



Hygienisering av gödsel med urea och ammoniak

Ammonia and urea manure hygienisation

**Jakob R. Ottoson
Annika Nordin
Björn Vinnerås**

SLU
Institutionen för biometri och teknik

**Rapport – miljö, teknik och
lantbruk 2006:02**

SLU
Department of Biometry and Engineering

**Uppsala 2006
ISSN 1652-3237**

SAMMANFATTNING

Gödsel från ko kan innehålla stora mängder av sjukdomsframkallande mikroorganismer, t.ex. *Salmonella*, *Campylobacter*, enterohaemorragiska *E. coli* (EHEC), parasiter och virus. Otillräckligt desinfekterad gödsel har i epidemiologiska studier visat sig vara en viktig orsak till förekomsten av patogener i djurbesättningar. Dessutom har smittspridning från gödsel till människa påvisats, t.ex. vid sommarens (2005) utbrott av EHEC i Halland. Eftersom många patogener överlever lång tid i jord och vatten rekommenderas någon form av behandling av gödslet innan det sprids. Metoder som används, förutom lagring, är rötning, kompostering och desinfektion. I det senaste fallet är behandling med kalk brukligt vid utbrottsituationer på en gård. Kalkbehandling höjer pH till 12 under en kortare period och ger en effektiv hygienisering av materialet. Problemet är att hanteringen är komplicerad, arbetsmiljömässigt oönskad, ger utfällningar med svårigheter till inblandning etc. Dessutom leder kalkbehandling till kväveförluster med ett minskat gödselvärde som följd.

I det här projektet undersöktes möjligheten att oskadliggöra smittämnen under lagring genom att tillsätta urea eller ammoniak. Urea är det vanligast förekommande kvävegödselmedlet i världen. Vid tillsats till jord bildas ammoniak och koldioxid med hjälp av enzymet ureas som utsöndras av jord- och tarmbakterier. Detsamma sker vid tillsats till flytgödsel, som det här avdödningsförsöket utfördes i. Vid högre pH befinner sig större del av ammoniaken i den oladdade formen, som är den som är hygieniserande, medan den vid ett lägre pH befinner sig i den för växterna tillgängliga ammoniumjonformen. Vid tillsats av ammoniak, som är en starkare bas, kommer pH att bli högre än vid tillsats av urea. Detta innebär att samma hygieniserande effekt kan uppnås med mindre tillsats. Ammoniak finns kommersiellt tillgängligt i vattenlöslig form. Därför kan tillsats av ammoniak vara ett mer tilltalande alternativ ekonomiskt. Vid tillsats av urea eller ammoniak ökar gödselvärdet på grund av att kväve tillförs. Det är dock viktigt att behandlingen sker i täckta behållare för att undvika kväveförluster i form av ammoniakemissioner.

Tidigare avdödningsförsök i humanfekalier har visat på en snabb avdödning av framför allt *E. coli*, men även *Salmonella*, vid behandling med 6% (w/w) urea. I det här försöket har vi tillsatt höga halter av *Salmonella*, enterokocker och en bakteriofag till flytgödsel som samlades in på Kungsängens gård i Uppsala. Enterokocker är, efter koliforma bakterier, den näst vanligaste gruppen av indikatorer på fekal förorening. De används som komplement då den i många miljöer är tåligare än koliformerna. Bakteriofager är virus som infekterar bakterier, men inte eukaryota celler, och därför är lätta och ofarliga att hantera. De har tidigare använts som modell för avdödning av virus i ett flertal studier. Mikroorganismerna tillsattes i halter om 10^6 - 10^8 koloni- eller plackbildande enheter (CFU/PFU) per gram gödsel. Efter att organismerna fått adaptera till materialet över natten tillsattes 2 % urea eller 0,5% ammoniak till materialet. Dessutom utfördes försök utan tillsats som en kontroll. Försöken utfördes vid 14 respektive 4 °C.

Salmonella påverkades kraftigt av behandlingen och kunde vid ammoniakbehandling (pH ~ 9,7) inte detekteras efter 2 dygn i 14 °C eller 6 dygn i 4 °C. Även ureabehandling (pH ~ 9,2) gav en effektiv avdödning av *Salmonella* vid såväl 4 som 14 °C. Tiden för en logs (90%) reduktion, decimaltiden, reducerades med mellan 76 och 97% jämfört med kontrollerna (tabell, sist i sammanfattningen).

Enterokockerna påverkades inte alls i samma utsträckning av behandlingen även om en signifikant snabbare avdödning skedde vid tillsats av såväl ammoniak som urea, i det sistnämnda fallet dock bara vid 14 °C (tabell 1). Dessutom dröjde det i regel ett par dagar till dess att halterna började sjunka. Tillsats av urea verkade till en början vara tillväxtbefrämjande. Samma fenomen har tidigare observerats i urin.

Fagera påverkades inte alls av behandlingen utan avdödningen skedde log-linjärt (exponentiellt) av andra orsaker, antagligen förekomsten av DNAs (enzym som bryter ner DNA) i materialet. Avdödningen var signifikant snabbare vid 14 än vid 4 °C.

Ytterligare ett försök med salmonellasmittad gödsel gjordes i 14 °C, där ett symptomlöst utbrott på en gård simulerades. Ammoniak (0,5%) eller urea (2%) tillsattes till flytgödsel i burkar och stå över helgen. Under följande vecka tillsattes 1% salmonellasmittad gödsel (10^7 CFU/g) ovanpå den desinfekterade gödseln. Detta är vad som skulle ske på en gård om man utför desinfektionen i brunnen medan ett utbrott ovetandes pågår. Under behandlingen (5 dagar) tillfördes smittad gödsel dagligen utan omblandning. Efter nästa helg blandades materialet om och prov togs ut. Halten *Salmonella* var 1 000 gånger lägre i ammoniakburkarna och 100 gånger lägre i burkarna med ureatillsats än i kontrollen. Efter ytterligare två dagar låg salmonellahalterna under detektionsnivån i ammoniakbehandlingen, efter fyra i ureabehandlingen, medan det i kontrollen fortfarande gick att detektera *Salmonella* efter 35 dagar när försöket avslutades.

Ammoniak, i tillsats som vattenlösning eller i form av urea, visade sig vara effektivt för att hygienisera *Salmonella* i nötgödsel (flytgödsel med en torrsbstanshalt, TS, på 12%). Om en fem logs reduktion (99,999%) är önskvärd räcker det med mindre än en veckas behandling med 0,5% ammoniak vid såväl 4 som 14 °C. Behandling med urea 2% under 10 dagar vid 14 °C eller 24 dagar vid 4 °C ger också samma effekt. Denna tid kan sänkas genom att pH (och halten fri ammoniak) höjs i materialet med hjälp av en starkare bas t.ex. kalk, aska, natrium- eller kaliumhydroxid. För fem logs reduktion utan tillsats krävs lagring i 170 dagar vid 4 eller 42 dagar vid 14 °C.

Den kvarvarande effekten av ammoniak som finns när man använder täckta behållare gör att behandlingen pågår även under transport i tankbilar. Annars har just transporter och återinfektion av hygieniserat material visat sig vara ett problem. Dessutom utgör desinfektion av gödsel en trygghet i de fall där symptomlösa utbrott skulle förekomma. Idisslare är en viktig reservoar för EHEC och endast ett fåtal stammar inducerar sjukdom hos djuren, som ändå kan utsöndra för människor sjukdomsframkallande bakterier i stora mängder.

Användandet av enterokocker som indikator för salmonellaförekomst i gödsel efter hygienisering med ammoniak skulle leda till en överskattning av risken på grund av deras större tolerans och annorlunda beteende i materialet. Vi föreslår användandet av andra indikatorer än enterokocker, t. ex. *E. coli* eller fekala koliformer, för salmonellaförekomst i ammoniakbehandlat nötgödsel.

Tiden för en logs reduktion (90%), decimaltiden, för Salmonella, enterokocker och bakteriofager, i kvävebehandlat nötgödsel vid 4 respektive 14 °C

Behandling	Temperatur [°C]	Organism och tid för decimalreduktion ^a (dagar)		
		Salmonella	Enterokocker	Bakteriofager ^b
Urea 2%	14	2,0	15	24
Urea 2%	4	4,8	43	31
Ammoniak 0,5%	14	0,4	6,2	28
Ammoniak 0,5%	4	1,1	9,1	37
Kontroll	14	8,3	26	25
Kontroll	4	34	30	39

^a Tid för en logs, 90%, reduktion.

^b Det var inga signifikanta skillnader mellan ammoniakbehandlingarna. D-värdet var 27 dagar i 14 °C och 39 dagar i 4 °C

En simulering på tiden för fem log reduktion gjordes för att kunna ta med osäkerheten i analyserna vid utarbetningen av rekommendationerna. Resultaten av simuleringen presenteras i tabellen nedan och rekommendationerna baserar sig på det övre 95%-värdet med vissa förenklingar. Minst två veckors lagring efter behandling med urea 2% vid temperaturer över 10 °C, minst en månad vid lägre temperaturer. Efter ammoniaktillsats räcker det med en vecka medan lagring utan tillsatt kväve bör omfatta minst en sommar.

Tabell. Tiden i dagar för att uppnå fem log reduktion av Salmonella efter behandling med 2% urea eller 0,5% ammoniak samt kontroll utan tillsats vid 4 °C respektive 14 °C

	Urea		Ammoniak		Kontroll	
	14 °C	4 °C	14 °C	4 °C	14 °C	4 °C
Median	10,2	23,8	1,8	5,4	41,7	168
Övre 70%	11,4	26,3	1,9	5,9	47,2	223
Övre 90%	13,8	31,0	1,9	6,8	59,0	400
Övre 95%	15,3	33,9	2,0	7,3	66,1	606

SUMMARY

Cow manure may contain substantial amounts of pathogenic microorganisms such as *Salmonella*, *Campylobacter*, enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), parasites and viruses. Insufficiently disinfected manure has been shown to be a significant factor for the occurrence of pathogens in animal herds. Further, transmission of disease from manure to man has been verified, for example the outbreak of EHEC in Halland this summer (2005). Treatment of the manure before application to land is suggested, to decrease the risk of disease transmission to man or other animals, since microorganisms may survive for extended periods of time in soil. Storage, composting, anaerobic digestion and chemical disinfection are common practises. In outbreak situations, the common practise is lime treatment of the manure. Lime raises pH to around 12 for a period of time, leading to a rapid pathogen die-off. The problem is that the handling is complicated with salt precipitation making the incorporation difficult. Further, lime treatment leads to nitrogen losses with a lower agronomic value of the manure.

In this project the possibilities of pathogen disinfection with urea or ammonia was evaluated. Urea is the globally most used nitrogen fertiliser. When applied to soil it is converted to ammonia and carbon dioxide by the enzyme urease that is naturally excreted by soil and intestinal bacteria. The same thing will happen if urea is added to manure. With a higher pH, more of the ammonia will be present in the uncharged form, which is disinfecting. At a lower pH, the ammonia will be present in the plant assimilable ion form. If the ammonia is added as ammonia (aq), which is a stronger base than urea, pH will be higher. Thus, less ammonia needs to be added for the same disinfecting effect providing an economically interesting option. The addition of urea or ammonia raises the agronomic value of manure, however, it is important that the manure well is covered to avoid nitrogen losses.

Earlier die-off studies in human faeces have reported a rapid die-off of especially *E. coli*, but also *Salmonella* after addition of 6% (w/w) urea. In this study we have added high numbers of *Salmonella*, enterococci and a bacteriophage to liquid manure (TS 12%) that was collected at Kungsängens gård in Uppsala. Enterococci are, after coliforms, the most common group of faecal indicator microorganisms. They are used as a complement to the coliforms since they are more tolerant to many types of environmental stress. Bacteriophages are viruses that infect bacteria, but not eucaryotic cells, and are therefore easy and harmless to handle. They have earlier been used as a model for viral die-off in several reported studies. The microorganisms were added in numbers between 10^6 and 10^8 colony- or plackforming units (CFU/PFU) per gram manure. After the organisms had the chance to adapt to the material over night, 2% urea or 0.5% ammonia was added to the material. There was also a control study with no addition of ammonia. The experiments were carried out in triplicates at 4 and 14 °C.

Salmonella were severely affected by the treatment and could not be detected after 2 days at 14 °C and 6 days at 4 °C after the addition of ammonia (~pH 9.7). Also urea treatment (~pH 9.2) gave a significant die-off of *Salmonella* at 14 as well as 4 °C. The time for 1 log reduction (90%), decimal reduction, was reduced between 76% and 97% compared to the controls (Table, at the end of the summary).

Enterococci was not affected in the same way as *Salmonella* even if the die-off was significantly quicker in ammonia as well as urea treated manure than in the control, in the latter case, however, only at 14 °C (see Table, at the end of the summary). Further, it took some time for the ammonia treatment to be effective. Urea addition seemed to be growth promoting, at least initially. This phenomenon has earlier been documented in studies of enterococci in urine.

The phages were not affected at all by ammonia treatment but the reduction took place log-linearly (exponentially) for other reasons, probably by the presence of DNase (enzyme breaking down DNA) in the material. The die-off was significantly quicker at 14 than 4 °C.

Another *Salmonella* experiment was carried out, where an outbreak situation at a farm was simulated. Ammonia or urea was added to liquid manure in jars that were kept over the weekend. During the following week, 1% salmonella infected manure (10^7 CFU/g) was added on top of the disinfected manure. This is what would happen at a farm if disinfection was performed during the time of an asymptomatic outbreak. Infected manure was added during five consecutive days without any incorporation into the disinfected manure. After the following weekend, the contents in the jars were mixed and the material sampled. The *Salmonella* densities were 1 000 times lower in the ammonia treated, and 100 times lower in the urea treated, manure than in the control. After another two days, the *Salmonella* level was below detection limit in the ammonia treated manure, after four in the urea treated, while it was still possible to detect *Salmonella* in the control after 35 days when the experiment was ended.

Ammonia, added as a water-soluble or in the form of urea, proved to effectively disinfect *Salmonella* in cow manure (liquid manure with a dry substance, DS, of 12 %). If a six log reduction (99,999%) is desired, less than a week treatment with 0.5% ammonia is needed in 14 as well as 4 °C. Treatment with urea for 10 days at 14 °C or 24 days at 4 °C will also lead to the same hygiene effect. This time can be shortened by raising the pH (and thereby the amount of free ammonia) in the material by the addition of a stronger base such as lime, ashes, sodium- or potassium hydroxide. The time for five log reduction without additives was 170 days at 4 and 42 days at 14 °C.

The long-term ammonia disinfection effect in covered compartments leads to further treatment during transports in tanks. Otherwise, reinfection of hygienised material has caused problems during transports. Further, disinfection of manure is a safety barrier in case of an asymptomatic outbreak at a farm. Ruminants are an important reservoir for EHEC and only few strains induces infection in animals that still can shed a lot of bacteria of clinical importance for humans.

The use of enterococci as an indicator of *Salmonella* occurrence after ammonia treatment would lead to an overestimation of the risk due to their tolerance and different behaviour in the material. We suggest that other indicators are used, for example *E. coli* or faecal coliforms, as indicators of *Salmonella* occurrence in ammonia treated manure.

The time for one log reduction (90%), decimal reduction, for Salmonella, enterococci and bacteriophages in nitrogen treated cow manure at 4 and 14 °C

Treatment	Temperature [°C]	Organism and time for decimal reduction ^a (days)		
		<i>Salmonella</i>	Enterococci	Bakteriophages ^b
Urea 2%	14	2.0	15	24
Urea 2%	4	4.8	43	31
Ammonia 0.5%	14	0.4	6.2	28
Ammonia 0.5%	4	1.1	9.1	37
Control	14	8.3	26	25
Control	4	34	30	39

^a Time for one log, 90%, reduction.

^b There were no significant differences between ammonia treatments on the inactivation of Bacteriophages. The D-value was 27 days at 14 °C and 39 days at 4 °C

To be able to account for the uncertainty of the analysis the time to achieve five log reduction was simulated and results presented in the table below. The recommended treatment is based on the upper 95% value and simplified to; at least two weeks treatment with 2% urea at temperatures above 10 °C, one month at lower temperatures. For ammonia one week after the addition of 0.5% is sufficient while storage should include at least one summer season.

Table. The time, expressed as days, to achieve five log reduction of Salmonella after treatment with 2% urea or 0,5% ammonia and the control with no additives at 4 °C and 14 °C

	Urea		Ammonia		Control	
	14 °C	4 °C	14 °C	4 °C	14 °C	4 °C
Median	10.2	23.8	1.8	5.4	41.7	168
Upper 70%	11.4	26.3	1.9	5.9	47.2	223
Upper 90%	13.8	31.0	1.9	6.8	59.0	400
Upper 95%	15.3	33.9	2.0	7.3	66.1	606

FÖRORD

Projektet är finansierat av Jordbruksverket, SJV och Forskningsrådet för miljö, areella näringar och samhällsbyggande, FORMAS. Dietrich von Rosen, SLU, Institutionen för Biometri och teknik, tackas särskilt för att ha delat med sig av sin statistiska kunskap.

INNEHÅLL

BAKGRUND	9
SYFTE.....	11
TIDIGARE STUDIER.....	12
MATERIAL OCH METODER	13
Försök 1.....	13
<i>Material och organismer</i>	13
<i>Uppodling och tillsats av testorganismer</i>	13
<i>Bestämning av halter</i>	13
<i>Bearbetning av resultat</i>	14
Försök 2.....	14
RESULTAT	15
Salmonella.....	17
<i>Försök 2</i>	17
Enterokocker	18
Bakteriofager.....	20
Avdödningssimulering	21
DISKUSSION	22
BEHANDLINGSREKOMMENDATIONER.....	24
SLUTSATSER.....	25
REFERENSER.....	26

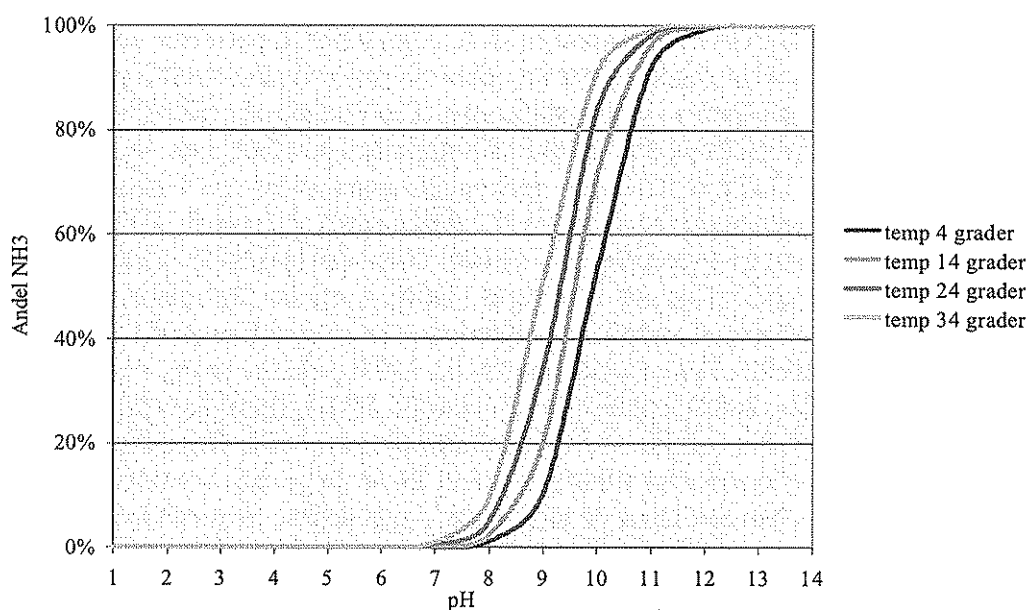
BAKGRUND

Gödsel från ko kan innehålla stora mängder av sjukdomsframkallande mikroorganismer, t.ex. *Salmonella*, *Campylobacter*, enterohaemorragiska *E. coli* (EHEC), parasiter och virus (Pell, 1997). Otillräckligt desinfekterad gödsel har i epidemiologiska studier visat sig vara en viktig orsak till förekomsten av patogener i djurbesättningar (Cardinale m.fl., 2004; Veling m.fl., 2002). Dessutom har smittspridning från gödsel till människa påvisats, t.ex. vid sommarens (2005) utbrott av EHEC i Halland. Eftersom många patogener överlever länge i jord (Nicholson m.fl., 2005) och vatten (Medema m.fl., 1997; Stallknecht m.fl., 1990) rekommenderas någon form av behandling av gödslet innan det sprids på åkern (Nicholson m.fl., 2005). Lagring, kompostering och rötning är vanliga metoder för behandling av gödsel. Reduktionen av sjukdomsframkallande mikroorganismer är en funktion av tid (Himathongkham m.fl., 1999a; Himathongkham m.fl., 1999b; Turner m.fl., 1999) temperatur, pH (Park & Diez-Gonzalez, 2003), salthalt (Arthurs m.fl., 2001), fuktighet (Edwards, 2000; Himathongkham m.fl., 1999b) och konkurrerande mikroflora (Unc & Goss, 2004). Desinfektion med hjälp av kemikalier tillämpas också för att hygienisera smittat material. Exempel på tillsatser som kan användas är kalk, aska, perättiksyra, urea och ammoniak (Burge m.fl., 1983; Himathongkham & Riemann, 1999; Park & Diez-Gonzalez, 2003; Vinnerås m.fl., 2003).

Det brukliga vid utbrottsituationer i Sverige är desinfektion med kalk. Kalkinblandning leder till en pH-höjning till pH 12 vilket har en hygieniserande effekt. I takt med att pH sjunker försämras effekten och återväxt av t.ex. *Salmonella* kan ske. De höga pH:t leder till omfattande ammoniakavgång och därmed ett förlorat gödselvärde. Andra problem med kalkinblandning är bildandet av svårlösliga salter som klumpar sig i materialet samt en ohälsosam arbetsmiljö (Vinnerås m.fl., 2004).

I det här projektet undersöktes möjligheten att oskadliggöra smittämnen i flytgödsel från nöt under lagring genom att tillsätta urea eller ammoniak. Ammoniakmolekylen är liten och oladdad och kan diffundera över cellmembranen. Inne i bakteriecellen höjs pH och jonbalansen påverkas vilket har en bakteriocid effekt (Schneider m.fl., 1996). Ammoniak har också visat sig vara virucid, troligen genom att klyva viralt RNA (Ward, 1978).

Urea är det vanligast förekommande kvävegödselmedlet i världen. Vid tillsats till jord bildas ammoniak och koldioxid med hjälp av enzymet ureas (Vinnerås m.fl., 2004). Detsamma sker vid tillsats till flytgödsel, som det här avdödningsförsöket utfördes i. Etthögre pH ger större andel av ammoniak i den oladdade formen, den form som verkar hygieniserande, medan den vid ett lägre pH befinner sig i den för växterna tillgängliga ammoniumjonformen (figur 1). Tillsats av ammoniak, som är en starkare bas, ger ett högre pH än vid tillsats av urea. Detta innebär att en mindre mängd kan tillsättas, men med samma hygieniserande effekt. Ammoniak finns kommersiellt tillgängligt i vattenlöslig form (i upp till 28 % konc.) som är lättare att blanda in i gödsel än både kalk och urea. Därför kan tillsats av ammoniak vara ekonomisk ett mer tilltalande alternativ. Vid tillsats av urea eller ammoniak ökar gödselvärdet på grund av att kväve tillförs. Båda ämnena finns kommersiellt tillgängliga till ett pris i paritet med kvävegödsel. Det är dock viktigt att behandlingen sker i täckta behållare för att undvika kväveförluster i form av ammoniakemissioner.

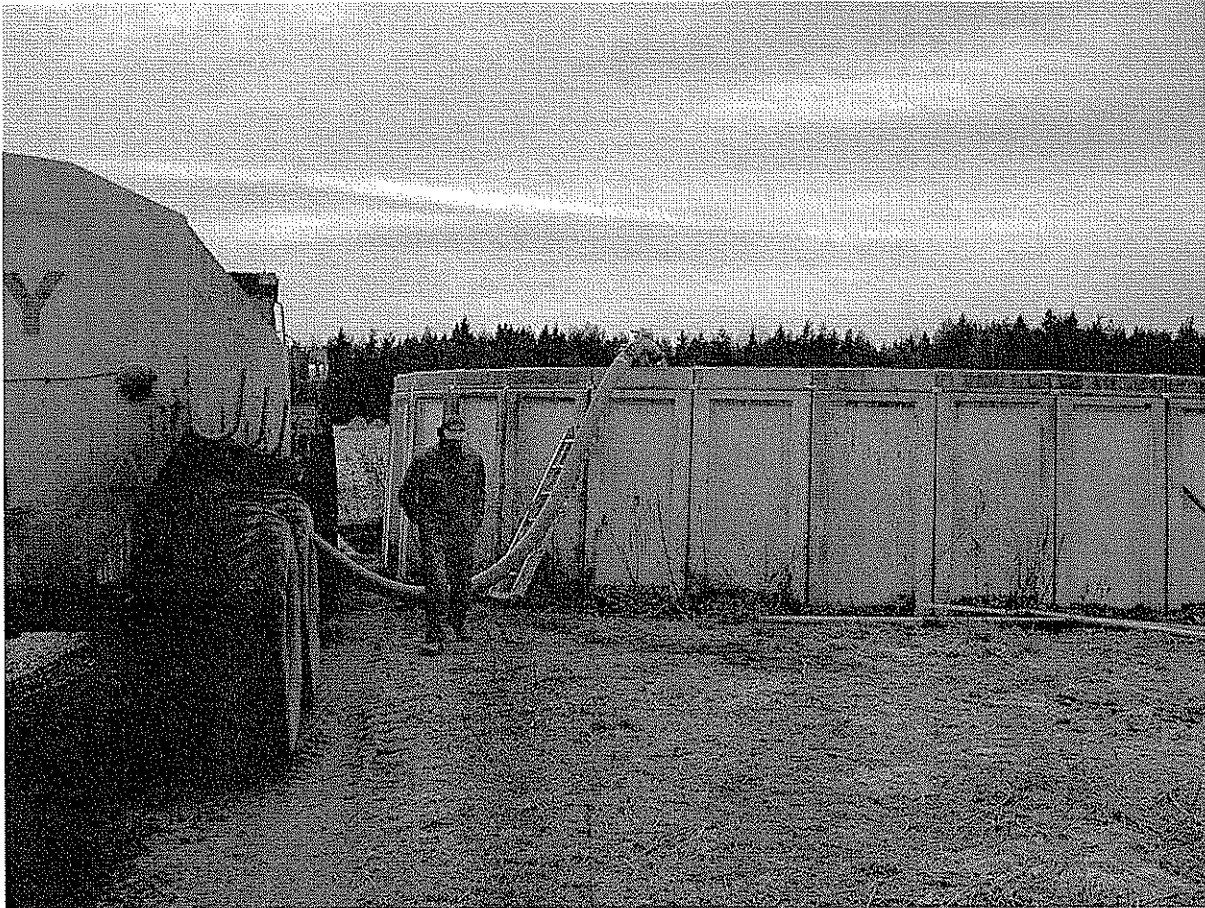


Figur 1. Andelen fri ammoniak beroende på pH och temperatur.

Tidigare avdödningsförsök i humanfekalier har visat på en snabb avdödning av framför allt *E. coli*, men även *Salmonella*, vid behandling med 6% (w/w) urea (Vinnerås m.fl., 2003). I det här försöket har vi tillsatt höga halter av *Salmonella*, enterokocker och en bakteriofag till flytgödsel för att kunna följa effekten av behandlingen. Enterokocker är, efter koliforma bakterier, den näst vanligaste gruppen av indikatorer på fekal förorening. De används som komplement då den i många miljöer är tåligare än koliformerna (Geldreich, 1978). Bakteriofager är virus som infekterar bakterier, men inte eukaryota celler, och därför är lätta och ofarliga att hantera. De har tidigare använts som modell för avdödning av virus i ett flertal studier (Höglund m.fl., 2002; Vinnerås m.fl., 2003).

SYFTE

Syftet med rapporten är att studera hur behandling med urea och ammoniak påverkar avdöningen av *Salmonella* och mikrobiella indikatorer i nötgödsel. Vidare är syftet att, baserat på avdöningshastigheten, utarbeta rekommendationer om tillsats och behandlingstid för gödsel i förebyggande syfte samt i samband utbrottssituationer på en gård.



Det är viktigt att undvika kväveförluster vid behandling och spridning av gödsel. Därför måste en gödselbrunn som denna täckas under behandlingen, till exempel med en presenning. Foto: Sten-Olof Dimander.

TIDIGARE STUDIER

Tidigare avdödningsförsök i humanfekalier har visat på en snabb avdödning av *E. coli* och *Salmonella*, vid behandling med 6% (w/w) urea. Den kvävehalt man då kommer upp i kan ge problem vid spridning med dagens teknik. Kan man komma ner i nivå är det inte bara fördelaktigt användarmässigt utan även en ekonomisk besparing (Vinnerås m.fl., 2003). Hygienisering med ammoniak och urea har också rapporterats av internationella forskargrupper. Mendez m.fl. (2004) noterade en sex log reduktion av *Salmonella* efter två timmar i slam. Halten ammoniak var dock 20 % (w/w), vilket är kostsamt att tillsätta samt att det slammets måste spädas innan det är möjligt att spridas med dagens teknik. Park & Diez-Gonzalez (2003), ser användning av urea som ett billigt och bra alternativ för hygienisering av gödsel. Vid ökat pH fick de en snabbare avdödning av såväl EHEC som *Salmonella*, vilket de tillskrev ökad ammoniak-, men dessutom karbonatjonhalt.



Kor kan utsöndra mikroorganismer som orsakar sjukdom hos människa, t.ex. Salmonella.
Foto: Sten-Olof Dimander.

MATERIAL OCH METODER

Två olika försök utfördes inom ramen för projektet. I det första (försök 1) gjordes kontrollerade tillsatser och avdödningen följdes för att få ett matematiskt samband mellan avdödningen och tiden. I försök 2 simulerades lagringen i en gödselbrunn under en utbrottssituation.

Försök 1

Material och organismer

Flytgödsel med en torrs substans på 12% hämtades på Kungsängens gård och fördelades i 18 stomacherpåsar (Grade Packaging Ltd.; Coalville, United Kingdom), ca 300 gram i varje. De mikroorganismer som tillsattes för avdödningsförsöket var *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* samt ett bakterievirus, *Salmonella Typhimurium* fag 28B (Lilleengen, 1948).

S. typhimurium som användes vid undersökningen är en stam som tidigare isolerats från rötat avloppsslam (Sahlström m.fl., 2004). Denna stam, med fagtyp 178, har visat på bättre överlevnad i andra försök jämfört med lab-stammar (opublicerade data). Enterokocker är naturligt förekommande i tarmen hos varmblodiga djur och, efter koliforma bakterier, den näst vanligaste indikatorn på fekal förorening i miljön. De är tåligare gentemot yttre påverkan och därmed ökar möjligheten att följa behandlingseffekten under en längre tid jämfört med *Salmonella*. Stammen som tillsattes kommer från American Centre for Type Collection, ATCC, och har nummer 29232. Fagen, *Salmonella Typhimurium* fag 28B, har ett snävt värdspektrum och återfinns inte vanligtvis, eller har möjlighet att tillväxa, i miljön. I och med att den dessutom är tålig för många former av behandlingar (Höglund m.fl., 2002; Vinnerås m.fl., 2003) gör fag 28B till en lämplig organism att använda som konservativ modell för animala virus i kontrollerade tillsatsförsök.

Uppodling och tillsats av testorganismer

Bakterierna odlades i näringsbuljong (Oxoid; Sollentuna, Sverige) under 5 timmar vid 37 °C under skak till ca 10⁹ CFU/ml och sattes till gödslet i påsarna i halter mellan 10⁶ och 10⁷ CFU/g gödsel.

Fagerna hade tidigare propagerats på sin värdstam, *S. Typhimurium* typ5. Från denna fagsuspension, ca 10¹⁰ PFU/ml, tillsattes 1 ml till varje påse med gödsel till en halt omkring 10⁸ PFU/g.

Organismerna tilläts adaptera till materialet över natt innan 2% urea eller 0,5% ammoniak (w/w) tillsattes. Inkuberingen skedde i 4 °C och 14 °C. Detta gav sammanlagt sex regimer där avdödningen följdes i triplikat för att kunna göra en adekvat statistisk bedömning på effekten av temperatur, pH (ammoniakhalt) samt samspelet mellan dem.

Bestämning av halter

Vid varje provtagningstillfälle togs 3 – 5 g gödsel per påse ut och späddes 1:9 i fosfatbuffert. Från denna första spädning togs 1 ml till 9 ml NaCl vidare i en spädningsserie så långt som nödvändigt. För bestämning av *Salmonella* spreds 100 µl på xylos lysin desoxycholat (XLD) agar (Oxoid) med novobiocin för att förhindra tillväxt av atypiska organismer. Svarta kolonier räknades efter inkubering i 21 timmar vid 37 °C. Enterokocker bestämdes på Slanetz-Bartley (SlaBa) agar (Oxoid) efter inkubering i 44 timmar vid 37 °C. Bakteriofagerna bestämdes

genom dubbelagarmetoden (Adams, 1959). Vårdstammen odlades vid 37 °C under skak i tre timmar till en halt av cirka $2 \cdot 10^8$ CFU/ml. På en blodagarbasplatta (Oxoid) spreds en blandning av 2 ml softagar (blodagarbas med lägre agarhalt, ca 12 g/l), 1 ml prov samt 1 ml vårdstam. Plattan inkuberades i 18 timmar vid 37 °C varefter klara zoner, plack, i bakteriemattan räknades.

Ammoniakkoncentrationen mättes spektrofotometriskt på en Thermo Aquamate (Thermo Electron Ltd.; Cambridge, UK) med indofenol blå metoden (Merck; Whitehouse Station, NJ) enligt tillverkarens instruktioner. Koncentrationen av fri ammoniak beräknades baserat på den uppmätta halten totalammonium, pH och temperatur enligt metoden i Svensson (1993) som bestämde syrakonstanten för ammonium vid olika temperaturer empiriskt.

Bearbetning av resultat

De statistiska analyserna utfördes i två steg. I det första användes Random Coefficient Regression Analysis (mixed linear model) för att möjliggöra korrekta signifikanstest. I det andra var vi intresserade av den linjära avdödningen över tiden. I detta fall var statistiken deskriptiv och linjära regressionslinjer anpassades till de uppmätta halterna i kombinationerna av temperatur och tillsatser av urea och ammoniak.

För random coefficient regression analysen användes följande modell:

$$y_{ijkl} = \mu + \beta t_{ijkl} + \delta_j + \alpha_k + \tau_i + \varepsilon_{ijkl}$$

där μ , β , δ_j and α_k är okända parametrar medan $\tau_i \sim N(0, \sigma^2_i)$, $\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma^2)$ och $N(0, \sigma^2)$ representerar normalfördelningen med medelvärdet 0 och variansen σ^2 . Här representerar index i det i:e gödselprovet, j temperaturen (14 °C or 4 °C), k tillsatsen (Urea, Ammonia, Control) och l replikaten. Variabeln t_{ijkl} representerar tidpunkterna för provtagningarna. I den deskriptiva delen beräknades interceptet och lutningen tillsammans med standardfel och korrelationskoefficient. Baserat på resultaten från regressionsanalysen simulerades tiden för att uppnå en fem log reduktion av *Salmonella* i de olika behandlingarna. Detta gjordes med Monte-Carlosimulering i @Risk 3.5.2 (Palisade Corporation; Ithaca, NY). De statistiska analyserna utfördes i SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc; Cary, NC) och diagrammen i SigmaPlot 2001 (SPSS; Chicago, IL).

Försök 2

Till försök 2 användes flytgödsel från samma källa och samma salmonellastam som i försök 1. Ammoniak (0,5%) eller urea (2%) tillsattes till flytgödsel i burkar och fick stå över helgen. Under följande vecka tillsattes 1% salmonellasmittad gödsel (10^7 CFU/g) ovanpå den desinfekterade gödseln. Detta är vad som skulle ske på en gård om man utför desinfektionen i brunnen medan ett utbrott ovetandes pågår. Under behandlingen (5 dagar) tillfördes smittad gödsel dagligen utan omblandning. Efter nästa helg blandades materialet om och prov togs ut 7, 9, 13 och 35 dagar efter första dagen som smittad gödsel tillsattes. Även dessa försök utfördes i triplikat, men endast vid 14 °C.

RESULTAT

Tabell 1 visar tillsatsen av ammoniakkväve, uppmätt totalammonium efter 12 dagar och den beräknade koncentrationen fri ammoniak. Den enda regimen där en signifikant kväveförlust påvisades var i urea 4 °C.

Tabell 1. Tillsatt ammoniak, uppmätt halt efter 12 dagar och beräknad koncentration fri ammoniak i de olika regimerna.

Treatment	Tillsatt ammoniak g kg ⁻¹	Totalammoniak g kg ⁻¹	pH	pK _a	Fri ammoniak mmol kg ⁻¹
Urea 14 °C	11,2	11	9,15	9,50	187
Urea 4 °C	11,2	7,9	9,22	9,22	84
Aq. NH ₃ 14 °C	4,97	5,9	9,64	9,50	190
Aq. NH ₃ 4 °C	4,97	6,1	9,68	9,22	136
Control 14 °C	0	1,6	8,04	9,50	3,0
Control 4 °C	0	1,4	8,21	9,22	1,8

Random coefficient regression-analys visade på signifikanta effekter från ammoniak, temperatur och kombinationen mellan faktorerna på avdöningshastigheten hos bakterier. Fagera påverkades dock bara av temperaturen (tabell 2). Avdöningen var linjär från dag 0 med undantaget för enterokocker i ureabehandlingen där en tillväxt först skedde och linjen startar från dag 2 (Figur 3). I tabell 4 ges inaktiveringshastigheten för organismerna i de olika regimerna tillsammans med standardfel, D-värde* och korrelationskoefficient.

Tabell 3. F-tabell för Random Coefficient Regression Analys

Effekt	DF	DF	F-värde	P-värde
<i>Salmonella</i>				
NH ₃	2	15	5,50	0,0162
tid	1	63	808,91	<0,0001
tid · NH ₃	2	63	468,89	<0,0001
tid · temp	1	63	348,00	<0,0001
tid · NH ₃ · temp	2	63	167,58	<0,0001
Enterokocker				
NH ₃	2	12	12,46	0,0012
NH ₃ · temp	3	12	9,42	0,0018
tid	1	77	689,90	<0,0001
tid · NH ₃	2	77	126,53	<0,0001
tid · temp	1	77	30,41	<0,0001
tid · NH ₃ · temp	2	77	12,54	<0,0001
Fag 28B				
tid	1	103	46,51	<0,0001
tid · tid	1	103	11,66	0,0009
tid · tid · tid	1	103	6,62	0,0115
tid · temp	1	103	25,62	<0,0001
tid · tid · temp	1	103	9,61	0,0025

* Tid för en logs, 90%, reduktion

Tabell 4. Avdödningshastighet [log per dag] för *Salmonella*, enterokocker och bakteriofager efter behandling med urea (2 % w/w) eller ammoniak (0,5 % w/w) vid 4 och 14 °C

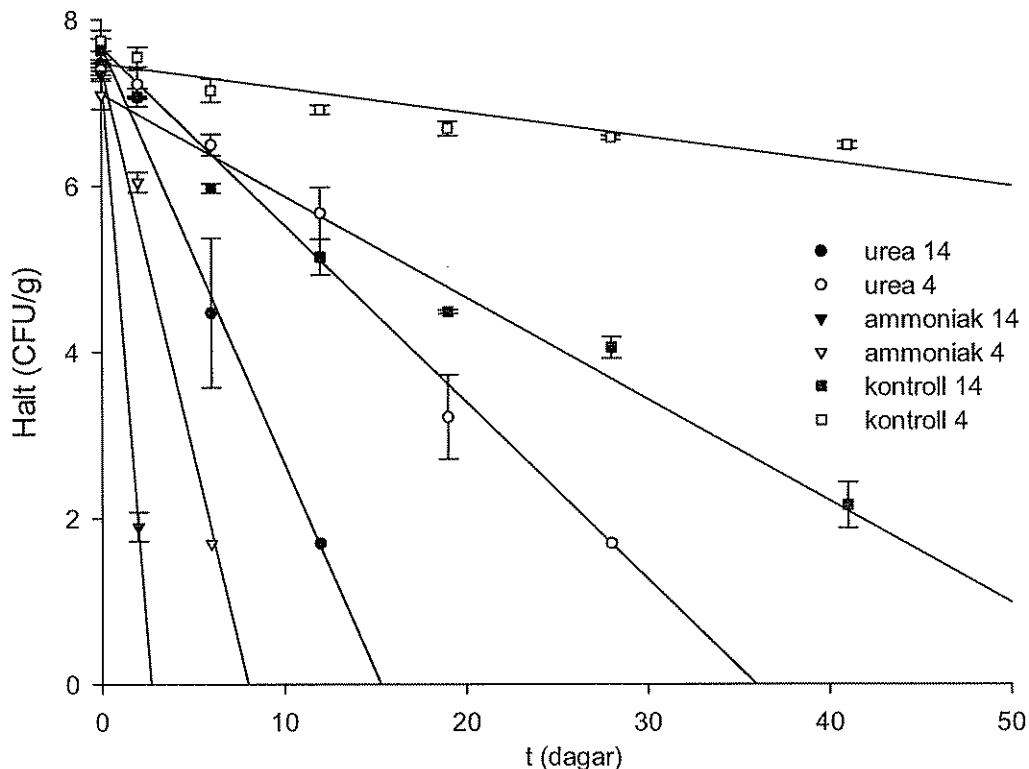
Organism	Temp [°C]	Tillsats	Inaktiveringshastighet ± SE [log d ⁻¹]	N	D-värde [d]	R ²
<i>Salmonella</i>	14	Urea 2%	0,49 ± 0,03	12	2,0	0,96
		Ammoniak 0,5%	2,72 ± 0,05	6	0,4	1,00
		Kontroll	0,12 ± 0,006	21	8,3	0,95
	4	Urea 2%	0,21 ± 0,009	18	4,8	0,97
		Ammoniak 0,5%	0,93 ± 0,05	9	1,1	0,98
		Kontroll	0,029 ± 0,003	21	34	0,79
Enterokocker	14	Urea 2%	0,067 ± 0,005	18	15	0,91
		Ammoniak 0,5%	0,16 ± 0,01	18	6,2	0,92
		Kontroll	0,039 ± 0,006	21	26	0,66
	4	Urea 2%	0,023 ± 0,002	21	43	0,89
		Ammoniak 0,5%	0,11 ± 0,009	18	9,1	0,89
		Kontroll	0,033 ± 0,002	21	30	0,91
Fag 28B	14	Oavsett	0,037 ± 0,003	63	27	0,82
	4	Oavsett	0,026 ± 0,004	63	39	0,73
	Oavsett	Oavsett	0,031 ± 0,003	126	32	0,82

Salmonella

Salmonella inaktiverades linjärt från dag 0 i såväl kontrollen som i behandlingarna.

Hastigheten ökade med temperaturen och halten fri ammoniak. I kontrollen vid 4 °C höll sig halterna över 10^6 CFU/g genom hela experimentet (41 dagar) (figur 2).

Inaktiveringshastigheten var 4,1 och 23 gånger snabbare efter tillsats av urea och ammoniak i 14 °C och 7,2 och 32 gånger snabbare i 4 °C.



Figur 2. Halten *Salmonella* i nötgödsel efter tillsats av urea eller ammoniak vid 4 respektive 14 °C. Linjerna är anpassade linjära regressionslinjer vars lutning presenteras i tabell 3. De är alla signifikant skilda från varandra.

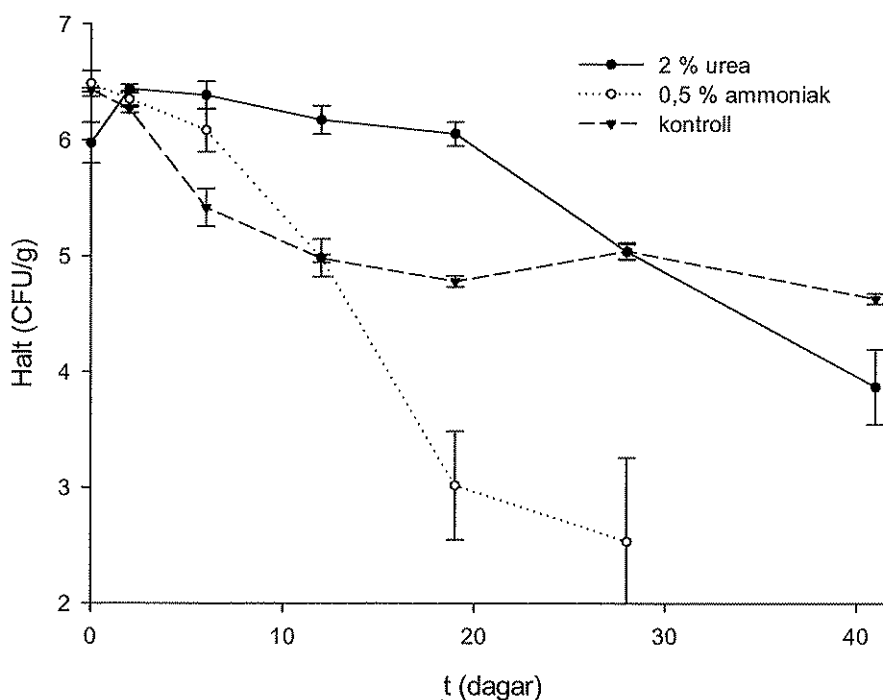
Försök 2

I simuleringsförsöket var halten *Salmonella* 1 000 gånger lägre i ammoniakburkarna och 100 gånger lägre i burkarna med ureatillsats än i kontrollen vid första uttaget (7 dygn efter första tillsatsen av organismer). Efter ytterligare två dagar låg salmonellahalterna under detektionsnivån i ammoniakbehandlingen, efter fyra i ureabehandlingen medan det i kontrollen fortfarande gick att detektera *Salmonella* efter 35 dagar när försöket avslutades. Motsvarande inaktiveringshastighet (k) som i försök 1 var i ureabehandlingen $0,74 \pm 0,029$, i ammoniakbehandlingen $> 2,3$ och i kontrollen $0,068 \pm 0,0055$ log/d. I ureabehandlingen var avdödningshastigheten alltså snabbare i försök 2 jämfört med i försök 1 medan det i kontrollen var snabbare avdödning i försök 1.

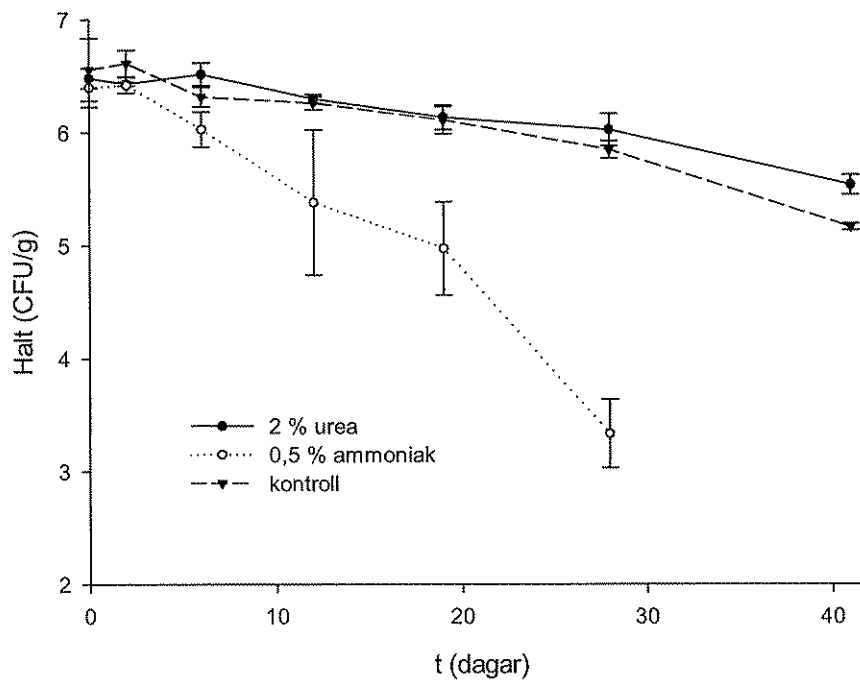
Enterokocker

Enterokockerna kunde växa till under en kortare period i ureabehandlat gödsel vid 14 °C för att inaktiveras efter dag 2 (figur 3). I de andra behandlingarna inaktiverades enterokockerna från dag 0 (figur 3 och figur 4). De kunde detekteras i såväl kontrollen som i ureabehandlat gödsel vid båda temperaturerna genom hela experimentet.

I 14 °C skedde avdödningen med dubbla hastigheten i ureabehandlat gödsel, och fyra gånger snabbare i ammoniakbehandlat, gentemot kontrollen. I 4 °C däremot klarade sig enterokockerna bättre i ureabehandlat gödsel än i kontrollen trots en koncentration fri ammoniak på 81 mM (tabell 1). I ammoniakbehandlat gödsel var inaktiveringen 3,3 gånger snabbare än i kontrollen (tabell 3).



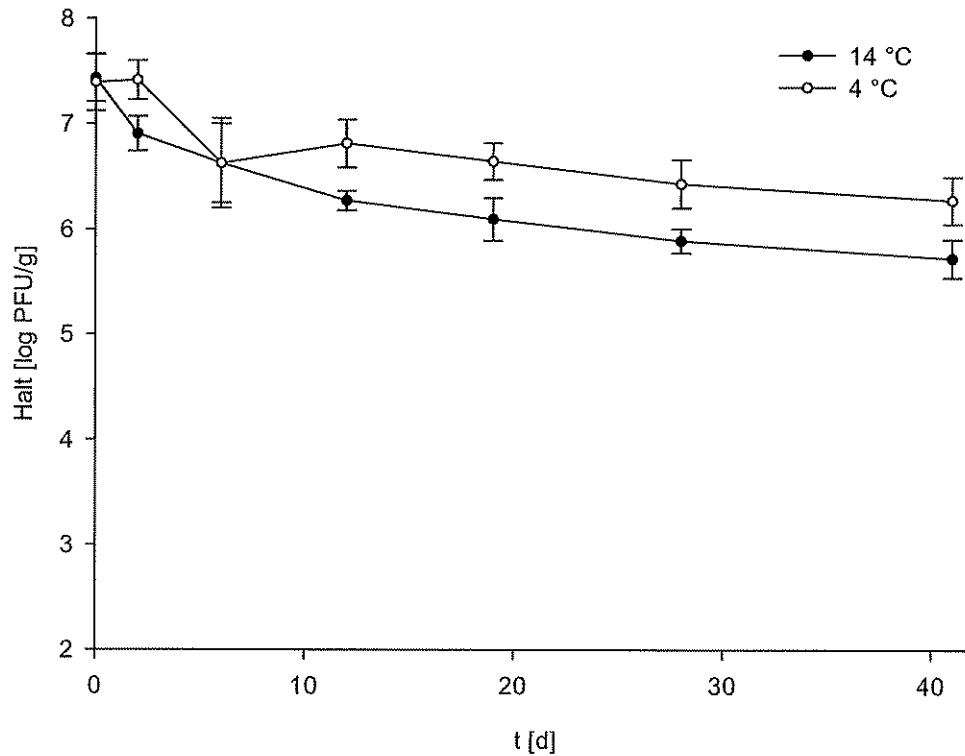
Figur 3. Halten enterokocker som en funktion av tiden efter tillsats av urea eller ammoniak vid 14°C.



Figur 4. Halten enterokocker som en funktion av tiden efter tillsats av urea eller ammoniak vid 4 °C.

Bakteriofager

Bakteriofagerna kan inte replikera utan värd bakterie och inaktiveringen sker därför från dag 0 (figur 5). Inaktiveringen skedde linjärt men även andra och tredjegradsmodeller gick att passa in på kurvan (tabell 2). Fagerna påverkades inte av ammoniakbehandlingarna. Däremot var avdödningshastigheten signifikant högre vid 14 °C än vid 4 °C enligt förstgradsmodellen.



Figur 5. Halten bakteriofager som en funktion av tiden vid 4 °C respektive 14 °C.

Avdödningsmodellering

Resultaten från den linjära regressionen användes för att simulera tiden för fem log reduktion (99,999%) av *Salmonella* i de olika behandlingarna. I tabell 5 ges median, övre 70%, 90% samt 95% från simuleringen. Som synes är de framför allt vid lagring vid låga temperaturer som tiden ökar markant om man vill ha en bred säkerhetsmarginal.

Tabell 5. Tiden i dagar för att uppnå fem log reduktion av *Salmonella* efter behandling med 2% urea eller 0,5% ammoniak samt kontroll utan tillsats vid 4 °C respektive 14 °C

	Urea		Ammoniak		Kontroll	
	14 °C	4 °C	14 °C	4 °C	14 °C	4 °C
Median	10,2	23,8	1,8	5,4	41,7	168
Övre 70%	11,4	26,3	1,9	5,9	47,2	223
Övre 90%	13,8	31,0	1,9	6,8	59	400
Övre 95%	15,3	33,9	2,0	7,3	66,1	606

DISKUSSION

Ammoniak, i tillsats som vattenlösning eller i form av urea, visade sig vara effektivt för att hygienisera *Salmonella* i nötgödsel (flytgödsel med en torrsustanshalt, TS, på 12 %). För att motsvara pastörisering i en timme vid 70 °C krävs enligt direktivet för behandling av animaliska biprodukter fem logs reduktion (99.999%) av *Salmonella* (EC 208/2006). För att uppnå detta räcker det med mindre än en veckas behandling med 0,5% ammoniak vid såväl 4 °C som vid 14 °C. Detta är något kortare tid än vad Vinnerås m.fl.(2004) rapporterade i svingödsel. Behandling med urea 2% under 10 dagar vid 14 °C eller 24 dagar vid 4 °C ger också samma effekt. Denna tid, som överensstämde med rekommendationerna på svingödsel, kan sänkas genom att pH (och därmed halten fri ammoniak) höjs i materialet med hjälp av en starkare bas t.ex. kalk, aska, natrium- eller kaliumhydroxid. För fem logs reduktion utan tillsats krävs lagring i 170 dagar vid 4 °C eller 42 dagar vid 14 °C utan tillförsel av ny, potentiellt smittad, gödsel.

För att ta med osäkerheten i mätningarna gjordes en simulering på tiden för att uppnå fem log reduktion. Baserat på resultaten från simuleringen kan man välja lämplig säkerhetsmarginal. Det övre 95% värdet i tabell 5 motsvarar den övre gränsen vid ett 90% konfidensintervall. Baserat på rekommendationerna på det skulle det innebära 15 dagars behandling efter ureatillsats på 2% vid en temperatur på 14 °C samt 34 dagar vid 4 °C. För ammoniakbehandling 0,5% räcker det med en veckas behandling oavsett temperatur medan det behövs nio veckors lagring vid 14 °C och nästan två år vid 4 °C. Lagring under ett år innebär dock att gödsel utsätts för en omgivningstemperatur över tio grader under tillräckligt lång tid för en tillfredställande hygienisering.

Förutom en avsevärt kortare behandlingstid finns det andra fördelar med kvävehygienisering. Den kvarvarande effekten av ammoniak som finns när man använder täckta behållare gör att behandlingen pågår även under transporter i tankbilar. Annars har just transporter och återinfektion av hygieniserat material visat sig vara ett problem vid bland annat hantering av slam- och rötrest (Vinnerås m.fl., 2004). Dessutom utgör desinfektion av gödsel en trygghet i de fall där symptomlösa utbrott skulle förekomma. Idisslare är en viktig reservoar för EHEC och endast ett fåtal stammar inducerar sjukdom hos djuren, som ändå kan utsöndra för människor sjukdomsframkallande bakterier i stora mängder. Effekten av ammoniak på *E. coli* O:157 har tidigare rapporterats, en studie där avdödningen för *E. coli* var signifikant snabbare än för *Salmonella* (Vinnerås m.fl., 2003).

Enterokockerna påverkades inte alls i samma utsträckning av ammoniakbehandlingen utan avdödningshastigheten var signifikant långsammare än för *Salmonella*. Dessutom skedde i vissa paralleller en tillväxt i början av behandlingen (figur 3). Även vid lagring av urin i tankar, en hygieniseringsmetod som också förlitar sig på ammoniakbehandling, har tillväxt av enterokocker påvisats (Jönsson m.fl., 2000). Användandet av enterokocker som indikator för salmonellaförekomst i gödsel efter hygienisering med ammoniak skulle alltså leda till en överskattning av risken på grund av deras större tolerans och annorlunda beteende i materialet. Vi föreslår därför att man använder sig av andra indikatorer som bättre kan förutse för salmonellaförekomst i ammoniakbehandlad nötgödsel, t.ex. *E. coli* eller fekala koliforma bakterier. Ett alternativ är att analysera för befintliga kolibakterier i materialet istället för att göra tillsatser.

Salmonella Typhimurium Fag 28B användes som modell för virusavdödning. Fagera påverkades dock inte av behandlingen vid de koncentrationer som studerades. Ward & Ashley (1977) identifierade ammoniak som en virucid i slam, effektiv mot polio. Däremot var Reovirus mer toleranta mot ammoniakbehandling. Båda virusen bär sitt arvsanlag i form av RNA, men medan enterovirus (polio) har enkel-, är reovirus dubbelsträngat. Det har

rapporterats att dubbelsträngade virus är mer tleranta mot ammoniak än enkelsträngade (Turner & Burton, 1997). Vid en studie i griségödsel inaktiverades vaccinia- och bovina enterovirus vid 47 °C och 0,73 g fri ammoniak per kilo gödsel (Wekerle & Albrecht, 1983). Halten fri ammoniak var i snitt i våra försök med ureabehandling 2,1 och ammoniakbehandling 2,9 g NH₃/kg gödsel. Behandling skedde alltså i vårt försök vid en högre halt men vid en lägre temperatur vilket gör det svårt att jämföra studierna. Vaccinia är ett koppvirus som liksom fag 28B bär sitt anlag som dsDNA. Andra virus med dsDNA är bl.a. adeno- och herpesvirus.

Kostnaderna för behandling av gödsel med urea och ammoniak har uppskattats till 50 respektive 20 kr/m³. Beräkningarna var baserade på kontakt med leverantörer av ammoniakbaserade kemikalier. Ammoniakbehandlingen var likvärdig med kalkbehandling medan urea är dyrare. Den kostnaden kan däremot räknas hem i form av ökat gödselvärde. Vid behandling med kalk måste extra kväve tillföras marken för att ge samma tillväxtbefrämjande effekt som urea och ammoniakbehandlad gödsel. Det är dock viktigt att gödselbrunnen täcks på något sätt för att behandlingen med kvävebaserade kemikalier skall ha önskad effekt. Annars riskerar både behandlingen och gödselvärdet att gå om intet eftersom ammoniak förloras som luftemission (Vinnerås m.fl., 2004).

BEHANDLINGSREKOMMENDATIONER

Baserat på simuleringen på resultatet från överlevnadsstudien rekommenderas följande behandlingar för att säkerställa en god hygienisk standard på salmonellasmittat gödsel:

- Ureabehandling; 2% ureatillsats w/w med lagring i minst två veckor vid temperaturer över 10 °C. Vid lägre temperaturer rekommenderas minst en månads lagring efter tillsatsen.
- Ammoniakbehandling; 0,5% NH₃ w/w, vilket motsvarar 20 mL vattenlöst ammoniak (28%) per kg gödsel, med lagring i minst en vecka.
- Lagring; Utan någon behandling bör gödsel lagras under minst en sommar.

För kvävebehandling krävs det att man minimerar ammoniakemissionerna genom lagring i täckta behållare.

SLUTSATSER

Kontrollerad behandling av gödsel i brunnen är önskvärd för att slippa spridning av sjukdomsframkallande mikroorganismer i miljön och för att bryta smittkedjan och minska smittrycket på en gård.

Kvävebaserad hygienisering med urea eller ammoniak var effektiv mot *Salmonella* och har visat sig effektiv för att eliminera EHEC. Enkelheten, den låga kostnaden och det ökade gödselvärdet gör att det är en tilltalande metod för att skydda djur och människor från oönskade infektioner.

Rekommenderade behandlingstider för att uppnå en tillfredsställande reduktion av *Salmonella* är för ammoniak en vecka (oavsett temperatur) och för urea två veckor vid temperaturer över 10 °C, en månad vid temperaturer under 10 °C. Utan tillsats bör gödsel lagras under minst en sommar.

Enterokockerna var alltför toleranta för att kunna användas som indikatorer för *Salmonella* och leder till en överskattning av risken om de används som processparametrar för salmonellareduktion. Andra indikatorer för salmonellaförekomst, salmonellareduktion bör användas.

Ytterligare undersökningar behövs för att bestämma effekten av ammoniakbehandling på animala virus. Dessa undersökningar bör inrikta sig på olika grupper av virus, som bär sina arvsanlag i olika form, det vill säga enkel-, dubbelsträngat RNA och DNA.

REFERENSER

- Adams, M. H. 1959. *Bacteriophages*. Interscience Publishers INC., New York.
- Arthurs, C. E., Jarvis, G. N. & Russell, J. B. 2001. The effect of various carbonate sources on the survival of *Escherichia coli* in dairy cattle manure. *Curr Microbiol*, **43**(3):220-4.
- Burge, W. D., Cramer, W. N. & Kawata, K. 1983. Effect of heat on virus inactivation by ammonia. *Appl Environ Microbiol*, **46**(2):446-51.
- Cardinale, E., Tall, F., Gueye, E. F., Cisse, M. & Salvat, G. 2004. Risk factors for *Campylobacter* spp. infection in Senegalese broiler-chicken flocks. *Prev Vet Med*, **64**(1):15-25.
- Edwards, S. 2000. Survival and inactivation of classical swine fever virus. *Vet Microbiol*, **73**(2-3):175-81.
- Geldreich, E. E. 1978. Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In *Indicators of viruses in waters*, ed. G. Berg, Ann Arbor Science Publishers Inc. Ann Arbor, Michigan.
- Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. & Cliver, D. 1999a. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol Lett*, **178**(2):251-7.
- Himathongkham, S., Nuanualsuwan, S. & Riemann, H. 1999b. Survival of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in chicken manure at different levels of water activity. *FEMS Microbiol Lett*, **172**(2):159-63.
- Himathongkham, S. & Riemann, H. 1999. Destruction of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in chicken manure by drying and/or gassing with ammonia. *FEMS Microbiol Lett*, **171**(2):179-82.
- Höglund, C., Ashbolt, N., Stenström, T.-A. & Svensson, L. 2002. Viral persistence in Source-Separated Human Urine. *Adv Environ Res*, **6**:265-75.
- Jönsson, H., Vinnerås, B., Höglund, C., Stenström, T., Dalhammar, G. & Kirchmann, H. 2000. Källsorterad humanurin i kretslopp. Svenskt Vatten. VA-Forsk rapport 2000-01, Stockholm.
- Lilleengen, K. 1948. Typing of *Salmonella typhimurium* by means of bacteriophage. PhD Thesis in *The bacteriological hygenical department of the royal veterinary college*, Royal Veterinary College. Stockholm.
- Medema, G. J., Bahar, M. & Schets, F. M. 1997. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: influence of temperature and autochthonous microorganism. *Water Sci Technol*, **35**(11-12):249-52.
- Mendez, J. M., Jimenez, B. & Maya, C. 2004. Disinfection kinetics of pathogens in physicochemical sludge treated with ammonia. *Water Sci Technol*, **50**(9):67-74.
- Nicholson, F. A., Groves, S. J. & Chambers, B. J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour Technol*, **96**(2):135-43.
- Park, G. W. & Diez-Gonzalez, F. 2003. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* DT104 from cattle manure. *J Appl Microbiol*, **94**(4):675-85.
- Pell, A. N. 1997. Manure and microbes: public and animal health problem? *J Dairy Sci*, **80**(10):2673-81.
- Sahlström, L., Aspan, A., Bagge, E., Tham, M. L. & Albihn, A. 2004. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res*, **38**(8):1989-94.
- Schneider, M., Marison, I. W. & von Stockar, U. 1996. The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol*, **46**(3):161-85.

- Stallknecht, D. E., Shane, S. M., Kearney, M. T. & Zwank, P. J. 1990. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis*, **34**(2):406-11.
- Svensson, L. 1993. Ammonia volatilization from land-spread livestock manure - effects of factors relating to meteorology, soil/manure and application technique. PhD Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Turner, C., Williams, S. M., Burton, C. H., Cumby, T. R., Wilkinson, P. J. & Farrent, J. W. 1999. Pilot scale thermal treatment of pig slurry for the inactivation of animal virus pathogens. *J Environ Sci Health*, **B34**(6):989-1007.
- Turner, C. & Burton, C. 1997. The inactivation of viruses in pig slurries: a review. *Bioresour Technol* **61**(1):9-20.
- Unc, A. & Goss, M. 2004. Transport of bacteria from manure and protection of water resources. *Appl Soil Ecol*, **25**:1-18.
- Veling, J., Wilpshaar, H., Frankena, K., Bartels, C. & Barkema, H. W. 2002. Risk factors for clinical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium infection on Dutch dairy farms. *Prev Vet Med*, **54**(2):157-68.
- Vinnerås, B., Berggren, I., Albiñ, A., Bagge, E. & Sahlström, L. 2004. Removal of *Salmonella* contamination before using plant nutrients from household waste and wastewater in agriculture. *Proceedings from 2nd IWA Leading-Edge Conference on Sustainability in Water Limited Environments*, 8 - 10 November, Sydney.
- Vinnerås, B., Holmqvist, A., Bagge, E., Albiñ, A. & Jönsson, H. 2003. The potential for disinfection of separated faecal matter by urea and by peracetic acid for hygienic nutrient recycling. *Bioresour Technol*, **89**(2):155-61.
- Ward, R. L. 1978. Mechanism of poliovirus inactivation by ammonia. *J Virol*, **26**(2):299-305.
- Ward, R. L. & Ashley, C. S. 1977. Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. *Appl Environ Microbiol*, **33**(4):860-4.
- Wekerle, J. & Albrecht, H. 1983. Inactivation of vaccinia virus and a bovine enterovirus in aeriated pig slurry with special regard to pH, temperature and free ammonia modification during aeration. *Agr Wastes*, **7**(1):39-50.

J. R. Ottoson, A. Nordin, B. Vimmerås, Hygienisering av gödsel med urea och ammoniak