer varmtvannet i varmeveksleren til mer enn 76,5 °C, og går med halv effekt når det er

varmere enn 71 °C. Systemet for transport av varmtvann til varmeveksleren har et også varmetap som legger en begrensning på anlegget.

Den interne temperaturføleren (ME-50) viste gjennomsnittlig 5 °C høyere enn det som ble målt med håndholdt termometer i bunnen (TENMA 72-7715). Dette ble ikke oppdaget før mot slutten av gjentakene med *S.t.28b*, og den riktige temperaturen ble derfor ikke målt i disse gjentakene. I temperaturføleren sitter det en temperaturtransmitter som skal sørge for at signalet kommer riktig frem til PLCen. Denne må programmeres etter kabelkarakteristikken (motstand og lengde), og er sannsynligvis programmert feil.

Temperaturmålingen som ble gjort i det siste gjentaket med ϕ X174 (Figur 3.5) viser at det er jevn temperatur i hele tanken under oppvarmingen frem til 60 °C. Da blir det varmere i toppen enn i bunnen. Sannsynligvis har termometeret kommet over overflaten mot slutten av gjentaket men det forklarer ikke at temperaturen steg mer i toppen enn i bunnen allerede fra 70 minutter etter oppstart. Det kan det vites ikke hvorfor temperaturforskjellen ble så stor som 5 °C.

4.1.2 Forsøk med *S.t.28b*

Inaktiveringen av *S.t.28b* er lik i alle gjentakene, ca. 0,1 log₁₀ reduksjon. For å inaktivere *S.t.28b* kreves det høyere temperaturer enn det som ble oppnådd i løpet av to timer i hygieniseringsanlegget. Viruskonsentrasjonen er synkende utover i gjentakene, unntatt tredje gjentak, hvor konsentrasjonen er høyere ved 78* °C enn ved 68* °C (Vedlegg C). Økningen kan komme av sedimentering av partikler i tanken, og dermed økt viruskonsentrasjon i bunnen. Tørrstoffinnholdet i prøvene ble ikke analysert, da det ikke ble forventet sedimentasjon i tanken.

Alle gjentakene med *S.t.28b* ble gjort samme dag. Viruskonsentrasjonen i prøvene ble funnet dagen etter. Noen prøver måtte dyrkes om igjen, da fortykningene som ble dyrket ikke ga petriskåler med 20 – 200 plakk. Dette ble gjort fire dager etter forsøket. Utvalgte prøver, med godt resultat fra første analysedag, ble dyrket om igjen, og bekreftet at viruskonsentrasjonen i prøvene ikke ble redusert i løpet av disse fire dagene (data ikke vist).

4.1.3 Forsøk med ϕ X174

De to gjentakene med ϕ X174 ble ganske forskjellige når det gjelder virusinaktivering. I det første forsøket ble det sedimentering av partikler, dette førte til en inaktivering på 6 og 4 log₁₀ i henholdsvis topp og bunn av tanken. I det andre gjentaket var det ikke sedimentering, og viruskonsentrasjonen ble redusert med minst 6 log₁₀ i løpet av 95 minutter.

I det første gjentaket klarte ikke sirkulasjonspumpa å sirkulere svartvannet etter at temperaturen kom opp i ca. 60 °C. Dette førte til at det ble sedimentering av partikler i bunnen. Analysen av viruskonsentrasjonen viste at virusene ble inaktivert til under deteksjonsgrensen i toppen når temperaturen var kommet opp til 73 °C. I bunnen ble viruskonsentrasjonen bare redusert med 0,4 log₁₀ de siste 40 minuttene av gjentaket, selv om temperaturen var over 60 °C. Temperaturen fortsatte å stige også i bunnen, og de siste 10 minuttene var den over 70 °C. Dette skulle egentlig ført til en mye sterkere reduksjon, jfr. labskala hygieniseringsforsøk ved 70 °C. Mange har funnet ut at partikler i avløpsvann kan ha en beskyttende effekt for virus under hygieniseringsprosesser. Det var derfor ikke overraskende å se en sammenheng mellom sedimentasjon av partikler og svakere virusinaktivering. Resultatene fra dette gjentaket med φX174 i fullskala bekrefter at partikler i svartvannet påvirker virusinaktiveringen.

I det andre gjentaket hadde sirkulasjonspumpa god effekt i hele gjentaket. Svartvannet var homogent; resultatene fra tørrstoffanalysene for topp- og bunnprøven var like (Figur 3.6). Ulikheten i suspendert tørrstoff etter 50 minutter skyldes sannsynligvis målefeil. 65 minutter ut i gjentaket (68* °C) var viruskonsentrasjonen i bunnen 1 log₁₀ høyere enn i toppen (Figur 3.5). Selv om det bare er en liten forskjell i partikkelkonsentrasjonen (1,0 og 1,4 g/l suspendert tørrstoff i henholdsvis topp og bunn) kan dette spille inn. Viruskonsentrasjonen ble redusert til under deteksjonsgrensen etter 95 minutter i både toppen og bunnen av tanken (tilsvarer 6 log₁₀ reduksjon). Prøvene som ble tatt etter at dieselvarmeren ble slått av inneholdt heller ikke detekterbare viruskonsentrasjoner.

I begge gjentakene tok det 15 minutter å gå fra 56 til 63 °C (60* til 68* °C). I løpet av denne perioden ble viruskonsentrasjonen redusert med 2 – 4 log₁₀. Dette er mer det som ble oppnådd i labskala hygieniseringsforsøk ved 60 °C i 30 minutter. Tørrstoffinnholdet var betydelig redusert i forhold til ved start på grunn av utpumping av skum, noe som kan ha ført til en raskere virusinaktivering.

Skumdannelse var et problem i begge gjentakene. Skummet ble pumpet ut gjennom innløpet på tanken, som er plassert over vannoverflaten. Vannivået ble ganske mye lavere i løpet av gjentakene. Skumdannelsen skyldes sannsynligvis sirkulasjonen av svartvann; skummingen startet allerede før dieselvarmeren ble startet. Selv om det sirkulerte svartvannet ble tilbakeført under vannoverflaten, kan luft og svartvann blitt blandet, slik at det ble dannet skum. Proteinrester og organiske syrer kan spesielt bidra til skumdannelse (Todt 2015).

Oppvarming kan føre til denaturering av proteiner, som gjør skummingen verre. Det kan også være såpe i svartvannet. Erfaringer i forskningsgruppa sier at svartvann skummer mer enn blandet avløpsvann.

Det er kjent at å ta ut skum kan fjerne både suspendert og løst organisk stoff (Chen et al. 1993). I begge gjentakene ble tørrstoffinnholdet redusert betydelig. Dette er lettest å se i det siste gjentaket, hvor totalt tørrstoff ble redusert fra 7 til 3 g/l og suspendert tørrstoff fra 4 til 0,5 g/l (Figur 3.6). Det var med andre ord størst reduksjon i suspendert tørrstoff. I det første gjentaket synker både totalt tørrstoff og suspendert tørrstoff frem til 60 minutter (Figur 3.4). På grunn av sedimentering av partikler er det vanskelig å se hvor mye partikler som ble pumpet ut etter dette.

Skum har også vist seg å være effektivt for å fjerne bakterier fra sjøvann (Suzuki et al. 2008) og norovirus fra avløpsvann (Suzuki et al. 2009). Suzuki et al. (2009) tilsatte kasein som overflate-protein, og fikk dermed ut nesten 90 % av norovirusene fra avløpsvannet ved å separere ut skum. Selv uten tilsetning av overflate-protein kan utpumpingen av skum ha påvirket viruskonsentrasjonen i hygieniseringsanlegget. Reduksjonen i viruskonsentrasjon skyldes da ikke bare termisk inaktivering, men også fysisk fjerning.

Om utpumping av skum fører til virusfjerning, er det rimelig å anta at viruskonsentrasjonen i hygieniseringsanlegget skulle synke også da temperaturen var lav. Dette kan man se at ikke skjedde i gjentakene med ϕ X174; viruskonsentrasjonen ble bare redusert med henholdsvis 0,7 og 0,6 log₁₀ fra oppstart til første prøve ble tatt (etter henholdsvis 55 og 50 minutter, Figur 3.3 og Figur 3.5). Denne reduksjonen kan forventes ettersom temperaturen nærmet seg 60 °C, jfr. labskala hygieniseringsforsøk. Det antas derfor at virus ikke ble pumpet ut med skum i nevneverdig grad.

4.2 Labskala hygieniseringsforsøk

For å finne ut hvordan modellvirusene *S.t.28b* og ϕ X174 reagerer på varme i det temperaturområdet hvor hygieniseringsanlegget opererer, ble svartvann og springvann varmet opp til 60, 70 og 80 °C, under kontrollerte forhold i vannbad (med risting og konstant temperatur). Modellvirusene reagerte svært forskjellig på varmen de ble utsatt for. Forsøkene med *S.t.28b* og ϕ X174 ble ikke gjort samtidig, men ble utført identisk. Prøvetakingsregimet ble etablert på bakgrunn av resultatene til Bertrand et al. (2012) og Moce-Llivina et al. (2003). Det ble antatt en førsteordens inaktivering, hvor oppvarmingsfasen ikke bidro vesentlig til

inaktivering. I forsøkene ved 80 °C ble det likevel tatt en ekstra prøve når temperaturen nådde 60 °C, for å se på effekten av varmeøkningen fra 60 til 80 °C. Oppvarmingsfasene var ikke like lang i forsøkene med de to virusene; dette kan skyldes ulike temperaturer i varmebadet. Under forsøkene ble temperaturen i kolbene holdt innenfor ± 2 °C av valgt temperatur.

Det ble satt et krav om at viruskonsentrasjonen måtte reduseres med minst 0,5 log₁₀ for at det skulle regnes ut inaktiveringsparametere. Bertrand et al. (2012) brukte samme kriterium i sin sammenligningsstudie. Dette medfører at inaktiveringsparametere bare kan finnes for *S.t.28b* i springvann ved 70 og 80 °C, og for ϕ X174 i både svartvann og springvann ved 60 °C.

4.2.1 Forsøk med *S.t.28b*

S.t.28b ble kun inaktivert med 0,2 log₁₀ i svartvann, selv ved 80 °C i 15 minutter. I springvann ble *S.t.28b* inaktivert med 5 log₁₀ under oppvarmingen til 80 °C, og 2 log₁₀ ved 80 °C i 15 minutter.

De enteriske virus som er nevnt i denne oppgaven inaktiveres raskt ved 70 °C (D-verdier mellom 10 s og 3 min, Tabell 4.2). Resultatene i denne oppgaven viser at *S.t.28b* tåler varme mye bedre enn enteriske virus. Det at *S.t.28b* ikke lar seg inaktivere i svartvann ved temperaturer under 80 °C gjør det vanskelig å benytte *S.t.28b* som modellvirus for enteriske virus i pasteuriseringsforsøk. Selv om ikke *S.t.28b* er et passende modellvirus ved temperaturer under 80 °C, kan *S.t.28b* være et godt modellvirus for andre mikroorganismer med svært høy varmetoleranse. Varmetoleransen til *S.t.28b* i svartvann bør derfor undersøkes videre, da *S.t.28b* kan ha et ukjent potensial som et ekstremt varmetolerant modellvirus.

Sahlström et al. (2008) brukte *S.t.28b* i pasteuriseringsforsøk med biogassanleggssubstrat, og fikk en 0,2 log₁₀ reduksjon etter 60 minutter ved 70 °C. Resultatene i denne oppgaven stemmer godt med resultatene til Sahlström et. al.. De konkluderte med at *S.t.28b* er for varmetolerant til å benyttes som modellvirus i pasteuriseringsprosesser ved 70 °C med varighet under én time, men kan være passende som modellvirus i inaktiveringsprosesser som går over lengre tid, for eksempel kompostering. Det er også konklusjonen i denne oppgaven.

Det er kjent at sammensetningen av mediet som viruset er suspendert i påvirker inaktivering. Dette vises tydeligst i den store forskjellen i inaktivering ved 80 °C i svartvann og springvann. Eller et al. (1996) så også en forskjell på inaktivering av *S.t.28b* i lab skala forsøk med aerob nedbrytning av svartvann (ved temperaturer opp til 60 °C).

Bertrand et al. (2012) har sammenlignet virusinaktivering i enkle medier (syntetiske medier, drikkevann og grunnvann) og komplekse medier (ferskvann med høy turbiditet, sjøvann, avløpsvann, jord, meieriprodukter, mat og urin). De fant ut at virus blir raskere inaktivert i komplekse medier enn i enkle medier. Resultatene fra forsøkene i denne oppgaven viser at *S.t.28b* blir raskere inaktivert i springvann enn i svartvann, og stemmer dermed ikke med resultatene til Bertrand et. al.. Dette kan tyde på to ting: enten at *S.t.28b* har andre egenskaper enn de virusene som Bertrand et al. har sammenlignet, eller at Bertrand et al. overforenkler når alle typer medier sammenlignes samtidig, ettersom de ulike mediene har ulike egenskaper. Likevel stemmer resultatene i denne oppgaven med deres konklusjon om at virus suspendert i enkle medier er mer følsomme for en temperaturendring enn virus suspendert i komplekse medier. Det er tydelig at inaktiveringen av *S.t.28b* påvirkes mer av en temperaturøkning fra 70 til 80 °C i springvann enn i svartvann.

For inaktivering i springvann ved både 70 og 80 °C er Weibull-parameteren β nær 1, som tilsier at virusinaktiveringen følger en kurve som nesten er rett i et semi-logaritmisk plot. Siden $\beta > 1$, er inaktiveringskurven konkav (bøyer nedover). Fordi det bare er brukt tre og to punkter for henholdsvis 70 og 80 °C for å finne inaktiveringsparameterne med Weibull-modellen, er det knyttet nokså stor usikkerhet knyttet til parameterne. Grunnen til at Weibull-modellen har $r^2=1$ ved 80 °C er at det bare er brukt to punkter for å finne parametrene. Chicks lov gir også svært gode korrelasjoner ($r^2 = 0,99$), og kan forklare inaktiveringen av *S.t.28b* på en god måte. Denne modellen er matematisk enklere, og det anbefales derfor å benytte Chicks lov som inaktiveringsmodell for *S.t.28b*.

Det kan ikke forklares hvorfor *S.t.28b* inaktiveres med nesten 5 \log_{10} i løpet av de 12 minuttene det tok å varme opp springvannet til 80 °C, men bare 1,5 \log_{10} de første 10 minuttene etter prøven har nådd 80 °C. Dette tyder på at inaktiveringstiden er en sannsynlighetsfordeling, som endrer seg med tiden. Det kan hende virusene opplever ulik grad av beskyttelse fra partikler i svartvannet, og at de minst beskyttede virusene inaktiveres lettest, som tidligere nevnt. Dette gjør inaktiveringsparameterne for 80 °C veldig usikre, da de bare er basert på de mest beskyttede virusene.

4.2.2 Forsøk med ϕ X174

ϕ X174 ble inaktivert med 4 \log_{10} i svartvann og 2 \log_{10} i springvann i 90 minutter ved 60 °C. Ved 70 og 80 °C ble ϕ X174 inaktivert så mye under oppvarmingen at det ikke var mulig å studere inaktiveringens videre.

De enteriske virus som er nevnt i denne oppgaven inaktiveres raskt ved 70 °C (D-verdier mellom 10 s og 3 min, Tabell 4.2). Resultatene i denne oppgaven viser at ϕ X174 er mer varmetolerant enn disse, samtidig som ϕ X174 lar seg inaktivere ved temperaturer over 60 °C. ϕ X174 har derfor en varmetoleranse som er sammenlignbar med de enteriske virusene som er nevnt i Tabell 1.1. På grunn av dette kan ϕ X174 være et godt modellvirus for enteriske virus i pasteuriseringsforsøk, selv om det selvfølgelig kan finnes enkelte enteriske virus som har enda bedre varmetoleranse enn ϕ X174.

Inaktiveringens av ϕ X174 ved 60 °C er i samme størrelsesorden som resultatene til Moce-Llivina et al. (2003). De fikk 2 \log_{10} reduksjon på 30 min i blandet avløpsvann ved 60 °C. Det samme resultatet ble oppnådd for den første halvtimen ved 60 °C i denne oppgaven. Etter dette avtar inaktiveringens: i andre halvtime er den 1,5 \log_{10} og siste halvtime er den 1 \log_{10} . Grunnen til at inaktiveringens avtar kan være at virusene opplever forskjellig beskyttelse fra partikler i prøven, og de minst beskyttede virusene inaktiveres først, og de mest beskyttede til slutt, som nevnt i kapittel 1.4.2.

Resultatene fra forsøket ved 60 °C stemmer med resultatet i Bertrand et al. (2012), som fant at virus blir raskere inaktivert i komplekse medier enn i enkle medier. Basert på tabeller i Bertrand et. al. er det mulig å regne ut 95 % konfidensintervall for D-verdien til ϕ X174 i ved ulike temperaturer (Tabell 4.1). Disse verdiene stemmer ikke med deres eget resultat som sa at virus blir raskere inaktivert i komplekse medier enn i enkle medier. Tallene som er funnet av Bertrand et. al. for ϕ X174 i komplekse medier er basert på bare to studier med ϕ X174, og konfidensintervallet er derfor stort.

D-verdiene for svartvann i denne oppgaven ved 60 °C (19 og 21 min) er innenfor konfidensintervallet for komplekse medier, men det kan hende at forsøket ved 70 og 80 °C resulterte i D-verdier lavere enn nedre grense i konfidensintervallet. D-verdiene for springvann ved 60 °C (38 min) er langt høyere enn det som er regnet ut for enkle medier. Studien til Bertrand et. al. er et godt forsøk på å sammenstille publiserte data på termisk inaktivering, men fordi mediene som er benyttet i inaktiveringsstudiene er så forskjellige, er

det nok vanskelig å få gode og representative resultater ut fra tabellene som er laget. Sannsynligvis er det en overforenkling å bare dele mediene inn i enkle og komplekse medier.

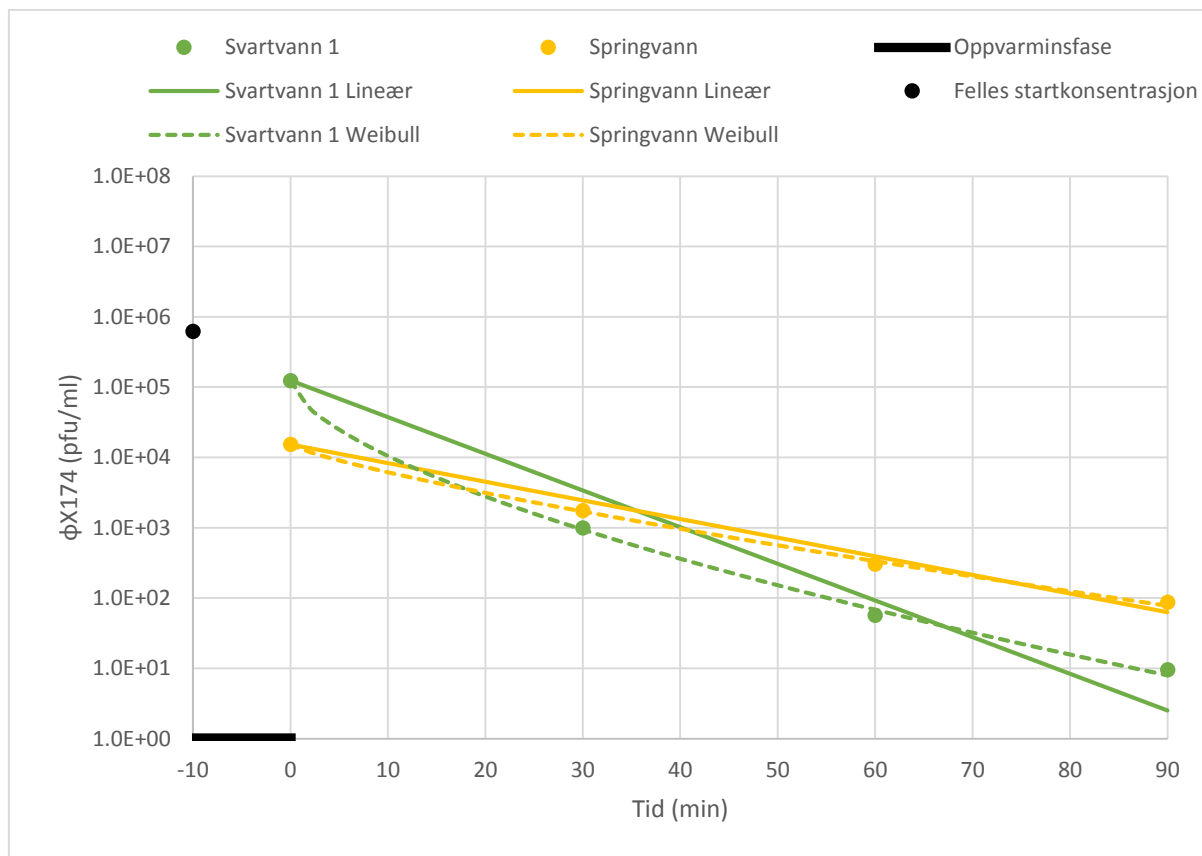
Tabell 4.1: 95 % konfidensintervall for D-verdi (minutter) for ϕ X174 (basert på tall fra Bertrand et al. 2012). n er antall studier verdiene er basert på.

Temperatur	95 % konfidensintervall		95 % konfidensintervall	
	komplekse medier (n=2)		enkle medier (n=10)	
60 °C	4,2	27	10	21
70 °C	3,4	20	3,6	4,3
80 °C	2,4	16	0,6	1,8

Det er tydelig at konsentrasjonen av ϕ X174 følger en funksjon som er konveks (bøyer oppover) i Figur 3.10. Det er mulig å trekke en rett linje basert på punktene i figuren, dette er gjort i Figur 4.1 for gjentak 1 med svartvann og springvann. Svartvann 2 er utelukket for at figuren skal bli mer oversiktlig. Residualene ikke normalfordelte; det er en systematisk feil. Med andre ord kan det ikke antas en førsteordens inaktivering for ϕ X174.

Weibull-modellen vil få høyere r^2 -verdi fordi den har ett datapunkt mindre, men det kan ses av Figur 4.1 at de målte datapunktene ligger likevel bedre på Weibull-linjen enn den rette linjen (Chicks lov). Det konkluderes derfor med at Weibull-modellen forklarer inaktiveringen av ϕ X174 bedre enn Chicks lov.

Men ingen av modellene kan forklare hvorfor inaktiveringen under oppvarmingen er så stor i forhold til inaktiveringen videre i forsøket. Som det kommer frem av Figur 4.1, så bommer modellene grovt dersom det ekstrapoleres for å ta med oppvarmingsfasen i modellen.



Figur 4.1: Termisk inaktivering av ϕ X174 ved 60 °C med modeller for Svartvann 1 og Springvann. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 60 °C.

4.3 Sonikering

Så lenge man analyserer for plakkformende enheter, og antar at virusene ikke formerer seg i prøven, skal man alltid velge den metoden som gir høyeste viruskonsentrasjon (ISO 2000).

For å se om sonikering påvirker viruskonsentrasjonen i svartvann, ble svartvannsprøver med *S.t.28b* sonikert i 0 – 5 minutter. Forskjellen mellom de ulike sonikeringstidene var ikke stor nok til at det kan konkluderes med at sonikering vil påvirke viruskonsentrasjonen. Det er heller ikke mulig å se en trend i viruskonsentrasjon som funksjon av sonikeringstid.

Prøvene fra forsøkene med hygieniseringsanlegget i november ble sonikert i ett minutt, men dette har ikke påvirket resultatene. Prøvene fra forsøk gjort etter sonikeringsforsøket (Figur 2.1) ble ikke sonikert, verken med *S.t.28b* eller ϕ X174. Det er usikkert om ϕ X174 ville reagert annerledes på sonikering, så det anbefales å undersøke dette før videre arbeider med ϕ X174.

Resultatene i denne oppgaven samsvarer med funnene til Storey (2002), hvor 2 minutter sonikering av biofilm ikke påvirket viruskonsentrasjonen. De samsvarer i midlertid ikke med resultatene rapportert av Hejkal et al. (1981), hvor 5 minutter sonikering av avløpsvann førte til en dobling av viruskonsentrasjonen.

Det er mulig at forsøket ikke gav virusene mulighet til å binde seg til partikler, eller at ristingen som ble utført for å homogenisere prøvene er tilstrekkelig for å løse opp aggregater. Sonikering er bare en mekanisk måte å deaggregere virus på. Det kan være elektrostatiske bindinger mellom partiklene som ikke lar seg løse opp ved sonikering, som også fører til aggregering av virus (Storey 2015).

4.4 Oppsummering forsøk

Bakgrunnskonsentrasjonene av virus i svartvannet fra Kaja studentboliger som infiserer vertsbakteriene ble analysert. Det ble ikke funnet bakteriofager som infiserer *Salmonella typhimurium* type 5. Konsentrasjonen av bakteriofager som infiserer *E. coli* CN13 var 4×10^2 pfu/ml i svartvannet. Resultatene bekrefter at de virusene som ble observert i forsøkene er de samme virusene som ble tilsatt.

Til nå er bare temperatur vurdert som årsak til inaktivering. Det kan være andre forhold i svartvannet som forårsaker inaktivering, som for eksempel ammonium og/eller pH. Eventuelle kjemiske parametere som endres i svartvannet under oppvarmingen vil til syvende og sist ha oppvarmingen som utløsende faktor. Ved høye temperaturer anses temperatur som den dominerende årsaken til inaktivering av patogene mikroorganismer (Pecson et al. 2007).

4.4.1 Inaktiveringskinetikk og modeller

Denne oppgaven har bidratt til at viktige data om varmetoleransen til *S.t.28b* og ϕ X174 er funnet. Det er observert ting som tyder på at inaktiveringen ikke er konstant; inaktiveringen under oppvarmingen er mye større enn inaktiveringen under resten av forsøket skulle tilsi. Selv om ikke konsentrasjonen i alle kolbene før oppvarming i labskala hygieniseringsforsøk ble bestemt, ble det utvist stor grad av nøyaktighet i forberedelsene til forsøket så det ikke skulle være forskjeller i startkonsentrasjonen.

For inaktivering av *S.t.28b* i springvann ga Chicks lov like gode korrelasjoner som Weibull-modellen. Det anbefales derfor å jobbe videre med en førsteordens inaktiveringsmodell for *S.t.28b* i springvann, da denne er enklere matematisk. For ϕ X174 er det tydelig at Weibull-

modellen passer bedre. For praktiske formål kan det likevel være godt nok å benytte en førsteordens inaktiveringsmodell; denne gir brukbare resultater ($r^2 > 0,90$).

Resultatene fra labskala hygieniseringsforsøk som er brukt til å lage inaktiveringskonstanter har likevel en begrensning fordi en stor del av virusene har allerede blitt inaktivert under oppvarmingen når målingene starter. Inaktiveringskonstantene er basert på inaktivering av de virusene som tåler varmen best, fordi de minst beskyttede virusene allerede er inaktivert. Verken Chicks lov eller Weibull-modellen kan modellere virusinaktivering under oppvarmingen, og er derfor egentlig ikke gode nok til å brukes ved modellering av virusinaktivering i hygieniseringsanlegget. Det bør utvikles en ny modell, dersom denne ikke allerede finnes, som kan modellere virusinaktivering under både oppvarmingsfasen og fasen med konstant temperatur.

4.4.2 Sammenligning av full- og labskala

I denne oppgaven er det gjort hygieniseringsforsøk i både full- og labskala. *S.t.28b* ble inaktivert likt i begge typer forsøk. ϕ X174 ble i en periode raskere inaktivert i fullskala enn i labskala; dette skyldes sannsynligvis at tørrstoffinnholdet i hygieniseringsanlegget ble redusert på grunn av utpumping av skum.

Labskala hygieniseringsforsøk ble designet for å etterligne forholdene i hygieniseringsanlegget. Det er større volumer som skal varmes opp i fullskala, og virusene vil utsettes for en større mengde varme under oppvarmingsfasen enn i labskala. De fleste forsøk med inaktivering er gjort i labskala, hvor temperaturen kommer raskt opp til ønsket nivå. Det trengs mer kunnskap om inaktivering av modellvirus og patogene virus i fullskala, hvor temperaturøkningen skjer sakte. Videre forskning på hygieniseringsanlegget bør derfor fokusere på fullskala tester.

Når varmetoleransen for ϕ X174 ved 70 °C og inaktivering i hygieniseringsanlegg i første gjentak med ϕ X174 sammenlignes, er det tydelig at ϕ X174 beskyttes av partikler i bunnen av tanken mot slutten av gjentak. Dette viser hvor viktig det er å installere en form for omrøring eller sirkulasjon i tanken, for å unngå sedimentering.

4.5 Drift av hygieniseringsanlegget

Varmebehandling er en gunstig hygieniseringsmetode, fordi den har god effekt på patogene mikroorganismer uten å danne giftige forbindelser og mutere mikroorganismer. Metoden er tryggere og mer effektivt enn alternativene (som aerob og anaerob nedbrytning, kompostering og behandling med kalk, ozon, klor eller hydrogenperoksid). Ettersom toalettavløpet fra feltsykehusene samles opp i en egen tank, er det forholdsvis små volumer som skal hygieniseres. Det konkluderes derfor med at pasteurisering er en hensiktsmessig metode for hygienisering av svartvann fra Røde Kors' feltsykehus. Hygieniseringsanlegget er et viktig bidrag i arbeidet for å hindre spredning av overførbare, avløpsrelaterte sykdommer i etterkant av en katastrofesituasjon.

Det er ikke bare svartvann som kan hygieniseres med dette anlegget; det er også mulig å benytte anlegget i andre sammenhenger hvor man ønsker hygienisering av en begrenset vannstrøm. Det kan vurderes om andre fraksjoner av avløpsvann fra feltsykehusene bør behandles i hygieniseringsanlegget, for eksempel vaskevann fra operasjonssaler.

Selv om anlegget er utviklet på bestilling fra Røde Kors, er det også andre organisasjoner som har behov for å hygienisere toalettavløp. Anlegget kan inngå i et system for å samle opp og behandle svartvann i mange situasjoner, ikke bare katastrofesituasjoner. Dette forutsetter at det skal benyttes vannbesparende toaletter. Eksempler på brukssteder er; store arrangementer der det settes opp toalettfasiliteter, offentlige toaletter i utviklingsland, baser for hjelpearbeidere i katastrofesituasjoner og flyktningleirer.

Videre i oppgaven vil bare svartvann fra feltsykehus være gjenstand for diskusjonen, da det er dette oppgaven tar utgangspunkt i.

4.5.1 Anbefaling for drift

Manualen til dieselvarmeren (Webasto Thermosysteme GmbH 2000) oppgir at varmeren går med halv effekt når varmtvannet i varmeveksleren er over 72 °C. Når varmtvannet når 76,5 °C, går dieselvarmeren inn i hvilemodus til temperaturen igjen er nede i 71 °C. Jo høyere temperaturen i hygieniseringsanlegget er, jo større er varmetapet til omgivelsene. På grunn av dette kan det ta lang tid å få svartvannet varmere enn 70 °C. Det anbefales derfor at anlegget operer med en temperatur på 70 °C.

Hygieniseringsanlegget presterte bra på inaktivering av modellviruset ϕ X174 i svartvann. Når temperaturen i hygieniseringsanlegget var kommet opp i 63 °C, var ϕ X174 inaktivert 3 – 5 log₁₀, men det var fortsatt en viruskonsentrasjon i tanken på opp mot 600 pfu/ml.

Etter videre 30 – 40 minutter, da temperaturen var 73 °C, var det ikke detekterbare konsentrasjoner av φX174 (minst 6 log₁₀ reduksjon). Unntaket er i første gjentak med φX174, da sedimentasjon av partikler bare førte til en svak reduksjon av viruskonsentrasjonen i bunnen av tanken. Siden φX174 har bedre varmetoleranse enn de fleste andre enteriske virus, vil de være inaktivert minst like mye.

Derfor anbefales det at svartvannet varmes opp til 70 °C, og at denne temperaturen holdes i 30 minutter. Det forutsettes da at anlegget forbedres slik at partikler ikke sedimenterer. Hygieniseringsanlegget brukte gjennomsnittlig 100 minutter på å varme 100 liter svartvann opp til 70 °C fra en starttemperatur på 10 – 17 °C. Dette medfører at hver sats vil vare i litt over to timer. I løpet av denne tiden vil φX174 bli inaktivert med minst 6 log₁₀, og andre enteriske virus enda mer. Med 70 °C i 30 minutter er vi i sikkerhetssonen ifølge Strauch (1998 sitert i: Carrington 2001) (Figur 1.2).

Bertrand et al. (2012) gir data for å regne ut konfidensintervaller for gjennomsnittlige D-verdier for ulike virus. Dette er gjort for 70 °C for enteriske virus og φX174 i Tabell 4.2. For ECHO-virus og Coxsackievirus er det store konfidensintervaller, dette skyldes sannsynligvis stor variasjon i rapporterte data på grunn av ulikt medium i de to forsøkene dataene er basert på. Resultatene i Tabell 4.2 viser at med 70 °C i 30 minutter vil hygieniseringsanlegget være i stand til å redusere konsentrasjonen av patogene virus med mange log₁₀. Likevel skal disse resultatene brukes kritisk, da studien sammenligner inaktivering i mange ulike medier. Som nevnt påvirker mediet inaktiveringen i stor grad, og partikler i svartvannet kan gi virusene beskyttelse mot inaktivering.

Tabell 4.2: 95 % konfidensintervall for gjennomsnittlig D-verdi (t₉₀) (minutter) ved 70 °C, basert på data fra Bertrand et al. (2012). n er antall studier verdiene er basert på.

Virus	n	95 % konfidensintervall	
Poliovirus	3	0,2	1,1
Hepatitt A-virus	38	1,0	1,7
ECHO-virus	2	0,6	17
Coxsackievirus	2	0,2	80
φX174	1	3,4	20

Funnene til Mitchell og McCormick (1984) angående termisk inaktivering av til lassa-, ebola- og marburgvirus gjør at 70 °C i 30 minutter er konservativt valg med tanke på disse tre virusene. Ebolavirus er ikke det mest varmetolerante viruset, men kan likevel være det viruset som gir størst grunnlag til bekymring under en epidemi.

Vinnerås et al. (2003) lagde likninger basert på arbeidet til Feachem et al. (1983) for å finne tiden det tar for å oppnå 12 log₁₀ reduksjon (ingen levedyktige organismer) for noen patogene mikroorganismer. Ved 70 °C tar dette 10 minutter for enterovirus (Coxsackievirus, ECHO-virus og poliovirus) og mindre enn 1 minutt for bakteriene *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* og *Shigella* spp. og for helmintene *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides* og *Schistosoma* spp. Disse resultatene anslår at enterovirus vil bli inaktivert med minst 3 log₁₀ i hygieniseringsanlegget ved den anbefalte driften. Forsøkene til Feachem et. al. er med avløpsvann, og dermed mer representative for forholdene i hygieniseringsanlegget enn det som finnes i Bertrand et al. (2012), der mange av mediene er meieriprodukter.

Med andre ord er 70 °C i 30 minutter et konservativt valg. Men det er nødvendig å være konservativ, da konsekvensene av for dårlig hygienisert svartvann kan bli store. På grunn av usikkerheten i konsentrasjonene av enteriske virus i svartvannet fra Røde Kors' feltsykehus er det ikke regnet på hvor lenge som skal til for å oppnå et svartvann uten patogene virus.

Selv om virusene som er nevnt i Tabell 1.1 inaktiveres ved 70 °C, finnes det virus og andre patogene mikroorganismer som tåler mer varme. Spillmann et al. (1987) fant ut at bovine parvovirus bare ble inaktivert med 0,7 log₁₀ i pasteurisering ved 70 °C i 30 minutter.

70 °C i 1 time er ikke nok for å inaktivere sporer fra *Clostridium* spp. og *Bacillus* spp. (Bagge et al. 2005). Bagge et. al. studerte termisk inaktivering av mikroorganismer i slam fra biogassreaktorer, og fikk ofte gjenvekst av bakterier etter varmebehandling. Sporer vokser som regel først etter en innledende varmebehandling. Derfor må man fortsatt behandle svartvannet som en mulig smittekilde ved sluttdisponering etter hygienisering.

Helminter vil inaktiveres av 70 °C i 30 minutter. Sahlström et al. (2008) studerte pasteurisering av husdyrslam fra en biogassreaktor, og fant ingen levedyktige egg fra *Ascaris suum* etter 30 minutter ved 70 °C. *A. suum* stammer fra griser, men ettersom *A. suum* har liknende egenskaper som *A. lumbricoides*, er disse sammenlignbare. Helminter er blant de mest varmetolerante mikroorganismene (Feachem et al. 1983), derfor anbefales det å ta med helminter som modellorganisme ved videre tester av hygieniseringsanlegget. Det kan

forventes at mange av pasientene på Røde Kors' feltsykehus er infisert med helminter, og dette utgjør derfor en ikke ubetydelig smitterisiko.

Det er bare pasientene på sykehuset som får lov til å benytte vakuumpolettene; personalet og pårørende er nødt til å benytte andre toaletter (Steinberg 2015). Dersom det antas at et gjennomsnitt på 100 pasienter benytter toalettene 5 ganger om dagen, og at det går med 1 liter vann pr. spyling, genereres det 500 liter svartvann i døgnet. Dette vil hygieniseringsanlegget kunne ta unna på ca. 12 timers drift. Så fremt anlegget er i stand til å kjøre for fullt hele døgnet og uten tilsyn, kan anlegget betjene 1000 toalettbesøk i døgnet.

4.5.2 Risikovurdering

I denne oppgaven tas det utgangspunkt i at det må oppnås en betydelig reduksjon i konsentrasjonene av enteriske virus for å sette et mål for hygieniseringen. Det antas at anbefalingen som er gitt resulterer i nesten ingen infiserbare virus i svartvannet.

En annen måte å finne ut hva som er god nok hygienisering på er å gjøre en risikovurdering, for å estimere konsekvensene av ulike tenkte hendelser, som lekkasjer, transport og ulike deponeringsalternativer. Haas et al. (1999) definerer risikovurdering slik:

En risikovurdering er den kvalitative eller kvantitative karakteriseringen og estimeringen av potensielle ugunstige helseeffekter forbundet med eksponering av individer eller populasjoner for farer (materialer eller situasjoner, fysiske, kjemiske og eller mikrobielle agenter).

Kvantitativ mikrobiell risikovurdering (QMRA) er et rammeverk som kombinerer matematiske modeller med informasjon om mikroorganismene for å estimere konsekvensene av en planlagt eller aktuell eksponering. QMRA består av fire steg (Haas et al. 1999):

1. **Identifisere farene ved eksponering:** Hvilke mikroorganismer eksponeres man for, og hvilke sykdommer som er forbundet med disse
2. **Dose-respons vurdering:** Beskrive forholdet mellom eksponert dose og sannsynligheten for at individet infiseres.
3. **Eksponeringsvurdering:** Definere hvor mange som er eksponert, hvordan dette skjedde, hvor mye de er eksponert (mengde og frekvens/varighet) for ulike mikroorganismer
4. **Risikokarakterisering:** samler informasjonen fra de tre første stegene for å estimere sannsynligheten og størrelsen på negative helseeffekter.

De vanskeligste stegene i denne vil være å finne eksponeringen av de ulike mikroorganismene. Denne vil være avhengig av innløpskonsentrasjonen av de aktuelle virus som forekommer i svartvannet, og hygieniseringsanleggets effekt på disse.

Viruskonsentrasjonen vil avhenge sterkt av hvor mange på feltsykehuset som er smittet av ulike sykdommer (Carrington 2001), og vil ikke nødvendigvis være lik fra gang til gang. Det kan derfor være vanskelig å få tak i gode tall på dette, og å gjøre en god risikovurdering.

Risikovurderingen bør brukes for å finne risikoen forbundet med ulike sluttdeponeringsalternativer.

4.5.3 Energiforbruk

Når Røde Kors installerer et hygieniseringsanlegg i en katastrofesituasjon er driftssikkerhet viktig. Slik anlegget er konstruert i dag, kreves det lite elektrisitet til drift. Dette er begrenset til strøm til styrefunksjoner og pumpe for sirkulering av varmtvann. Anlegget er også utstyrt med et batteri som kan slå inn i tilfelle kortvarig bortfall av strøm. Videre utviklinger av anlegget kan føre til at strømforbruket økes, for eksempel om det monteres en omrører eller innføres et nytt rensetrinn.

Dieselforbruket ble ikke målt under forsøkene, men basert på visuelle inspeksjoner av dieseltanken ser tallene som er gitt i manualen ut til å stemme, dvs. ca. 1 – 1,5 liter diesel på en sats, slik anlegget ble driftet i denne oppgaven.

Ikke alle steder hvor anlegget kan benyttes har like god tilgang på elektrisitet som et feltsykehus. Vakuumtoalettene krever elektrisitet for å virke. Det bør utvikles nye typer vannbesparende toaletter som ikke er avhengig av elektrisitet. Dersom anlegget benyttes i et system med slike vannbesparende toaletter, kan det hende at et solcellepanel kan forsyne anlegget med nok strøm.

4.5.4 Sluttdeponering

Hvordan man sluttdeponerer behandlet svartvann avhenger av situasjonen og området Røde Kors jobber i. Da svartvannet fortsatt er rikt på organisk materiale, vil Svartvann inneholder mye organisk materiale, som ikke brytes ned i hygieniseringsanlegget. Dette vil bli brutt ned etter hvert av naturlige prosesser; disse prosessene forbraker mye oksygen. Dersom unedbrutt avløpsvann slippes ut til ytre miljø, kan det føre til oksygenfattige resipienter (vassdrag som fungerer som mottak). Svartvannet bør derfor stabiliseres (i.e. brytes ned til enklere organiske forbindelser) før deponering. Det beste alternativet vil være å sende svartvannet til et renseanlegg, om dette finnes.

Stabilisering kan også oppnås med et biologisk rensetrinn, som foreslås innført i kapittel 4.6.2. Svartvannet inneholder også medisinrester, spesielt antibiotika, som ikke tas fullstendig opp i kroppen, og kan være en risikofaktor for miljøet. Selv om de vanligste patogene mikroorganismene inaktiveres i hygieniseringsanlegget, kan det være andre, viktige patogene mikroorganismer som ikke blir inaktivert. Hygieniseringsanlegget må ikke bli en sovepute for å ikke deponere svartvannet på en sikker plass.

4.6 Veien videre

4.6.1 Forbedringspotensialer

Modellen som er testet er en prototype av hygieniseringsanlegget, og A-Aqua skal videreutvikle denne. Derfor har det også vært et mål å finne forbedringspotensialet for anlegget. I denne oppgaven har anlegget blitt kjørt mest mulig manuelt i forsøkene, for å ha kontroll på forholdene i tanken. De automatiske prosessene har ikke blitt testet, men dette kan gjøres med springvann på et senere tidspunkt med det nye anlegget.

Som nevnt spiller sedimentering av partikler i svartvannet inn på effektiviteten til anlegget. Økt konsentrasjon av partikler i bunnen fører til at det kreves mer varme for å inaktivere virus. Det er derfor essensielt at det implementeres en form for omrøring eller sirkulasjon av svartvannet i tanken. En sirkulasjonspumpe kan monteres ved siden av tanken. Denne løsningen vil føre til økt varmetap, fordi svartvannet må pumpes i ledninger på utsiden av tanken. Utløpet bør være i bunnen, og innløpet bør være under vannoverflaten for å unngå skumming. Det kan likevel hende at det blir skumdannelse ved bruk av en pumpe, så en form for omrøring i tanken er å foretrekke. Motoren for omrøreren vil kunne stå på toppen av tanken, slik at den er lett tilgjengelig. Uavhengig av valgt metode for å sirkulere/røre i svartvannet, må det gjennomføres tester for å se at svartvannet holdes homogent.

Temperaturen som måles av anlegget, og som PLCen styrer etter, er gjennomsnittlig 5 °C for høy, sammenlignet med målinger gjort med et kalibrert termometer. Antageligvis er temperaturtransmittoren feilprogrammert, denne må omprogrammeres etter kabelkarakteristikken (motstand og lengde). Temperaturtransmittoren må kalibreres på hver eneste enhet som lages, da kablen mellom temperaturføler og PLC kan være forskjellig fra anlegg til anlegg. Temperatur og tid er de to viktigste parameterne som anlegget styres av, og det er kritisk for anleggets drift og hygieniseringsevne at disse måles riktig.

På prototypen er utløpet plassert 7 cm over laveste punkt i tanken. Utløpet bør flyttes så langt ned som mulig, helst til undersiden av tanken, for at man skal kunne tømme tanken helt mellom satsene. Dette vil bidra til økt kapasitet på anlegget.

Varmtvannet som sirkulerer i varmeveksleren går fra øverst til nederst i tanken. Det er i bunnen det trengs mest varme, ettersom en eventuell sedimentering av partikler vil samle seg der. Funnene i denne oppgaven viser at virusinaktivering skjer saktere ved sedimentering. Det anbefales derfor å snu strømmen av varmtvann, slik at den går fra nederst til øverst i varmeveksleren.

4.6.2 Et ekstra rensetrinn

Funnene i denne oppgaven viser at partikler i svartvannet har stor innvirkning på effektiviteten til hygieniseringsanlegget. Samtidig er det kjent at utslipp av svartvann som ikke er stabilisert kan føre til oksygenfattige resipienter. Det bør derfor inkluderes et ekstra rensetrinn som fokuserer på partikkelreduksjon og biologisk nedbrytning av organisk materiale.

Anaerob nedbrytning kan være en gunstig måte å redusere partikkelinnholdet og stabilisere svartvannet på. Svartvannet skal da ikke luftes, som gjør anlegget enklere og billigere å bygge, og energikostnadene lavere, sammenlignet med aerob nedbrytning (Seghezzo 2004). Anaerob nedbrytning produserer mindre slam enn aerob nedbrytning (Ødegaard 2012 s. 586), som gjør at behovet for å hygienisere slam som inneholder store konsentrasjoner av patogene mikroorganismer blir mindre. Anaerob nedbrytning regnes som den beste behandlingen for konsentrert svartvann (Kujawa-Roeleveld & Zeeman 2006; Verstraete et al. 2005; Zeeman & Lettinga 1999). Anaerob nedbrytning vil være med på å inaktivere virus og andre patogene mikroorganismer (Astals et al. 2012), dog ikke i like stor grad som i hygieniseringsanlegget. Det er vanlig å drive anaerobe reaktorer mesofilt (ca. 37 °C) eller termofilt (ca. 56 °C).

Virus blir ikke så lett inaktivert i anaerob nedbrytning som bakterier. Spillmann et al. (1987) fant ut at mesofil anaerob nedbrytning ikke er effektivt for å redusere rotavirus og coxsackievirus. Likevel anbefaler de mesofil anaerob nedbrytning for å inaktivere termofile virus, som kan påvirkes av kjemiske og mikrobielle faktorer i svartvannet.

Astals et al. (2012) undersøkte mesofil og termofil anaerob nedbrytning av slam sammen med varmebehandling ved 60 og 80 °C. De fant ut at mesofil anaerob nedbrytning hadde bedre avvanningsegenskaper enn termofil anaerob nedbrytning, men presterte dårligere på reduksjon av indikatororganismer (*E. coli*, somatiske kolifager og F-spesifikke RNA-fager).

De anbefaler kombinasjonen mesofil anaerob nedbrytning og varmebehandling som den beste kombinasjonen for både nedbrytning av organisk materiale og inaktivering av patogene mikroorganismer. Mesofil drift av reaktoren vil føre til et lavere varmetap enn ved termofil drift, og er derfor mer økonomisk.

Det er flere typer reaktorer som drives anaerobt, det er ikke mulig å gi en fullstendig gjennomgang av alle i denne oppgaven. Det vil nå bare argumenteres for én type reaktor, en UASB-reaktor.

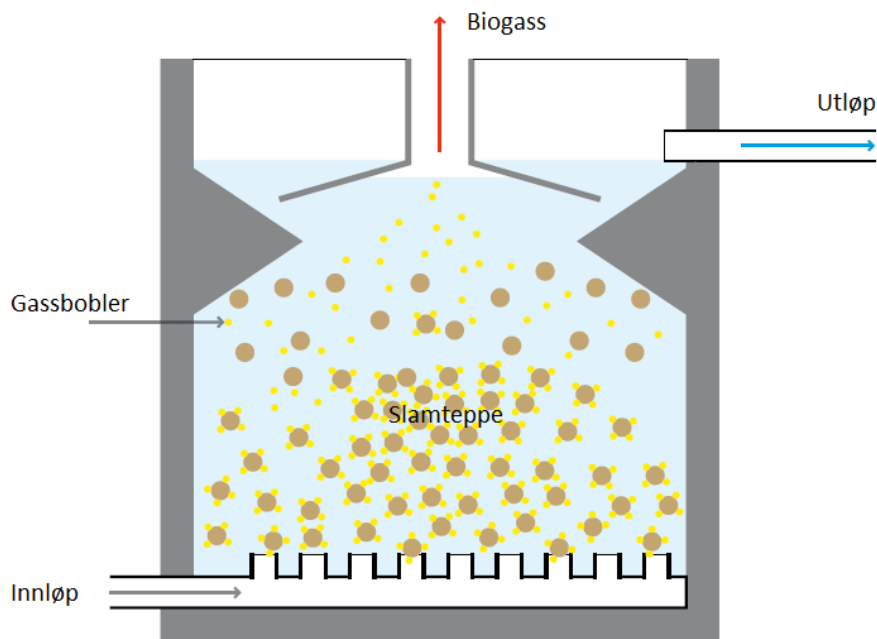
4.6.3 UASB-reaktor

En UASB-reaktor (Upflow anaerobic sludge blanket) består av én tank, hvor bakterier anaerobt bryter ned avløpsvannet. Reaktoren har god effekt på reduksjon av organisk materiale, og er en kostnadseffektiv måte å behandle svartvann på (Abdel-Shafy et al. 2009). En skisse er vist i Figur 4.2. Avløpsvannet kommer inn i tanken fra undersiden, og strømmer oppover til utløpet på toppen (Tilley et al. 2014 s. 122). Et slamteppe vil danne seg i bunnen av tanken, hvor nedbrytningen foregår. Slamteppet vil også i noen grad fungere som et filter som holder partikler tilbake. Nedbrytningen reduserer organisk materiale til sluttproduktet metangass (CH_4), som kan samles opp og benyttes som en energikilde, for eksempel til å varme opp svartvannet i UASB-reaktoren.

En UASB-reaktor kan takle en høyere organisk belastning enn aerobe reaktorer, og krever et mindre reaktorvolum (de Graaff et al. 2010; Seghezzi 2004). Siden det ikke er noe lufting i tanken, og miksing skjer på grunn av det oppadstrømmende avløpet, har den et begrenset energibehov. Den eneste mekaniske delen vil være innløpspumpa, som må gå kontinuerlig. En UASB-reaktor produserer lite slam, og må normalt tømmes hvert andre eller tredje år (Tilley et al. 2014 s. 122). Normalt er ikke feltsykehuset på samme sted så lenge om gangen (Bolleurs 2015).

En UASB-reaktor er med andre ord enkel å bygge og drifte, men krever en kontinuerlig tilførsel av avløpsvann og elektrisitet. Man må ha en form for utjevningstank for svartvann før reaktoren, da toalettbesøk ikke er jevnt fordelt utover døgnet. Anlegget krever riktig innstilling av gjennomstrømningshastighet for å få sedimentering av slam i tanken slik at slamteppet etablerer seg. Ved veldig høy belastning kan slamteppet spyles ut, og UASB-reaktoren mister all nedbrytningsevne. Driften av anlegget krever at Røde Kors lærer opp sine VA-ingeniører godt. Ulemper med dette systemet er at UASB-reaktoren må være ganske høy, gjerne 2 – 4 meter. Det tar også en del tid før reaktoren er i full drift (opptil noen måneder,

ifølge Tilley et al. (2014)), men dette kan man påvirke ved å ha klart slamsubstrat som kan sendes med og blandes i reaktoren.



Figur 4.2: Prinsippskisse av UASB-reaktor (Tilley et al. 2014 s. 122).

Mange har studert behandling av svartvann i UASB-reaktorer, og fått gode resultater på nedbrytning av organisk materiale og partikkelreduksjon (Abdel-Shafy et al. 2009; de Graaff et al. 2010; Luostarinen et al. 2007; Seghezzo 2004). Når ulemper og fordeler summeres opp, ser det ut til at UASB-reaktor er en gunstig måte å behandle svartvann i krisesituasjoner sammen med pasteurisering. Hovedformålet med å inkludere en UASB-reaktor i systemet er å redusere partikkelkonsentrasjonen før hygienisering. Derfor bør behandling i en UASB-reaktor skje før hygieniseringen. Det bør bygges inn en varmeveksler i systemet, slik at utløpet fra hygieniseringsanlegget kan bidra til å varme innløpet til UASB-reaktoren, for å utnytte energien i systemet bedre.

Hygieniseringsanlegget bør testes på nytt når de foreslåtte forbedringene og eventuelt et ekstra rensetrinn er implementert. Det bør også undersøkes hvordan anlegget da skal driftes for å ha best mulig effekt på inaktivering av patogene mikroorganismer og stabilisering av svartvannet.

5 Konklusjon

Pasteurisering av svartvann er en enkel og effektiv hygieniseringsmetode, og har god effekt på inaktivering av alle grupper patogene mikroorganismer. Svartvannet fra feltsykehusene utgjør en begrenset avløpsstrøm. Dette gjør pasteurisering til en hensiktsmessig hygieniseringsmetode for svartvann fra Røde Kors' feltsykehus. Hygieniseringsanlegget som er testet har god effekt på inaktivering av modellviruset ϕ X174 (6 \log_{10} reduksjon), men inaktiverer ikke *Salmonella typhimurium* fag 28b (*S.t.28b*) (0,1 \log_{10} reduksjon).

For å sikre en god hygienisering av svartvannet anbefales det at hygieniseringsanlegget varmer opp svartvannet til 70 °C og holder denne temperaturen i 30 minutter.

Hygieniseringsanlegget bruker rundt 100 minutter å varme 100 liter svartvann opp til 70 °C. Forsøkenene som er gjennomført viser at virusinaktivering påvirkes av partikler i svartvannet, og at det er viktig å unngå sedimentering av partikler i tanken.

Det er funnet flere felt hvor hygieniseringsanlegget kan forbedres. Hovedfunnene er: implementere en form for omrøring eller sirkulasjon av svartvannet i tanken for å unngå sedimentasjon, mer nøyaktig måling av temperaturen for å være sikker på at ønsket hygienisering er oppnådd, flytte utløpet til bunnen for å kunne tømme tanken helt mellom hver sats og snu strømningsretningen for varmtvannet i varmeveksleren for å få mer varme i bunnen av tanken.

Det er behov for et nytt rensetrinn som reduserer partikkelinnholdet i svartvannet før hygieniseringen. Anaerob nedbrytning fører til liten slamproduksjon og har et lavt energibehov, noe som er gunstig i en katastrofesituasjon. Det anbefales mesofil anaerob nedbrytning, gjerne i en UASB-reaktor.

S.t.28b inaktiveres sakte i svartvann, ved 80 °C i 15 minutter ble *S.t.28b* inaktivert med 0,2 \log_{10} . I springvann ble *S.t.28b* inaktivert med mer enn 2 \log_{10} ved 80 °C i 15 minutter. For å inaktivere *S.t.28b* i svartvann kreves det høyere temperaturer enn 80 °C. Sonikering av prøver med *S.t.28b* førte ikke til en endring i viruskonsentrasjonen.

ϕ X174 ble inaktivert med 4 \log_{10} i svartvann og 2 \log_{10} i springvann i 90 minutter ved 60 °C. Ved 70 og 80 °C ble ϕ X174 inaktivert så mye under oppvarmingen (minst 6 \log_{10}) at det ikke var mulig å studere inaktiveringen videre.

I denne oppgaven var det viktig å benytte en modellorganisme som tåler varme minst like godt som de fleste enteriske patogener, men likevel lar seg inaktivere i hygieniseringsanlegget. Dette er nødvendig for at inaktiveringen av modellviruset skal kunne sammenlignes med inaktiveringen av enteriske virus. Resultatene fra forsøkene som er gjort bekrefter at både *S.t.28b* og ϕ X174 er varmetolerante virus, og sammenlignet med publiserte data for enteriske virus tåler *S.t.28b* og ϕ X174 mer varme.

S.t.28b inaktiveres sakte i svartvann under 80 °C, og kan være et for konservativt valg av modellorganisme i pasteuriseringsforsøk, men kan være passende for å studere svært varmetolerante mikroorganismer. ϕ X174 har en varmetoleranse som er bedre enn, men likevel sammenlignbar med, enteriske virus. ϕ X174 foreslås benyttet som modellvirus for enteriske virus ved videre pasteuriseringsforsøk.

Hygieniseringsanlegget bør testes på nytt når de foreslåtte forbedringene er implementert. Anlegget bør også testes sammen med et rensetrinn som reduserer partikkelinnholdet i svartvann før hygienisering, gjerne en UASB-reaktor. Det er viktig å fortsette med fullskala tester av hygienisering av svartvann, da det finnes lite forskning på området. Det trengs mer data på termisk inaktivering av enteriske virus og modellviruset ϕ X174 i svartvann, for å kunne sammenligne patogene virus med ϕ X174. Det bør også utvikles en inaktiveringsmodell som beskriver inaktivering av virus både under oppvarmingsfasen og fasen med konstant temperatur.

Hygieniseringsanlegget oppfyller Røde Kors' behov for hygienisering av svartvannet fra feltsykehusene. Dette anlegget er et viktig bidrag i jobben mot spredning av overførbare, avløpsrelaterte sykdommer i etterkant av en katastrofesituasjon. Anlegget kan også benyttes av andre organisasjoner som ønsker å hygienisere toalettavløp lokalt.

6 Kilder

- Abdel-Shafy, H. I., El-Khateeb, M. A., Regelsberger, M., El-Sheikh, R. & Shehata, M. (2009). Integrated system for the treatment of blackwater and greywater via UASB and constructed wetland in Egypt. *Desalination and Water Treatment*, 8 (1-3): 272-278.
- Allestam, G. & Carlander, A. (2000). *Bacteriophages as tracers and hygiene indicator. Laboratory manual*. Solna, Sweden: Swedish Institute for Infectious Disease Control. Upublicert manuskript.
- Arraj, A., Bohatier, J., Laveran, H. & Traore, O. (2005). Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (2): 516-524.
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K. & Snozzi, M. (2001). Indicators of microbial water quality. I: Fewtrell, L. & Bartram, J. (red.) *Water quality: Guidelines, standards and health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*. London: IWA Publishing.
- Astals, S., Venegas, C., Peces, M., Jofre, J., Lucena, F. & Mata-Alvarez, J. (2012). Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, 46 (19): 6218-6227.
- Bagge, E., Sahlstrom, L. & Albihn, A. (2005). The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res*, 39 (20): 4879-86.
- Barros, J., Grenho, L., Manuel, C. M., Ferreira, C., Melo, L. F., Nunes, O. C., Monteiro, F. J. & Ferraz, M. P. (2013). A modular reactor to simulate biofilm development in orthopedic materials. *International Microbiology*, 16 (3): 191-198.
- Beier, S., Cramer, C., Koster, S., Mauer, C., Palmowski, L., Schroder, H. F. & Pinnekamp, J. (2011). Full scale membrane bioreactor treatment of hospital wastewater as forerunner for hot-spot wastewater treatment solutions in high density urban areas. *Water Sci Technol*, 63 (1): 66-71.
- Bertrand, I., Schijven, J. F., Sanchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., Husman, A. M. D., et al. (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 112 (6): 1059-1074.
- van Boekel, M. A. J. S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1-2): 139-159.
- Bolleurs, M. (2015). *Telefonintervju* (16.1.15).

- Bonjoch, X. & Blanch, A. R. (2009). Resistance of Faecal Coliforms and Enterococci Populations in Sludge and Biosolids to Different Hygienisation Treatments. *Microbial Ecology*, 57 (3): 478-483.
- Borrego, J. J., Cornax, R., Morinigo, M. A., Martinezmanzanares, E. & Romero, P. (1990). COLIPHAGES AS AN INDICATOR OF FECAL POLLUTION IN WATER - THEIR SURVIVAL AND PRODUCTIVE INFECTIVITY IN NATURAL AQUATIC ENVIRONMENTS. *Water Research*, 24 (1): 111-116.
- Bouki, C., Venieri, D. & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91: 1-9.
- Brezina, S. S. & Baldini, M. D. (2008). Detection of somatic coliphages as indicators of faecal contamination in estuarine waters. *Revista Argentina De Microbiologia*, 40 (1): 72-74.
- Carlander, A., Aronsson, P., Allestam, G., Stenstrom, T. A. & Perttu, K. (2000). Transport and retention of bacteriophages in two types of willow-cropped lysimeters. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 35 (8): 1477-1492.
- Carrington, E. G. (2001). *Evaluation of sludge treatments for pathogen reduction – final report*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Chen, S. L., Timmons, M. B., Bisogni, J. J. & Aneshansley, D. J. (1993). SUSPENDED-SOLIDS REMOVAL BY FOAM FRACTIONATION. *Progressive Fish-Culturist*, 55 (2): 69-75.
- Chick, H. (1908). An Investigation of the Laws of Disinfection. *The Journal of hygiene*, 8 (1): 92-158.
- Chitnis, V., Chitnis, D., Patil, S. & Kant, R. (2000). Hospital effluent: A source of multiple drug-resistant bacteria. *Current Science*, 79 (7): 989-991.
- Chrysikopoulos, C. V., Manariotis, I. D. & Syngouna, V. I. (2013). Virus inactivation by high frequency ultrasound in combination with visible light. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107 (0): 174-179.
- Cravioto, A., Lanata, C. F., Lantagne, D. S. & Nair, G. B. (2011). *Final Report of the Independent Panel of Experts on the Cholera Outbreak in Haiti*: United Nations. Tilgjengelig fra: <http://www.un.org/News/dh/infocus/haiti/UN-cholera-report-final.pdf> (lest 11.5.2015).
- Davis, J. A., Farrah, S. R. & Wilkie, A. C. (2006). Adsorption of viruses to soil: impact of anaerobic treatment. *Water Science and Technology*, 54 (3): 161-167.
- de Graaff, M. S., Temmink, H., Zeeman, G. & Buisman, C. J. N. (2010). Anaerobic Treatment of Concentrated Black Water in a UASB Reactor at a Short HRT. *Water*, 2 (1): 101-119.

- Dimmock, N. J. (1967). DIFFERENCES BETWEEN THERMAL INACTIVATION OF PICORNAVIRUSES AT HIGH AND LOW TEMPERATURES. *Virology*, 31 (2): 338-&.
- Eller, G., Norin, E. & Stenstrom, T. A. (1996). Aerobic thermophilic treatment of blackwater, mixed with organic waste and liquid manure: Persistence of selected pathogens and indicator organisms. I: Staudemann, J., Schonborn, A. & Etnier, C. (red.) Environmental Research Forum, b. 5-6 *Recycling the Resource: Proceedings of the Second International Conference on Ecological Engineering for Wastewater Treatment*, s. 355-357. Stafa-Zurich: Trans Tech Publications Ltd.
- Emerson, S. U., Arankalle, V. A. & Purcell, R. H. (2005). Thermal Stability of Hepatitis E Virus. *Journal of Infectious Diseases*, 192 (5): 930-933.
- Feachem, R. G., David J. Bradley, Garelick, H. & Mara, D. D. (1983). *Sanitation and Disease Health Aspects of Excreta and Wastewater Management*. Report number 11616: The World Bank.
- Fekadu, S., Merid, Y., Beyene, H., Teshome, W. & Gebre-Selassie, S. (2015). Assessment of antibiotic- and disinfectant-resistant bacteria in hospital wastewater, south Ethiopia: a cross-sectional study. *Journal of infection in developing countries*, 9 (2): 149-56.
- Ferreira, C., Pereira, A. M., Pereira, M. C., Simoes, M. & Melo, L. F. (2013). Biofilm Control With New Microparticles With Immobilized Biocide. *Heat Transfer Engineering*, 34 (8-9): 712-718.
- Flewett, T. (1982). *Clinical features of rotavirus infections. I: Tyrell D, Kapikian A, eds. I: Tyrell D, Kapikian A, eds. Virus infections of gastrointestinal tract: New York, Marcel Dekker, 125-137.*
- Foliguet, J.-M. & Doncoeur, F. (1972). Inactivation assays of enteroviruses and salmonella in fresh and digested wastewater sludges by pasteurization. *Water Research*, 6 (11): 1399-1407.
- Fontenete, S., Guimaraes, N., Leite, M., Figueiredo, C., Wengel, J. & Azevedo, N. F. (2013). Hybridization-Based Detection of Helicobacter pylori at Human Body Temperature Using Advanced Locked Nucleic Acid (LNA) Probes. *Plos One*, 8 (11): 11.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D. & Cormican, M. (2010). Enumeration and Characterization of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli Bacteria in Effluent from Municipal, Hospital, and Secondary Treatment Facility Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (14): 4772-4779.
- Gerba, C. P., Stagg, C. H. & Abadie, M. G. (1978). Characterization of sewage solid-associated viruses and behavior in natural waters. *Water Research*, 12 (10): 805-812.
- Gibson, K. E. & Schwab, K. J. (2011). Thermal Inactivation of Human Norovirus Surrogates. *Food and Environmental Virology*, 3 (2): 74-77.
- Grabow, W. O. K. (2001). Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water Sa*, 27 (2): 251-268.

- Gusbeth, C., Frey, W., Volkmann, H., Schwartz, T. & Bluhm, H. (2009). Pulsed electric field treatment for bacteria reduction and its impact on hospital wastewater. *Chemosphere*, 75 (2): 228-233.
- Haas, C. N., Rose, J. B. & Gerba, C. P. (1999). *Quantitative microbial risk assessment*. New York: Wiley. X, 449 s. : ill. s.
- Hallin, E. (2014). *E-post til Arve Heistad 28.08.2014*.
- Heidary Rad, L. (2014). *Removal of Salmonella Typhimurium phage 28B by Nanoscale zero-valent iron (nZVI) from water*. Ås: Mastergradoppgave ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Dept. of Environmental Sciences (IMV).
- Heistad, A., Paruch, A. M., Vrale, L., Adam, K. & Jenssen, P. D. (2006). A high-performance compact filter system treating domestic wastewater. *Ecological Engineering*, 28 (4): 374-379.
- Heistad, A. (2008). *Small scale wastewater treatment: design optimization, reduction efficiency and risk prediction*, b. 2008:50. Ås: Universitetet for miljø- og biovitenskap, UMB. 1 b. (flere pag.) : ill., fig. s.
- Heistad, A., Seidu, R., Flø, A., Paruch, A. M., Hanssen, J. F. & Stenström, T. (2009). Long-term Hygienic Barrier Efficiency of a Compact On-site Wastewater Treatment System. *Journal of Environmental Quality*, 38 (6): 2182-8.
- Hejkal, T. W., Wellings, F. M., Lewis, A. L. & LaRock, P. A. (1981). Distribution of viruses associated with particles in waste water. *Applied and Environmental Microbiology*, 41 (3): 628-634.
- Hsieh, M. K., Shyu, C. L., Liao, J. W., Franje, C. A., Huang, Y. J., Chang, S. K., Shih, P. Y. & Chou, C. C. (2011). Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. *Veterinarni Medicina*, 56 (6): 274-285.
- Höglund, C., Ashbolt, N., Stenström, T. A. & Svensson, L. (2002). Viral persistence in source-separated human urine. *Advances in Environmental Research*, 6 (3): 265-275.
- IFRC. (2014). *Emergency Response Units (ERUs): Types*. Tilgjengelig fra: <http://www.ifrc.org/en/what-we-do/disaster-management/responding/disaster-response-system/dr-tools-and-systems/eru/types-of-eru/> (lest 14.4.15).
- Internasjonal avdeling. (2014). *Nødhjelp*. Tilgjengelig fra: <https://www.rodekors.no/vart-arbeid/Internasjonalt-arbeid/nodhjelp/> (lest 14.4.2015).
- ISO. (2000). *ISO 10705-2:2000 Water quality - Detection and enumeration of bacteriophages - Part 2: Enumeration of somatic coliphages*. International Organisation for Standardisation, Genève, Sveits.
- Jackson, R. & Ord, E. (2000). Greywater re-use-benefit or liability? The UK perspective. *Water* 21 (6): 38-39 (Cited in Ottoson & Stenstrom 2003).
- Jakobsen, K. (2015). *Personlig meddelelse (6.2.2015)*.

- Jimenez, B. (2003). Health risks in aquifer recharge using reclaimed water - State of the art report. I: Aertgeerts, R. & Angelakis, A. (red.), EUR/03/5041122: Water, Sanitation and Health, Protection of the Human Health, WHO, Geneva.
- Jones, T. H., Brassard, J., Johns, M. W. & Gagne, M. J. (2009). The effect of pre-treatment and sonication of centrifugal ultrafiltration devices on virus recovery. *Journal of Virological Methods*, 161 (2): 199-204.
- Keller, R., Passamani-Franca, R. F., Cassin, S. T. & Goncalves, F. R. (2004). Disinfection of sludge using lime stabilisation and pasteurisation in a small wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 50 (1): 13-17.
- Kujawa-Roeleveld, K. & Zeeman, G. (2006). Anaerobic Treatment in Decentralised and Source-Separation-Based Sanitation Concepts. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5 (1): 115-139.
- Lang, N. L. & Smith, S. R. (2008). Time and temperature inactivation kinetics of enteric bacteria relevant to sewage sludge treatment processes for agricultural use. *Water Research*, 42 (8-9): 2229-2241.
- Larsen, T. A., Alder, A. C., Eggen, R. I. L., Maurer, M. & Lienert, J. (2009). Source Separation: Will We See a Paradigm Shift in Wastewater Handling? *Environmental Science & Technology*, 43 (16): 6121-6125.
- Lemonick, D. M. (2011). Epidemics After Natural Disasters. *American Journal of Clinical Medicine*, 8: 144-152.
- Lilleengen, K. (1948). *Typing of salmonella typhi murium by means of bacteriophage*, b. 77. Copenhagen: Munksgaard. 125 s. : ill. s.
- Luostarinen, S., Sanders, W., Kujawa-Roeleveld, K. & Zeeman, G. (2007). Effect of temperature on anaerobic treatment of black water in UASB-septic tank systems. *Bioresour Technol*, 98 (5): 980-6.
- Mandilara, G. D., Smeti, E. M., Mavridou, A. T., Lambiri, M. P., Vatopoulos, A. C. & Rigas, F. P. (2006). Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *Fems Microbiology Letters*, 263 (1): 119-126.
- Mitchell, S. W. & McCormick, J. B. (1984). PHYSICOCHEMICAL INACTIVATION OF LASSA, EBOLA, AND MARBURG VIRUSES AND EFFECT ON CLINICAL LABORATORY ANALYSES. *Journal of Clinical Microbiology*, 20 (3): 486-489.
- Moce-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F. & Jofre, J. (2003). Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1452-6.
- Moges, M. E., Eregno, F. E. & Heistad, A. (2015). Performance of biochar and filtralite as polishing step for on-site greywater treatment plant. *Management of Environmental Quality: An International Journal*, 26 (4).
- Moges, M. E. & Eregno, F. E. (, manuskript under utarbeiding).

- Monarca, S., Feretti, D., Collivignarelli, C., Guzzella, L., Zerbini, I., Bertanza, G. & Pedrazzani, R. (2000). The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research*, 34 (17): 4261-4269.
- Noji, E. K. (2005). ABC of conflict and disaster - Public health in the aftermath of disasters. *British Medical Journal*, 330 (7504): 1379-1381.
- Noji, E. K. (2005). Public health issues in disasters. *Critical care medicine*, 33 (1 Suppl): S29-33.
- Nordin, A. (2010). *Ammonia sanitisation of human excreta treatment technology for production of fertiliser*. Uppsala: Doktorgradsoppgave (sammenfattning) Uppsala : Sveriges lantbruksuniv., 2010.
- Nordin, A., Niwagaba, C., Jonsson, H. & Vinneras, B. (2013). Pathogen and indicator inactivation in source-separated human urine heated by the sun. *Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development*, 3 (2): 181-188.
- Ottoson, J. & Stenstrom, T. A. (2003). Faecal contamination of greywater and associated microbial risks. *Water Research*, 37 (3): 645-655.
- Pan American Health Organization. (2014). *Epidemiological Update: Cholera 6 November 2014*. Tilgjengelig fra: http://www.paho.org/HQ/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=28070 (lest 11.5.2015).
- Paruch, A. M. & Mæhlum, T. (2012). Specific features of *Escherichia coli* that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment. *Ecological Indicators*, 23 (0): 140-142.
- Payment, P. & Franco, E. (1993). *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (8): 2418-2424.
- Pecson, B. M., Barrios, J. A., Jimenez, B. E. & Nelson, K. L. (2007). The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. *Water Res*, 41 (13): 2893-902.
- Petterson, S. & Ashbolt, N. (2003). *WHO Guidelines for the Safe Use of Wastewater and Excreta in Agriculture: Microbial Risk Assessment Section* Upublisert dokument forberedt for WHO, Geneva. Tilgjengelig fra: http://www.researchgate.net/profile/Nicholas_Ashbolt2/publication/255585018_WHO_Guidelines_for_the_Safe_Use_of_Wastewater_and_Excreta_in_Agriculture_Microbial_Risk_Assessment_Section/links/004635362668b86a4f000000.pdf (lest 16.4.2015).
- Phelps, E. B. (1911). The Application of Certain Laws of Physical Chemistry in the Standardization of Disinfectants. *Journal of Infectious Diseases*, 8 (1): 27-38.
- Phull, S. S., Newman, A. P., Lorimer, J. P., Pollet, B. & Mason, T. J. (1997). The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4 (2): 157-164.

- Pike, E. B., Carrington, E. G. & Harman, S. A. (1988). Destruction of Salmonellas, Enteroviruses and Ova of Parasites in Wastewater Sludge by Pasteurisation and Anaerobic Digestion. *Water Science & Technology*, 20 (11-12): 337-343.
- Popat, S. C., Yates, M. V. & Deshusses, M. A. (2010). Kinetics of inactivation of indicator pathogens during thermophilic anaerobic digestion. *Water Res*, 44 (20): 5965-72.
- Røde Kors. (2011). *Dette er Røde Kors* [Hefte]. Tilgjengelig fra: <https://www.rodekors.no/Global/HK/Organinsasjon/Dokumenter/Dette%20er%20R%C3%B8de%20Kors/Dette%20er%20R%C3%B8de%20Kors%20Rev%202011.pdf> (lest 14.4.2015).
- Sahlström, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M. L. & Albihn, A. (2008). A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, 99 (16): 7859-7865.
- Scheuerman, P. R., Farrah, S. R. & Bitton, G. (1991). Laboratory studies of virus survival during aerobic and anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, 25 (3): 241-245.
- Schönning, C. & Stenström, T. (2004). *Guidelines on the Safe Use of Urine and Faeces in Ecological Sanitation Systems*: EcoSanRes Programme, Stockholm Environment Institute. 38 s.
- Scott, J. T. & Skaarer, A. M. (2005). *Transport and retention of colloids in porous media during the initial stages of biofilm formation*. [Ås]: [Forfatterne]. VIII, 81 s. : fig. s.
- Seghezze, L. (2004). *Anaerobic treatment of domestic wastewater in subtropical regions*. Wageningen: Doktorgradsoppgave ved Wageningen University. 172 s.
- Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. & Gantzer, C. (2004). Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and Poliovirus-1 genome. *Water Res*, 38 (12): 2927-33.
- Spillmann, S. K., Traub, F., Schwyzer, M. & Wyler, R. (1987). Inactivation of animal viruses during sewage-sludge treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (9): 2077-2081.
- Steinberg, M. (2015). *Personlig meddelelse* (20.4.2015).
- Stenström, T. A., Seidu, R., Ekane, N. & Christian, Z. (2011). Microbial exposure and health assessments in sanitation technologies and systems. *EcoSanRes Series*, 9789186125363. Stockholm: Stockholm Environment Institute. 154 s.
- Storey, M. V. (2002). *The ecology of enteric viruses within distribution pipe biofilms : a dissertation*: Thesis (Ph.D.) - University of New South Wales, 2002.
- Storey, M. V. (2015). *E-post* 29.4.2015.
- Strande, L., Ronteltap, M. & Brdjanovic, D. (2014). *Faecal Sludge Management: Systems Approach for Implementation and Operation*. London, UK: IWA Publishing.

- Straub, T. M., Pepper, I. L. & Gerba, C. P. (1992). PERSISTENCE OF VIRUSES IN DESERT SOILS AMENDED WITH ANAEROBICALLY DIGESTED SEWAGE-SLUDGE. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (2): 636-641.
- Strauch, D. (1998). Pathogenic micro-organisms in sludge : anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as fertiliser. *European water management : official publication of the European Water Pollution Control Association*, 1 (2): 12-26.
- Suzuki, Y., Hanagasaki, N., Furukawa, T. & Yoshida, T. (2008). Removal of bacteria from coastal seawater by foam separation using dispersed bubbles and surface-active substances. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105 (4): 383-388.
- Suzuki, Y., Narimatsu, S., Furukawa, T., Mekata, T., Kono, T., Sakai, M., Itami, T. & Katayama, H. (2009). Removal of Noroviruses from Municipal Wastewater by Foam Separation using Dispersed Air-Bubbles and Surface-Active Substance. *Separation Science and Technology*, 44 (3): 569-584.
- Svete, L. E. (2012). *Vegetated greywater treatment walls: design modifications for intermittent media filters*. [Ås]: [L.E. Svete]. VI, 49 s. : ill., fig. s.
- Tilley, E., Ulrich, L., Luethi, C., Reymond, P. & Zurbruegg, C. (2014). *Compendium of Sanitation Systems and Technologies*. 2nd revised utg. Duebendorf, Switzerland: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag).
- Todt, D., Jenssen, P. D., Klemencic, A. K., Oarga, A. & Bulc, T. G. (2014). Removal of particles in organic filters in experimental treatment systems for domestic wastewater and black water. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 49 (8): 948-954.
- Todt, D. (2015). *Personlig meddelelse* (20.4.2015).
- Todt, D., Heistad, A. & Jenssen, P. D. (2015). Load and distribution of organic matter and nutrients in a separated household wastewater stream. *Environmental Technology*: 1-10.
- Tonner-Klank, L., Moller, J., Forslund, A. & Dalsgaard, A. (2007). Microbiological assessments of compost toilets: In situ measurements and laboratory studies on the survival of fecal microbial indicators using sentinel chambers. *Waste Management*, 27 (9): 1144-1154.
- Tortora, G. J., Case, C. L. & Funke, B. R. (2013). *Microbiology: an introduction*. Boston: Pearson. XVIII, 818, [121] s. : ill. s.
- Traub, W. H. & Leonhard, B. (1995). HEAT-STABILITY OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 62 ANTIBACTERIAL AGENTS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35 (1): 149-154.
- Tree, J. A., Adams, M. R. & Lees, D. N. (2003). Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4): 2038-2043.

- Tuladhar, E., Bouwknecht, M., Zwietering, M. H., Koopmans, M. & Duizer, E. (2012). Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. *Journal of Applied Microbiology*, 112 (5): 1050-1057.
- Verstraete, W., Morgan-Sagastume, F., Aiyuk, S., Waweru, M., Rabaey, K. & Lissens, G. (2005). Anaerobic digestion as a core technology in sustainable management of organic matter. *Water Science and Technology*, 52 (1-2): 59-66.
- Vinnerås, B., Björklund, A. & Jönsson, H. (2003). Thermal composting of faecal matter as treatment and possible disinfection method—laboratory-scale and pilot-scale studies. *Bioresource Technology*, 88 (1): 47-54.
- Watson, J. T., Gayer, M. & Connolly, M. A. (2007). Epidemics after natural disasters. *Emerging Infectious Diseases*, 13 (1): 1-5.
- Webasto Thermosysteme GmbH. (2000). *Thermo Top Z/C repair shop manual*. Tilgjengelig fra: <http://www.elektromobily.org/w/images/1/13/Webasto.pdf> (lest 27.3.15).
- Wellings, F. M., Lewis, A. L. & Mountain, C. W. (1976). Demonstration of solids-associated virus in wastewater and sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 31 (3): 354-358.
- World Health Organization. (2006). *Volume 2: Wastewater use in agriculture*. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. 222 s.
- Zeeman, G. & Lettinga, G. (1999). The role of anaerobic digestion of domestic sewage in closing the water and nutrient cycle at community level. *Water Science and Technology*, 39 (5): 187-194.
- Ødegaard, H. (red.). (2012). *Vann- og avløpsteknikk*. 1 utg. Hamar: Norsk Vann.

Vedlegg A – Beskrivelse av materialer til *S.t.28b*

KPG-agar

Peptone	5 g
Yeast extract	0,5 g
Meat extract	3 g
Agar	15 g
Milli-Q-vann	1000 ml

Autoklaveres og nedkjøles. 9 cm petriskåler støpes med 18 ml agar.

Semi-solid KPG-agar (Softagar)

Peptone	5 g
Yeast extract	0,5 g
Meat extract	3 g
Agar	7 g
Milli-Q-vann	1000 ml

KPG-næringsmedium

Peptone	5 g
Yeast extract	0,5 g
Meat extract	3 g
Milli-Q-vann	1000 ml

Vedlegg B – Beskrivelse av materialer til ϕ X174

Det henvises til ISO-standard 10705-2:2000 for en mer detaljert beskrivelse av materialer.

Modified Scholten's Agar (MSA)

Peptone	10 g
Yeast extract	3 g
Meat extract	12 g
NaCl	3 g
Na ₂ CO ₃ -løsning (150 g/l)	5 ml
Mg-løsning (100 g MgCl ₂ ·H ₂ O i 50 ml vann)	0,3 ml
Agar	15 g
Milli-Q-vann	1000 ml

Autoklaveres og nedkjøles til 50 °C før det tilsettes 3,6 ml kalsiumkloridløsning (14,6 g CaCl₂·H₂O i 100 ml vann). 9 cm petriskåler støpes med 18 ml agar.

Semi-solid Modified Scholten's Agar (ssMSA/Softagar)

Peptone	10 g
Yeast extract	3 g
Meat extract	12 g
NaCl	3 g
Na ₂ CO ₃ -løsning (150 g/l)	5 ml
Mg-løsning (100 g MgCl ₂ ·H ₂ O i 50 ml vann)	0,3 ml
Agar	7 g
Milli-Q-vann	1000 ml

Modified Scholten's Broth (MSB)

Peptone	10 g
Yeast extract	3 g
Meat extract	12 g
NaCl	3 g
Na ₂ CO ₃ -løsning (150 g/l)	5 ml
Mg-løsning (100 g MgCl ₂ ·H ₂ O i 50 ml vann)	0,3 ml
Milli-Q-vann	1000 ml

Nalidiksinsyre

Nalidixic Acid (SIGMA-ALDRICH N8878-5G)	500 mg
NaOH-løsning (1 M)	4 ml
Milli-Q-vann	16 ml

Filtreres gjennom 0,22 µm sprøytefilter, og fryses ned i fryserør ved -22 °C. Kan fryses ned i porsjoner på 1 ml, passer da til 100 ml ssMSA.

Vedlegg C – Primærdata for fullskala hygieniseringsforsøk

Forsøk med *S.t.28b* som modellvirus (24. november 2014)

Gjentak 1

Klokkeslett	Tid (min)	Temp (intern) (°C)	Kommentarer	Konsentrasjon <i>S.t.28b</i> (bunn) (pfu/ml)
15:10		16	Prøve tatt. Det tok 40 min før dieselvarmeren startet.	1.85E+06
15:50	0	16	Dieselvarmeren startet	
16:00	10	21		
16:10	20	28		
16:20			Fra 16:10 til 16:40 var det problemer med dieselvarmeren	
16:30				
16:40	40	39		
16:50	50	45		
17:00	60	52		
17:10	70	60	Prøve tatt.	1.73E+06
17:20	80	65		
17:30	90	68	Prøve tatt.	1.73E+06
17:40	100	71	Noen problemer med dieselvarmeren (ca. 10 min)	
17:50	110	72		
18:00	120	75		
18:10	130	78	Prøve tatt.	1.57E+06

Gjentak 2

Klokkeslett	Tid (min)	Temp (intern) (°C)	Kommentarer	Konsentrasjon <i>S.t.28b</i> (bunn) (pfu/ml)
19:55	0	16	Prøve tatt	Ikke vekst av vertsbakterie
20:05	10	21		
20:15	20	28		
20:25	30	35		
20:35	40	43		
20:45	50	50		
20:55	60	56		
21:00	65	60	Prøve tatt	1.88E+06
21:05	70	63		
21:15	80	68	Prøve tatt	1.63E+06
21:25	90	71		
21:35	100	74		
21:45	110	77		
21:50	115	78	Prøve tatt	1.50E+06

Gjentak 3

Klokkeslett	Tid (min)	Temp (intern) (°C)	Kommentarer	Konsentrasjon S.t.28b (bunn) (pfu/ml)
22:30	0	17	Prøve tatt	2.24E+06
22:40	10	23		
22:50	20	30		
23:00	30	37		
23:10	40	45		
23:20	50	54		
23:30	60	60	Prøve tatt	2.02E+06
23:40	70	62		
23:50	80	65		
00:00	90	68	Prøve tatt	1.39E+06
00:10	100	72		
00:20	110	74		
00:30	120	78	Prøve tatt	1.82E+06

Forsøk med $\phi X174$ som modellvirus, gjentak 1 (9. mars 2015)

Klokkeslett	Tid (min)	Temp (intern) (°C)	Temp (ekstern, topp) (°C)	Temp (ekstern, bunn) (°C)	Kommentarer	Topp			Bunn				
						Konsentrasjon $\phi X174$ (pfu/ml)	TS (g/l)	SS (g/l)	Løst COD (mg/l)	Konsentrasjon $\phi X174$ (pfu/ml)	TS (g/l)	SS (g/l)	Løst COD (mg/l)
11:30	0	23		18	Prøve tatt					1.13E+06	7.65	5.10	2090
11:40	10	27		23									
11:50	20	36		31									
12:00	30	43		38									
12:10	40	51		46									
12:20	50	58	Ikke målt i dette gjentaket	54									
12:25	55	60		56	Prøve tatt	1.70E+05	5.90	3.14	2330	2.80E+05	5.73	3.00	2548
12:30	60	63		59									
12:40	70	68		63	Prøve tatt	1.10E+01	4.35	1.86	2727	2.93E+02	8.18	5.40	2461
12:50	80	71		67									
13:00	90	73		68									
13:10	100	76		73									
13:20	110	78		75	Prøve tatt	0	3.55	0.43	2795	1.31E+02	12.00	7.38	2478

Ved slutt: volumet redusert til 48 cm

Forsøk med $\phi X174$ som modellvirus, gjentak 2 (10. mars 2015)

Klokkeslett	Tid (min)	Temp (intern) (°C)	Temp (ekstern, topp) (°C)	Temp (ekstern, bunn) (°C)	Kommentarer	Topp				Bunn			
						Konsentrasjon $\phi X174$ (pfu/ml)	TS (g/l)	SS (g/l)	Løst COD (mg/l)	Konsentrasjon $\phi X174$ (pfu/ml)	TS (g/l)	SS (g/l)	Løst COD (mg/l)
12:00	0	23	17	17	Prøve tatt	7.85E+05	6.95	4.00	2052	7.65E+05	6.80	3.50	2091
12:10	10	29	23	22									
12:20	20	36	30	30									
12:30	30	46	40	40									
12:40	40	54	49	49									
12:50	50	60	54	54	Prøve tatt	1.94E+05	5.95	4.57	2295	1.60E+05	5.30	2.14	2439
13:00	60	66	62	62									
13:05	65	68	64	63	Prøve tatt	6.36E+01	3.75	1.00	2329	6.68E+02	3.15	1.40	2477
13:10	70	70	67	65									
13:20	80	73	71	68									
13:30	90	76	74	70									
13:35	95	78	76	71	Prøve tatt	0	3.25	0.60	2387	0	3.53	1.00	2305
13:40	100	78	77	72									
13:50	110	78	77	72									
14:05	125	78	76	71	Prøve tatt					0	3.38	0.75	Ikke analysert
14:35	155	76	75	70	Prøve tatt					0	3.23	0.25	Ikke analysert

Ved slutt: volumet redusert til 38 cm

Vedlegg D – Primærdata for labskala hygieniseringsforsøk

Varmetoleranse *S.t.28b*

Viruskonsentrasjoner er gitt som pfu/ml. Tiden måles fra da prøven nådde aktuell temperatur (± 2 °C).

Felles startkonsentrasjon

7.23E+06

60 grader

Oppvarmingstid: 9 min

	Tid (min)			
	0	30	60	90
Svartvann 1	7.50E+06	5.68E+06	5.40E+06	7.60E+06
Svartvann 2	5.90E+06	7.13E+06	8.10E+06	4.40E+06
Springvann	6.00E+06	6.53E+06	4.80E+06	4.12E+06

70 grader

Oppvarmingstid: 10 min

	Tid (min)			
	0	15	30	45
Svartvann 1	7.90E+06	5.10E+06	6.60E+06	4.60E+06
Svartvann 2	1.04E+07	5.77E+06	7.20E+06	6.30E+06
Springvann	3.03E+06	1.58E+06	6.71E+05	2.90E+05

80 grader

Oppvarmingstid: 12 min

	Tid (min)				
	-7 (ved 60 °C)	0	5	10	15
Svartvann 1	6.50E+06	5.30E+06	4.80E+06	4.93E+06	Ikke dyrket
Svartvann 2	7.90E+06	5.75E+06	5.25E+06	5.16E+06	4.62E+06
Springvann	4.80E+06	1.00E+02	2.10E+01	3.00E+00	0.00E+00

Varmetoleranse ϕ X174

Viruskonsentrasjoner er gitt som pfu/ml. Tiden måles fra da prøven nådde aktuell temperatur (± 2 °C).

Felles startkonsentrasjon

6.20E+05

60 grader

Oppvarmingstid: 10 min

	Tid (min)			
	0	30	60	90
Svartvann 1	1.24E+05	9.95E+02	5.72E+01	9.55E+00
Svartvann 2	7.61E+04	8.15E+02	4.37E+01	9.09E+00
Springvann	1.53E+04	1.76E+03	3.05E+02	8.77E+01

70 grader

Oppvarmingstid: 12 min

	Tid (min)			
	0	15	30	45
Svartvann 1	1.50E+01	0	0	0
Svartvann 2	1.00E+01	0	0	0
Springvann	4.00E+01	0	0	0

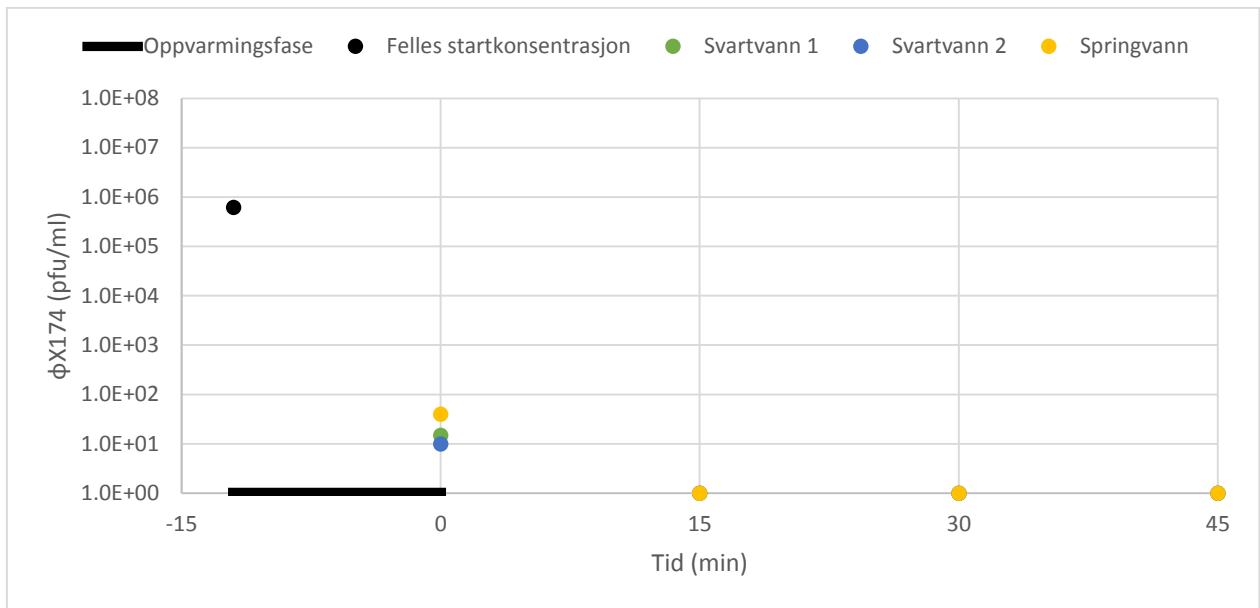
80 grader

Oppvarmingstid: 13 min

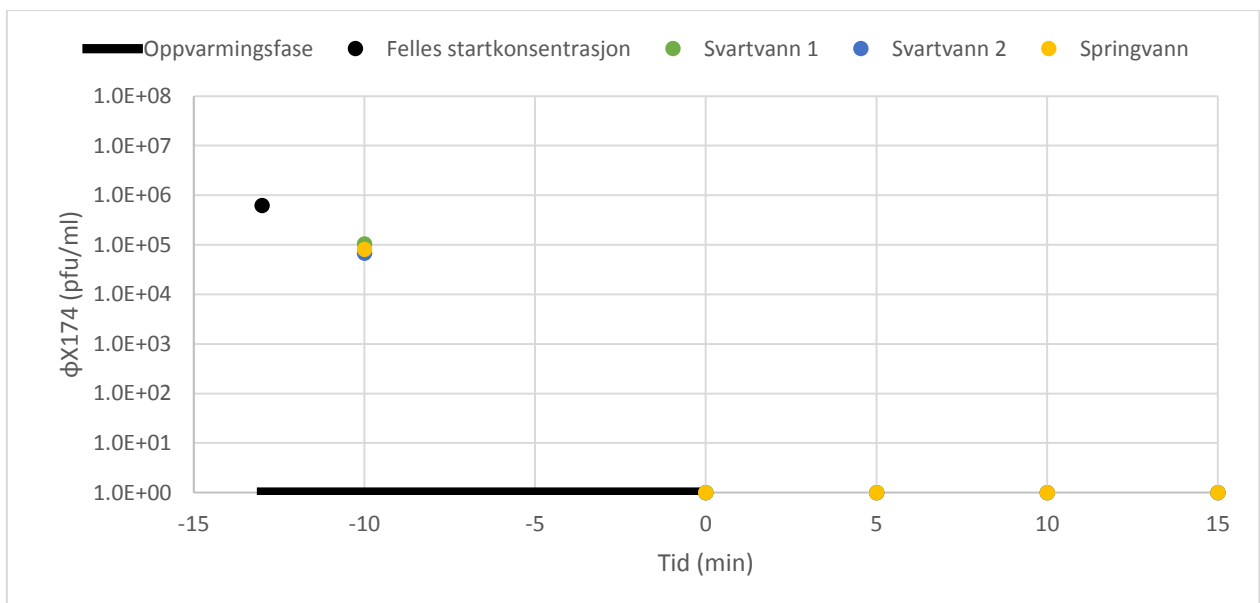
	Tid (min)				
	-10 (ved 60 °C)	0	5	10	15
Svartvann 1	1.05E+05	0	0	0	0
Svartvann 2	6.82E+04	0	0	0	0
Springvann	8.18E+04	0	0	0	0

Romtemperatur

	Start	7 timer senere
Gjentak 1	2.40E+05	5.23E+04
Gjentak 2	2.50E+05	5.82E+04



Figur D - 1: Termisk inaktivering av ϕ X174 ved 70 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 70 °C. Punkt som ligger på førsteaksen har verdier under deteksjonsgrensen.



Figur D - 2: Termisk inaktivering av ϕ X174 ved 80 °C. Oppvarmingsfasen er vist med svart på førsteaksen. Tiden er målt fra da prøvene nådde 80 °C. Ved -10 min var temperaturen i prøven 60 °C. Punkt som ligger på førsteaksen har verdier under deteksjonsgrensen.

Vedlegg E – Primærdata for sonikeringsforsøket

Sonikeringstid (min)	Viruskonsentrasjon (pfu/ml)	
	Gjentak A	Gjentak B
0	5.25E+06	7.70E+06
0,5	6.12E+06	5.70E+06
1	3.90E+06	4.97E+06
2	6.30E+06	5.15E+06
3	5.42E+06	6.70E+06
4	5.20E+06	5.80E+06
5	6.20E+06	5.20E+06



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no