

# Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land

## Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land

Mikrobiologiske undersøgelser af lagret  
urin fra separationstoiletter

Anders Dalsgaard og Inge Tarnow  
Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole,  
Institut for mikrobiologi

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

# Indhold

<b>FORORD</b>	<b>5</b>
<b>SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>11</b>
<b>1 INDLEDNING OG BAGGRUND FOR UNDERSØGELSER OG UDVÆLGELSE AF PROJEKTER</b>	<b>14</b>
1.1 BESKRIVELSE AF UDVALGTE TEMA 3 PROJEKTER	14
1.2 MIKROORGANISMER OG SMITSTOFFER I URIN OG FÆKALIER	15
1.3 INDIKATORER TIL UNDERSØGELSE FOR FOREKOMST AF SMITSTOFFER	17
<b>2 VALG AF MÅLEPARAMETRE</b>	<b>20</b>
2.1 TEMA 3 PROJEKTER	20
2.2 VALG AF MIKROBIOLOGISKE MÅLEPARAMETRE	20
2.3 VALG AF FYSISK-KEMISKE PARAMETRE	21
2.4 EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER	21
<b>3 MATERIALER OG METODER</b>	<b>22</b>
3.1 TEMA 3 PROJEKTER	22
3.2 FYSISK-KEMISKE PARAMETRE	23
3.3 INDIKATORORGANISMER	23
3.4 SMITSTOFFER	23
3.5 EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER	25
<b>4 RESULTATER</b>	<b>27</b>
4.1 FYSISK-KEMISKE PARAMETRE	27
4.2 FOREKOMST OG OVERLEVELSE AF MIKROORGANISMER	27
4.3 SMITSTOFFER	31
4.4 EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER	33
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>37</b>
5.1 DE MIKROBIOLOGISKE FUND I TEMA 3 PROJEKTERNE	37
5.2 DANSKE EKSPERIMENTIELLE UNDERSØGELSER	37
5.3 UDENLANDSKE UNDERSØGELSER AF FOREKOMST AF BAKTERIELLE SMITSTOFFER OG INDIKATORBAKTERIER I OPSAMLET URIN	38
5.4 SVENSKE EKSPERIMENTIELLE UNDERSØGELSER	38
5.5 SAMMENLIGNING MED DE SVENSKE UNDERSØGELSER	39
5.6 DANSKE OG SVENSKE FUND AF CRYPTOSPORIDIER	39
5.7 BEGRÆNSNINGER I METODER ANVENDT TIL PÅVISNING AF PROTOZOER I TEMA 3 PROJEKTERNE	40
5.8 BEGRÆNSNINGER I METODER ANVENDT TIL PÅVISNING AF BAKTERIER I TEMA 3 PROJEKTERNE	40
5.9 BEGRÆNSNINGER VED UNDERSØGELSERNE I TEMA 3 PROJEKTERNE	41

5.10	ANBEFALINGER VEDRØRENDE LAGRINGSTID AF URIN INDEN GENANVENDELSE. BEKENDTGØRELSER VEDRØRENDE REGULERING AF ANVENDELSE AF URIN	41
6	KONKLUSION	43
7	REFERENCER	44

# Forord

Formålet med denne undersøgelse var at fastlægge den mikrobiologiske kvalitet af opsamlet og lagret urin fra separationstoiletter.

Der er i undersøgelsen ikke udført studier af overlevelse af smitstoffer på landbrugsjord og afgrøder, ligesom der ikke er udført en egentlig risikovurdering på genanvendelse af urin. Sidstnævnte udføres og rapporteres i en selvstændig rapport finansieret af Miljøstyrelsen. Nærværende mikrobiologiske rapport er en delrapport under Tema 3 projektet ”Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land”. Forekomst og overlevelse af virus i urin er ikke undersøgt. En selvstændig undersøgelse udført af Statens Serum Institut med finansiering fra Miljøstyrelsen vil beskrive overlevelse af virus i lagret urin.

Planlægning og behandling af data blev udført af Institut for Veterinær Mikrobiologi, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole (KVL), ligesom instituttet også udførte de eksperimentelle undersøgelser. ROVESTA Miljø I/S, Næstved varetog prøveindsamling og mikrobiologiske analyser fra de deltagende projekter. Specifikke analyser for parasitter blev udført af Statens Serum Institut og Statens Veterinære Serumlaboratorium.

Styregruppen til denne undersøgelse er identisk med styregruppen i Tema 3 projektet ”Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land”.

Følgende har specifikt deltaget i rådgivning af de mikrobiologiske undersøgelser:

Linda Bagge, dyrlæge, Miljøstyrelsen.

Per Vagn Hansen, embedslæge.

Kirsten Schmidt, embedslæge

Anders Dalsgaard, dyrlæge, lektor, Institut for Veterinær Mikrobiologi, KVL.

Inge Tarnow, dyrlæge, forskningsassistent, Institut for Veterinær Mikrobiologi, KVL.

Simon Wrisberg, hortonom, forskningsassistent, Institut for Jordbrugsvidenskab, KVL.

Undersøgelsen er finansieret af Miljøstyrelsen under aktionsplanen til fremme af økologisk byfornyelse og spildevands rensning, Tema 3 ” Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land”.



# Sammenfatning og konklusioner

Stadig stigende behov i samfundet for at genanvende affald og dermed spare på ressourcer til affaldsafskaffelse har medført en øget interesse for alternative måder at håndtere affald på. Således er der i befolkningen en stigende interesse for at opsamle urin fra separationstoiletter og anvende urinen som gødning på afgrøder eller græsningsarealer.

Denne undersøgelse blev iværksat for at fastlægge den mikrobiologiske kvalitet af opsamlet og lagret urin fra separationstoiletter. Undersøgelsen omfatter 4 projekter udvalgt fra Miljøstyrelsens aktionsplan til fremme af økologisk byfornyelse og spildevandsrensning under Tema 3 ”Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land”. De 4 projekter (Hyldespjældet, Møns Museumsgård, Hjortshøj og Kolonihaveforeningen) repræsenterer forskellige teknologiske løsninger i forskellige bebyggelser med forskellige brugere.

Der er i undersøgelsen ikke udført studier af overlevelse af smitstoffer på landbrugsjord og afgrøder, ligesom der ikke er udført en egentlig risikovurdering for genanvendelse af urin. Sidstnævnte udføres og rapporteres i en selvstændig rapport finansieret af Miljøstyrelsen. Nærværende mikrobiologiske rapport er en del-rapport af Tema 3 projektet ”Vurdering af muligheder og begrænsninger for recirkulering af næringsstoffer fra by til land”, som rapporteres selvstændigt til Miljøstyrelsen.

Der blev udtaget månedlige prøver fra urinopsamlingstanke fra de 4 projekter i perioder på 4-6 måneder med det formål at bestemme urinens mikrobiologiske kvalitet i tankene over en længere periode. Prøverne blev analyseret for en række bakterielle indikatorer: kimtal v. 37°C, enterokokker og *E. coli*, samt en række bakterielle og parasitære smitstoffer: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* og andre sygdomsfremkaldende tarmparasitter. Desuden blev pH og temperatur i urintankene målt og urinens udseende registreret. På grund af fund af parasitten *Cryptosporidium parvum* i urintankene, blev analyserne for denne udvidet til at inkludere parasitæggenes viabilitet og infektivitet.

De 4 forskellige bebyggelser er beskrevet med fokus på type af beboelse og hvilke brugere, der formodes at anvende toiletterne (børn/voksne).

Der er yderligere blevet foretaget eksperimentelle undersøgelser af overlevelsen af en række vigtige bakterielle smitstoffer i urin fra separationstoiletter. De undersøgte bakterielle smitstoffer var: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio parahæmolyticus*, *E. coli* O157:H7, *Shigella flexneri* og *Shigella dysenteriae*. Overlevelsen af bakterier blev undersøgt ved henholdsvis 7°C og 20°C.

Resultaterne af urinanalyserne fra opbevaringstankene viste, at antal enterokokker og *E. coli* faldt til under detektionsgrænsen (< 10 per ml) i opsamlingstankene fra de 4 projekter efter 3-4 måneders opbevaring af urinen med nogen variation mellem projekterne.



Antal totalkim ved 37°C faldt for Hyldespjældet og Møns Museumsgård efter 2 måneders lagring. Herefter fandtes antal totalkim konstant (100-1000 bakterier/ml) i den efterfølgende 3-4 måneders periode. Der påvistes en lille stigning af kimtalsværdierne i forårsmånederne, hvilket eventuelt kan skyldes vækst i tankene. Antal totalkim ved 37°C for Hjortshøj udviste ringe variation ( $10^4$  per ml) igennem den 4 måneder lange analyseperiode. Dette kan skyldes forurening med jordbakterier gennem et utæt låg i opsamlingsstanken. I Kolonihaveforeningen henfaldt totalkim til under detektionsgrænsen på 100 bakterier pr. ml på 1-4 måneder i alle tanke på nær én. Antal totalkim ved 37°C var under detektionsgrænsen efter 2 måneders opbevaring for 7 urinbeholdere.

De bakterielle smitstoffer *Salmonella* og *Campylobacter* blev ikke påvist i nogen prøver fra urintankene. De parasitære smitstoffer *Cryptosporidium parvum* og *Giardia* blev påvist ved gentagne prøveudtagninger fra urintanke i Hyldespjældet, Møns Museumsgård og Hjortshøj. I Hyldespjældets og Hjortshøjs urintanke blev der påvist 1-3 parasitæg (oocyster) per ml urin i 5 ud af 9 prøver. Ingen andre parasitære smitstoffer blev påvist. Yderligere undersøgelser af *C. parvum* viste, at en del af parasitæggene var både levende og infektiøse. Det relative antal levende parasitæg syntes ikke at blive reduceret gennem forsøgsperioderne. Antal fundne parasitæg var dog behæftet med så stor usikkerhed at en egentlig kvantificering ikke var mulig. Viabilitet og infektivitet af *Giardia* blev ikke undersøgt. Kun få infektiøse *C. parvum* æg er nødvendige for at medføre infektion hos mennesker (lav infektionsdosis).

De eksperimentelle undersøgelser viste at antallet af alle bakteriestammer faldt til en værdi under detektionsgrænsen på 10 bakterier per ml i løbet af maksimalt 20 døgn. Antal *V. parahæmolyticus* og *V. cholerae* stammerne henfaldt langt hurtigere end de andre smitstoffer. *Salmonella*, *Shigella* og *Campylobacter* kunne ikke påvises 2-3 døgn efter podning af urinen, mens *E. coli* O157:H7 havde den længste overlevelse på mellem 16 og 20 døgn.

Resultaterne fra vores undersøgelser viser, at efter en lagringsperiode af separeret urin på 4 måneder kan antallet af bakterielle smitstoffer og indikatorbakterier forventes reduceret til < 100 per ml urin. I Sverige anbefales en opbevaringsperiode på 6 måneder ved 20°C, hvis urinen skal anvendes som gødning til alle typer af afgrøder. Kortere opbevaringstider anbefales, eksempelvis 1 måned ved 4°C, hvis urinen ønskes anvendt som gødning på foderafgrøder; på afgrøder som efterbehandles inden human konsum; og hvis relativt små mængder urin anvendes, eksempelvis i egen have (Jönsson et al., 2000). De danske og svenske undersøgelser viser således at ved 4 måneders lagring af separeret urin opnås en markant reduktion af bakterieantallet. Anvendelse af lagret urin som gødning synes derfor at udgøre en yderst ringe risiko for bakterielt-betingede mavetarm infektioner hos dyr og mennesker ved håndtering af urin, samt ved indtagelse af afgrøder gødet med urin. De målte reduktioner af bakterieantallet forudsætter, at lagringstanken ikke tilføres urin eller andet bakterieholdigt materiale efter lagring er påbegyndt. En eventuel eftervækst af total kim v. 37°C og enterokokker i urintankene bør undersøges yderligere.

Resultater vedrørende forekomst og overlevelse af parasitter, herunder *Cryptosporidium parvum* og *Giardia duodenalis*, og viden om overlevelse af virus i urin er utilstrækkelige, men indikerer, at såvel levende som infektiøse parasitstadier samt virus kan findes i urin efter 6 måneders lagring. Yderligere

undersøgelser er påkrævet til fastlæggelse af forekomst og overlevelse af virus og parasitæg i lagret urin, før eventuelle anbefalinger vedrørende disse smitstoffer kan gives. En selvstændig rapport finansieret af Miljøstyrelsen vil beskrive overlevelse af virus i lagret urin.



# Summary and conclusions

An increasing demand in the Danish society for recycling wastes and save resources for waste disposal has lead to an increased interest in alternative ways to handle waste. This is reflected by peoples increased interest in collecting urine from separation toilets to be used as fertilisers for crops and in fields.

This investigation was initiated to assess the microbiological quality of stored urine collected from separation toilets. The investigation included four projects selected from the Environmental Protection Agency's (EPA) action plan to promote ecological developments of cities and treatment of sewage under the Theme 3 "Assessment of the potential and limitations for re-cycling of nutrients from urban to rural areas". The four projects (Hyldespjældet, Møns Museumsgård, Hjortshøj og Kolonihaveforeningen) represents different solutions in different urban housing communities with different users.

The investigation does not include studies of pathogen survival on soil and crops neither does it include a risk assessment of the re-cycling of human urine. A risk assessment of re-cycling humane urine will be reported in a separate report from a project financed by the EPA. The present report is part of the project entitled "Assessment of the potential and limitations for re-cycling of nutrients from urban to rural areas" under Theme 3, which is reported in a separate report to EPA..

Monthly samples were collected from the urine separation tanks from the four projects during periods of 4 to 6 months with the aim to determine the microbiological quality of stored urine. Samples were analysed for a number of bacterial indicators: total bacterial counts at 37°C, faecal enterococci and *E. coli*, and several bacterial and parasitological pathogens: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis* and other pathogenic intestinal parasites. The pH and temperature of stored urine were measured and the urine was visually inspected. Because of findings of the parasite *Cryptosporidium parvum* in the urine tanks, the studies of this parasite were expanded to include the viability and infectivity of the parasite eggs.

The four different urban housing communities are described with focus on the type of housing and the users anticipated to use the toilets (children/adults).

Additional experimental studies were carried out to determine the survival of several important bacterial pathogens in stored urine. The bacterial pathogens studied included: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio parahæmolyticus*, *E. coli* O157:H7, *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae*. The survival studies were done at 7°C og 20°C.

The results of the analyses of urine samples from the storage tanks showed that the number of enterococci and *E. coli* were reduced to below the

detection limit (< 10 per ml) in the tanks at the four projects after 3 to 4 months storage. Some variation was observed between the projects.

Total bacterial counts at 37°C decreased for Hyldespjældet and Møns Museumsgård after 2 months storage. However, the total bacterial counts were fairly constant in the subsequent 3 to 4 months storage period (100-1000 bacteria per ml). A small increase in bacterial counts, which was seen during the Spring period, may have been caused by bacterial growth in the tanks. The total bacterial counts at 37°C for Hjortshøj showed only limited variation (10<sup>4</sup> per ml) during the four months of analysis. This could be caused by contamination with soil bacteria through a hole in the lid of the storage tank. Except for one tank, the total bacterial counts were reduced in Kolonihaveforeningen to below the detection limit of 100 bacteria per ml after 1 to 4 months of storage. Seven urine storage units showed numbers of total bacterial counts at 37°C below the detection limit after 2 months of storage.

The bacterial pathogens, *Salmonella* og *Campylobacter*, were not detected in any urine samples. The parasitological pathogens, *Cryptosporidium parvum* og *Giardia* were found in repeated samples from the storage tanks in Hyldespjældet, Møns Museumsgård and Hjortshøj. Samples from Hyldespjældets and Hjortshøjs contained 1 to 3 parasite eggs (oocysts) per ml urine in 5 of 9 samples. No other parasitological pathogens were detected. Additional studies of *C. parvum* showed that some of the eggs were viable and infective. The relative number of viable eggs did not appear to be reduced during the study period. However, the actual numbers of parasite eggs could not be determined as the quantification was associated with great uncertainties. The viability and infectivity of *Giardia* were not investigated. Only few infective *C. parvum* eggs are needed to cause infection in humans (low infectious dose).

Results from the experimental studies showed that the numbers of all bacterial pathogens were reduced to below the detection limits of 10 bacteria per ml during a 20 days period. The numbers of *V. parahæmolyticus* and *V. cholerae* were reduced much faster than the other pathogens. *Salmonella*, *Shigella* and *Campylobacter* could not be detected 2 to 3 days after inoculation of the urine and *E. coli* O157:H7 showed the longest survival between 16 and 20 days.

The results from our investigations show that following a storage period of 4 months the number of bacterial pathogens and indicator bacteria in humane urine can be expected to be reduced to < 100 per ml urine. In Sweden, a 6 months storage period at 20°C is recommended if the urine is to be used on all crop types without restrictions. Shorter periods of storage, for example 1 month at 4°C, are suggested if the urine is to be used on fodder crops; on crops to be processed (eg. dried or heat-treated) before human consumption; and if relative small volumes of urine are used, eg. as fertilisers in gardens of the urine producers (Jönsson et al., 2000). Thus, the Danish and Swedish investigations show that 4 months storage of separated urine results in a marked and significant bacterial reduction. The re-cycling of urine as fertiliser seem therefore associated with only very little if any risks for bacterial-related gastro-intestinal infections for humans and animals when handling urine and consuming crops fertilised with urine. The shown reductions in bacterial numbers assumes that new urine or other material containing bacteria are not introduced to the tanks after initiation of storage. A possible re-growth of total bacterial counts at 37°C and enterococci in urine during storage should be further studied.

The results of the occurrence and survival of parasites, including *Cryptosporidium parvum* og *Giardia duodenalis*, and the knowledge about the survival of viruses in urine are insufficient, but indicate that viable and infective parasites, and viruses, may be found in urine after 6 months storage. Further investigations are needed to assess the occurrence and survival of parasite eggs and viruses in stored urine before any guidelines may be prepared about the survival of these micro-organisms. A separate report on survival of viruses in stored human urine will be published financed by the EPA.

# 1 Indledning og baggrund for undersøgelser og udvælgelse af projekter

På baggrund af diskussioner og møder med Miljøstyrelsen blev der udvalgt et antal projekter, som havde modtaget økonomisk støtte fra Miljøstyrelsens aktionsplan til fremme af økologisk byfornyelse og spildevandsrensning under Tema 3 ”Recirkulering af næringsstoffer fra by til land”. De valgte 4 projekter med urinseparerende toiletsystemer er beskrevet i afsnit 1.1 og repræsenterer forskellige teknologiske løsninger i forskellige bebyggelser med forskellige brugere. Antal valgte projekter var samtidig bestemt af projektets budget.

I samarbejde med Miljøstyrelsen og med godkendelse af Sundhedsstyrelsen blev der udarbejdet et fælles måleprogram for mikrobiologiske og kemiske parametre i urin opsamlet fra separationstoiletter i de 4 projekter. Der er således efter aftale med Miljøstyrelsen ikke blevet foretaget analyser af fæcesprøver, som planlagt i det oprindelige måleprogram. Mikrobielle analyser af fækalier vil blive udført i separate projekter finansieret af Miljøstyrelsen. Der er endvidere ikke foretaget studier af overlevelse af smitstoffer i miljøet efter udbringning af urin på afgrøder og landbrugsjord.

De mikrobiologiske analyser i måleprogrammet blev suppleret med eksperimentelle undersøgelser af overlevelse af bakterielle smitstoffer i urin foretaget ved Institut for Veterinær Mikrobiologi (IVM), KVL. IVM har desuden koordineret indsamling og analyser af urinprøver, samt foretaget databehandling og rapportering. Der blev i de udvalgte projekter ikke foretaget analyser for virus eller bakteriofager. Eksperimentelle undersøgelser af overlevelse af virus i urin udføres som et separat projekt finansieret af Miljøstyrelsen ved Statens Seruminstitut. Databehandling og rapportering af fund af næringsstoffer, tungmetaller og fremmedstoffer blev foretaget af Institut for Jordbrugsvidenskab, KVL. Dog har Institut for Analytisk og Farmaceutisk Kemi ved Danmarks Farmaceutiske Højskole foretaget vurdering og rapportering af resultater vedrørende fund af medicinske stoffer og østrogener. Data vedrørende fund af næringsstoffer, tungmetaller og fremmedstoffer, samt medicinske stoffer og østrogener vil blive rapporteret i hovedrapporten ”Recirkulering af næringsstoffer fra by til land”.

Der er i projektet ikke foretaget en egentlig risikovurdering af opsamling, håndtering og anvendelse af human urin i landbruget. En sådan risikovurdering foretages af Zoonosecentret ved Statens Veterinære Serumlaboratorium i et selvstændigt projekt finansieret af Miljøstyrelsen.

## 1.1 BESKRIVELSE AF UDVALGTE TEMA 3 PROJEKTER

### *Hyldebjerg*

Hyldebjerg er et alment boligbyggeri, som er repræsentativt for tæt, lavt almenyttigt boligbyggeri i Danmark. Der er i alt 390 lejligheder og 800 beboere. Toiletterne er installeret i 9 lejligheder med i alt 16 voksne og 10

børn. Toiletterne er af typen WM ekologen, hvor vandforbruget er ca. 1-3 dl ved urinskyl. Urinen blev opsamlet i 5 tanke på hver 15 m<sup>3</sup>.

#### *Møns Museumsgård*

Der findes 4 separationstoiletter samt 1 vandfrit urinal. Toiletterne er fordelt på 2 dametoiletter, et herretoilet og et personaletoilet. Toiletterne er af typen WM Ekologen og urinalet af typen Waterless Urinal. Vandforbrug i toiletterne er 2-3 dl ved urinskyl og 3-5 l ved fækalskyl. Urinen samles i 2 tanke á 3 m<sup>3</sup>. Toiletterne blev taget i brug ved museets åbning den 1. maj 1999. Urinen blev opsamlet i tank 1, som blev lukket for urintilførsel 28. oktober 1999, da tanken var ca. halvt fyldt indeholdende 1,3 – 1,5 m<sup>3</sup> urin.

Møns Museumsgård repræsenterer det eneste offentlige toilet i Tema 3 projektet. Størstedelen af brugerne må derfor formodes at være uerfarne i brugen af toiletterne. Museumsgården havde i 1999 ialt 4320 besøgende fordelt på 3303 voksne og 1017 børn. Det er især skoleklasser (2.-5. klasse) som besøger museumsgården. Urinen påtænkes anvendt lokalt i landbruget.

#### *Kolonihaveforbundet*

Kolonihaverne repræsenterer lavteknologiske toiletsystemer. Der er kort afstand mellem toilet og opsamlingsbeholder. Der er i alt 100 haver med separationstoiletter, heraf blev 10 udvalgt til udtagning af urinprøver. Toiletterne blev udvalgt, så de er repræsentative for de øvrige haver. I de 10 kolonihaver blev der opsamlet urin fra 2-7 personer (voksne og børn), typisk i 25 liters beholdere. Dog havde en enkelt kolonihave en beholder på 220 liter.

Urinen påtænkes anvendt i egne haver til ikke-fortærbare afgrøder. I 3 af kolonihaverne anvendtes ikke vandskyl og i de resterende blev der skyllet med én kop vand.

#### *Hjortshøj*

Hjortshøj er en nyetableret økologisk bebyggelse nord for Århus. Andelssamfundet repræsenterer tæt-lavt byggeri med både privat og almennyttigt byggeri. Der blev opsamlet urin i en tank fra 8 husstande i privat byggeri. Toiletterne blev anvendt husstandenes 13 voksne og 8 børn. De 5 af toiletterne var af typen WM-ekologen, som ikke anvender vandskyl. Tre af toiletterne var af typen Ekovak, som i alt anvendte ca. 40 liter skyllevand pr. uge.

Der opsamles urin i 20 m<sup>3</sup> betontanke. Tankene er nedgravet ca. 150 m fra husene på en skråning.

## 1.2 MIKROORGANISMER OG SMITSTOFFER I URIN OG FÆKALIER

Hos raske personer er urinen i urinblæren samt den øvre del af urinrøret steril. Ved transport af urinen i og ud af urinrøret blandes urinen med forskellige typer hudbakterier og når urinen forlader kroppen indeholder den typisk <10.000 bakterier per ml (Jönsson et al., 2000).

#### *Urinvejsinfektion*

Ved urinvejsinfektion udskilles urin med høje koncentrationer af bakterier > 10<sup>5</sup> per ml (Thaysen et al., 1986), der i 80% af tilfældene er *E. coli*. *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter* gruppen og enterokokker findes dog også som årsag til urinvejsinfektioner hos mennesker (Murray et al., 1995). Det er dog usikkert i hvor stor udstrækning, at disse



mikroorganismer overlever og spredes i miljøet (Jönsson et al., 2000). Der findes andre smitstoffer som kan spredes fra mennesker med urinen, herunder bakterierne *Leptospira* og *Salmonella typhi/paratyphi*, hvor spredning først er muligt når infektionen bliver systemisk, samt parasitten *Schistosoma* spp. som forårsager bilharziose hos mennesker. Disse sygdomme er dog meget sjældne under danske forhold, og man må formode at sandsynligheden for at finde disse smitstoffer i urin fra mennesker er lav.

#### *Forurening med smitstoffer i urinseparerende system*

I et urinseparerende system er den største risiko for tilførsel af smitstoffer til urinen kontamination med fækalier. Risikoen synes størst, når brugerne er børn eller ved diarrétilfælde, mens toiletudforming og brugererfarenhed også har betydning for tilblanding af urinen med fækalier. Diarrétilfælde, hvor smitstoffer findes i afføringen i høje koncentrationer ( $>10^7$  bakterier pr. gram), repræsenterer den største risiko for tilførsel af smitstoffer til urinen.

#### *Smitstoffer i fæces - bakterier*

De vigtigste bakterier som forårsager mave-tarminfektioner under danske forhold og som kan forventes at findes i fækal-forurenet urin tilhører slægterne *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* samt visse typer af *E. coli*. Andre smitstoffer som kan findes i fækalier inkluderer slægterne *Listeria*, Clostridier og *Bacillus*. Disse bakterier er dog relativt sjældne årsager til sygdom hos mennesker. Under tropiske forhold er også *Vibrio cholerae* og *Shigella* typiske årsager til diarré hos mennesker. Ved diarré forårsaget af smitsomme bakterier vil et menneske i den akutte sygdomsfase typisk udskille op til  $10^{10}$  bakterier per gram fæces. Bakterier vil dog også blive udskilt i varierende tidsperioder før og især efter sygdomssymptomer optræder.

#### *Parasitter*

De vigtigste parasitter der kan tilføres urin i Danmark tilhører grupperne rundorme, bændelorme og protozoer. De hyppigste forekomne arter er: *Ascaris lumbricoides* (spolorm), *Enterobius vermicularis* (børneorm), *Taenia saginata* (bændelorm), *Dipyllobotrium latum* (menneskets brede bændelorm), samt protozoerne *Cryptosporidium parvum* og *Giardia duodenalis*. Mennesker kan smittes med spolorm og børneorm direkte ved kontaktsmitte eller ved oral indtagelse af fækal kontaminerede fødevarer. *Cryptosporidium parvum* og *Giardia duodenalis* kan smitte via fækalier fra dyr og mennesker. Betegnelsen *Giardia* diskuteres stadig i fagkredse, men der synes enighed om anvendelse af betegnelsen *Giardia duodenalis* (før benævnt *Giardia lamblia* eller *intestinalis*), og denne betegnelse vil efterfølgende blive brugt i rapporten. Æggene fra bændelorm skal optages og udvikles i en mellemvært (pattedyr eller fisk), før en infektion kan viderebringes til et andet menneske.

Hvis en person som benytter et separationstoilet udskiller parasitter med fækalier, kan disse tilføres urinen gennem fækal forurening. Selvom parasitter kan forårsage sygdom, vil mennesker ofte have disse uden at vise sygdomstegn og den udskilte parasitmængde varierer betydeligt.

I måleprogrammet indgår der derfor undersøgelser for parasitter.

Forekomsten af rundorme, bændelorm og protozoer er ukendt, men menneske lav i den danske befolkning

#### *Virus*

De vigtigste virus der kan spredes med humane fækalier er enterovirus (poliovirus, coxsackie virus), Hepatitis A, Norwalk like-virus (calicivirus), adenovirus og rotavirus (B. Böttiger, Statens Serum Institut, personlig

meddelelse) (Murray et al., 1995). Ved diarré forårsaget af virus vil et menneske typisk udskille  $10^7$ - $10^{10}$  vira per gram fæces. Selvom der forekommer begrænset viden om hyppigheden af mavetarm infektioner forårsaget af virus, bl.a. grundet mangelfulde påvisningsmetoder, menes virus at være en hyppig årsag til sådanne infektioner. Virus må derfor forventes at være tilstede i fækal-forurenede urin.

Der er udført et selvstændigt projekt finansieret af Miljøstyrelsen vedrørende overlevelse af poliovirus i urin.

### 1.3 INDIKATORER TIL UNDERSØGELSE FOR FOREKOMST AF SMITSTOFFER

#### *Indikatorbakterier*

Tilstedeværelsen af et eller flere smitstoffer har traditionelt været sandsynliggjort ved påvisning af såkaldte indikatororganismer. En indikatororganisme, som oftest er en bakterie, skal opfylde flere krav. Den skal være tilstede, når smitstoffet som den skal indikere er tilstede, og den skal forekomme i samme eller større koncentration end smitstoffet.

Indikatorbakterien må ikke være i stand til at formere sig i miljøet i en grad, der overstiger smitstoffets. Den skal være mere resistent overfor desinfektionsmidler og påvirkninger fra det omgivende miljø (urin) end smitstoffet.

Indikatorbakterien skal vokse hurtigt på relativt simple identifikationsmedier og give karakteristiske og simple reaktioner, så en utvetydig identifikation hurtigt kan finde sted. Væksten på kunstige medier bør så vidt muligt ikke påvirkes af vækst af andre mikroorganismer.

Bakterielle indikatorer er især velegnede til at indikere tilstedeværelsen af sygdomsfremkaldende bakterier fra mave-tarmkanalen, men er generelt dårlige indikatorer for tilstedeværelsen af virus og parasitter.

#### *Enterokokker (fækale streptokokker)*

Enterokokker anvendes i flere sammenhænge som indikator for fækal forurening. Enterokokker er gram-positive, katalase-negative kokker, der optræder parvis eller i korte kæder.

Definitionen af slægten *Enterococcus* omfatter arterne: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* og *E. malodoratus*. Enterokokker udgør en del af gruppen af fækale streptokokker som inkluderer *S. bovis*, *S. suis*, *S. equinus*. Analyse for enterokokker foretrækkes i dag i stedet for analyse for fækale streptokokker. De to betegnelser anvendes i dag synonymt, selvom dette ikke er helt korrekt.

Enterokokker findes i menneskers og dyrs tarmkanal og udviser generelt større resistens overfor udtørring, varme og andre ydre påvirkninger end *E. coli*, *Salmonella* og de fleste andre Gramnegative sygdomsfremkaldende bakterier. Ved at anvende enterokokker som indikatorbakterie synes der at være en god sikkerhed for, at henfaldet af disse modsvares af et tilsvarende eller hurtigere henfald af sygdomsfremkaldende bakterier.

#### *Totale coliforme*

Gruppen af totale coliforme er gramnegative, stavformede, ikke-sporeformende bakterier som er laktose fermenterende ved 35°C-37°C med produktion af syre og gas. Bakterier der opfylder disse betingelser tilhører familien *Enterobacteriaceae*, som inkluderer *E. coli* samt medlemmer af

slægterne *Enterobacter*, *Klebsiella* og *Citrobacter* (Hurst et al., 1997). Værdien af totale coliforme som indikatorbakterier er tvivlsom, da bakterierne kan stamme fra andre miljøer end menneskers og dyrs tarmkanal. De er derfor mindre egnede som indikatorer for fækal forurening. Der er således ikke analyseret for total coliforme bakterier i projektet.

#### *Termotolerante coliforme (fækale coliforme)*

Gruppen af termotolerante coliforme bakterier opfylder alle kriterierne i definitionen af totale coliforme. De skal endvidere fermentere laktose med produktion af syre og gas ved 44,5°C. Disse udvidede kriterier betyder, at bakterierne næsten udelukkende stammer fra menneskers og dyrs tarmkanal. En undtagelse er dog slægten *Klebsiella*, der er blevet isoleret fra miljøprøver uden fækal forurening (Hurst et al., 1997). Termotolerante coliforme er således en bedre og mere specifik indikator for fækal forurening end totale coliforme bakterier.

#### *E. coli*

*E. coli* tilhører gruppen af termotolerante coliforme og findes udelukkende i dyrs og menneskers tarmkanal. Dette gør *E. coli* til den bedste indikator for fækal forurening i gruppen coliforme bakterier. *E. coli* adskilles fra andre termotolerante coliforme ved mangel på urease enzymet og tilstedeværelse af enzymet  $\beta$ -glucuronidase. Som indikatorbakterie i urin er *E. coli* således velegnet til indikation på en frisk fækal forurening. *E. coli* overlever oftest kortere tid end enterokokker i det ydre miljø.

#### *Antal udskilte indikatorbakterier*

I fæces findes høje koncentrationer af de nævnte indikatorbakterier. Et raskt menneske udskiller i alt ca.  $10^7$ - $10^9$  indikatorbakterier pr. gram fæces. Ved en fækal forurening i et urinseparerende toilet vil disse bakterier derfor blive tilført urinen.

#### *Kimtal ved 37°C*

De hyppigste anvendte metoder til påvisning af det totale antal af bakterier, som kan vokse ved 37°C, vil påvise enterokokker, *E. coli* og flere andre fækale indikatorbakterier, dog undtaget slægten Clostridier. Bakterier, som vokser ved 37°C, vil dog også tilhøre en række andre slægter, der findes i fækalier, hvoraf flere kan forårsage sygdom hos mennesker. Endelig vil bakterier i urin, som ikke kommer fra fækalier, eksempelvis jordbakterier, også påvises ved inkubation ved 37°C. Kimtal ved 37°C anvendes derfor som en generel indikator for tilstedeværelsen af smitstoffer, ligesom de også kan indikere en eventuel bakteriel vækst.

#### *Bakteriofager*

Bakteriofager er virus som kun inficerer bakterier. Fagernes overlevelse i miljøet anvendes i stigende grad til at studere overlevelsen af sygdomsfremkaldende virus i miljøet. Flere forskellige bakteriofager har været foreslået som indikatorer bl.a. F- specifikke bakteriofager og colifager (Lewis, 1995; Tree et al., 1997; Armon et al., 1995). F-specifikke bakteriofager er især aktuel som indikator, da de udviser stor resistens i miljøet og kan påvises ved relative simple og billige laboriemetoder. Standardiserede testmetoder til påvisning af bakteriofager er under udarbejdelse og kun få laboratorier foretager i dag analyse for bakteriofager rutinemæssigt. Analyser for bakteriofager er således ikke foretaget i projektet.

### *Fækale steroider*

Et alternativ til indikatorbakterier som et estimat for fækal forurening er anvendelsen af fækale steroider. Fækale steroider er mikrobielle nedbrydningsprodukter af kolesterol, som udskilles med afføringen. Da fækale steroider ikke nedbrydes i væsentlig grad i urin, er de foreslået anvendt til kvantitativ bestemmelse af den fækale forurening af urin. Påvisning af fækale steroider indikerer dog intet om tilstedeværelse af smitstoffer eller indikatorbakterier (Höglund et al., 1998). Fækale steroider benyttes derfor ikke som indikator i projektet.

## 2 Valg af måleparametre

### 2.1 TEMA 3 PROJEKTER

I alt 3 projekter med urinseparation og opsamling blev oprindeligt udvalgt blandt de projekter som modtog økonomisk støtte fra Tema 3 programmet til prøveudtagning og analyser fra november 1999 til juli 2000. Projektet ved Hjortshøj blev udvalgt efterfølgende med prøveudtagning påbegyndt i marts 2000.

De 4 projekter, som er nærmere beskrevet i afsnit 1.1, blev udvalgt som repræsentanter for forskellige typer af de mest almindelige former for urinseparation og opsamling. Hyldespjældet og Hjortshøj repræsenterer opsamling af urin i fælles tank fra 8-9 familier. I Hjortshøj blev der anvendt toiletter af typen WM-ekologen, som ikke anvender vandskyl. I Hjortshøj blev der foruden WM-ekologen også anvendt toiletter af typen Ekovak, hvor sidstnævnte anvendte skyllevand. Ved Møns Museumsgård anvendtes separationstoiletter af typen WM-ekologen, samt et vandfrit urinal primært til museets besøgende. Museet kan således betragtes som et offentligt toilet. Ved Kolonihaverne anvendtes en række forskellige toilettyper med ingen eller ringe vandskyl typisk af enkeltfamilier med 2-5 personer. Kolonihaverne repræsenterer således enkeltfamilier i sommerhus- og kolonihavebebyggelse med ingen eller ringe kloaksystemer.

### 2.2 VALG AF MIKROBIOLOGISKE MÅLEPARAMETRE

Med udgangspunkt i forekomsten af indikatororganismer og smitstoffer i urin og fækalier og egnede indikatorer til undersøgelse for forekomst af smitstoffer, som beskrevet tidligere i rapporten, blev nedenstående mikrobiologiske parametre udvalgt efter godkendelse af Miljøstyrelsen og Sundhedsstyrelsen. Der er ikke undersøgt for forekomst af virus i urin hvilket især skyldes mangelfulde eller ikke eksisterende teknikker til deres påvisning.

#### Bakterielle indikatorer:

Total kimtal ved 37°C.

*E. coli*

Enterokokker

#### Bakterielle smitstoffer:

*Campylobacter* spp.

*Salmonella*

#### Parasitære smitstoffer:

*Cryptosporidium parvum*

*Giardia duodenalis*.

Andre tarmparasitter

### 2.3 VALG AF FYSISK-KEMISKE PARAMETRE

Urinens temperatur og pH blev målt da disse vides at påvirke bakteriers evne til overlevelse og formering. Urinens farve og lugt blev endvidere registreret.

En række kemiske forbindelser udskilles i urin, herunder naturligt forekommende forbindelser og forbindelser som udskilles efter indtagelse af medicin og andre stoffer. Eksempelvis udskiller alle mennesker forskellige hormonforbindelser i urin, ligesom flere antibiotikaforbindelser og medicinske stoffer ofte udskilles i urin. Påvisning af antibiotikaforbindelser, hormoner og andre medicinske stoffer er vanskelig da der ofte ikke eksisterer standardiserede påvisningsmetoder. Påvisning af et enkelt kemisk stof kræver endvidere en specifik analyse, som ikke nødvendigvis påviser stoffets forskellige nedbrydningsprodukter. Endelig er udgiften til de enkelte kemiske analyser høj sammenlignet med udgifter til mikrobiologiske analyser.

Med udgangspunkt i etablerede analysemetoder og projektets budget er der i projektet analyseret for østrogenlignende stoffer, paracetamol og acetylsalicylsyre. Østrogenforbindelser blev valgt da indtagelse af disse muligvis kan udgøre en sundhedsrisiko. Paracetamol og acetylsalicylsyre er de hyppigste anvendte smertestillende midler. Påvisningsmetoder, resultater og vurdering af disse bliver rapporteret i hovedrapporten ”Recirkulering af næringsstoffer fra by til land”.

### 2.4 EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER

Da der i de udvalgte Tema 3 projekter ikke blev påvist bakterielle smitstoffer, er der udført overlevelsesforsøg af disse i urin i laboratorieforsøg.

I de eksperimentelle undersøgelser er overlevelsen af 7 forskellige sygdomsfremkaldende bakterier blevet undersøgt ved henholdsvis 7°C og 20°C (afsnit 4.4). De valgte temperaturer repræsenterer vinter- og sommertemperaturer i urinopsamlingstankene. Temperaturen i opsamlet urin vil dog ofte udvise stor variation blandt andet afhængig af placering af opsamlingstanke i eller over jord.

De valgte sygdomsfremkaldende bakterier repræsenterer de hyppigste årsager til diarré hos mennesker under danske og udenlandske forhold. Endvidere er der lavet undersøgelser for overlevelse af *Shigella* og *Vibrio cholerae* bakterier, hvor førstnævnte forekommer i Danmark. Der er ikke foretaget overlevelsesforsøg med vira eller parasitter.

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 TEMA 3 PROJEKTER

#### *Undersøelsesperioder*

De 4 projekter blev udvalgt som repræsentanter for forskellige teknologiske løsninger i forskellige bebyggelser med forskellige brugere.

Undersøgelserne omfattede prøver udtaget fra urinopsamlingstanke i de enkelte projekter. Prøverne blev udtaget månedligt med i alt 7 prøveindsamlinger fra Hyldebjerg (tank 2) og Møns Museumsgård i perioden november 1999 til maj 2000 og i 4 prøveindsamlinger fra Kolonihaveforbundet i perioden oktober 1999 til januar 2000. Urin fra beboere i Hjortshøj blev besluttet indsamlet efter projektets begyndelse for at få indsamlet flere resultater vedrørende forekomst og overlevelse af smitstoffer. Prøveudtagningen i Hjortshøj blev påbegyndt 3 måneder efter urintilførslen til tanken blev stoppet. I alt blev der udtaget 4 prøver fra Hjortshøj i perioden marts 2000 til juni 2000. I juli 2000 blev der udtaget yderligere prøver fra Hyldebjergs tank 3, 4 og 5. Ved tidspunktet for den første prøveudtagning (t<sub>0</sub>) var urintankene/holderne blevet tillukket og yderligere urintilførsel standset. Eventuelle kim og smitstoffer i urinen vil således ved t<sub>0</sub> have været eksponeret for urinmiljøet i varierende tidsperioder fra få uger til få måneder afhængig af blandt andet tidsrummet for fyldning af tanken.

TABEL 3.1 OVERSIGT OVER TIDSPUNKTER FOR PRØVEUDTAGNING FRA TEMA 3 PROJEKTERNE

	okt. 99	nov 99	dec. 99	jan. 00	feb. 00	mar 00	apr. 00	maj 00	juni 00	juli 00
Hyldebjerg tank 2										
Hyldebjerg tank 3-5										
Kolonihaveforbundet										
Hjortshøj										
Møns Museumsgård										

#### *Prøvetagning*

Prøver af urin fra Møns Museumsgård, Hyldebjerg og Kolonihaveforbundet blev udtaget af laboratoriet ROVESTA Miljø I/S, Næstved. Prøverne blev udtaget fra tanke isat cirkulationspumper efter 10-20 minutters omrøring. Der blev udtaget 1 l urin i sterile vacuumflasker til henholdsvis bakterielle undersøgelser, parasitologiske undersøgelser samt kemiske undersøgelser. Prøverne fra Kolonihaveforbundet blev transporteret og opbevaret ved Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole (KVL) i 10 l plastdunke.

Prøver fra Hjortshøj blev udtaget af en beboer med erfaring i prøveindsamling. Prøverne blev taget fra tank 1, hvori der var monteret en cirkulationspumpe og efterfølgende sendt til analyselaboratorium.

De fysisk-kemiske parametre og de bakteriologiske undersøgelser blev foretaget af ROVESTA Miljø I/S; de parasitologiske undersøgelser af Statens Seruminstitut og Statens Veterinære Serumlaboratorium og de kemiske undersøgelser af firmaerne MILJØKEMI (næringsstoffer, tungmetaller og miljøfremmede stoffer), samt Medilab, København (paracetamol, acetylsalicylsyre og østrogenlignende stoffer). Prøverne blev transporteret til laboratorierne i isolerede plastbokse med kølelegeme, og de bakteriologiske undersøgelser blev påbegyndt samme dag.

### 3.2 FYSISK-KEMISKE PARAMETRE

Ved hver prøvetagning blev pH, temperatur og udseende bestemt umiddelbart efter prøveudtagning. Temperaturen ved opbevaring af prøverne fra Kolonihaveforbundet ved KVL var 18-20°C. Fra marts 2000 blev der målt pH og temperatur på prøverne fra Møns Museumsgård og Hyldespjældet i laboratoriet efter transport og ikke som tidligere ved feltmåling i urintankene.

### 3.3 INDIKATORORGANISMER

#### *Kimtal ved 37°C*

Kimtal ved 37°C blev bestemt som tælling af synlige kolonier på Plate Count Agar efter inkubering ved 37°C i 48 timer (DS 2254, 1983).

Detektionsgrænsen for undersøgelsen var 100 bakterier pr. ml. Urinprøverne blev fortyndet ved 10-folds fortyndinger med 0,01 ml som det største undersøgte volumen.

#### *E. coli*

Antal *E. coli* blev bestemt efter membranfiltrering af 10 x 10 ml urin (ialt 100 ml) gennem 0,45 µm filtre, som efterfølgende blev inkuberet på Membran Lauryl Sulfat Agar ved 44°C i 1 døgn. De typiske gule kolonier blev talt og verificeret i Lauryl Sulfat Laktose Tryptophan Bouillon ved positiv indol reaktion og luftdannelse (ISO/DIS 9308-1, 1997). Detektionsgrænsen var 10 bakterier pr. 100 ml.

#### *Enterokokker*

Antal enterokokker blev bestemt ved membranfiltreringer (0,45 µm) af op til 100 ml urin. Filtrene blev inkuberet på Slanetz & Bartley Agar ved 37°C i 2 døgn, hvorefter de fremkomne positive kolonier blev verificeret på Galde Æskulin Agar (ISO/DIS 7899/2, 1997). Detektionsgrænsen var 10 bakterier pr. 100 ml.

### 3.4 SMITSTOFFER

#### *Campylobacter jejuni/coli*

En prøvemængde på 10 ml urin blev overført til lukkede flasker med 100 ml Preston Bouillon tilsat vækstfremmer (blod) og væksthæmmer (antibiotika). Prøven blev inkuberet ved 42°C i 1-2 døgn. Efterfølgende blev en del af prøven udsået på CCDA (blodfrit selektivt *Campylobacter* medium), som blev inkuberet i mikroaerofil atmosfære ved 42°C i 3-5 døgn inden aflæsning for vækst. Der blev udført parallelle analyser med *C. jejuni* og *C. coli* til kontrol af metoden (NMKL 119/2, 1990).



### *Salmonella*

En prøvemængde på 10 ml urin blev membranfiltreret (0,45 µm filter) med efterfølgende opformering af filteret i 100 ml Bufferet Pepton-vand ved 37°C i 1 døgn. Herfra blev 0,1 ml overført til Rappaport-Vassiliadis (RV) Bouillon med efterfølgende opformering ved 41,5°C i 1 døgn. Fra RV- bouillon blev 10 µl udstrøget på Brilliantgrøn Laktose Sakkarose Fenolrød (BLSF) agar , der blev inkuberet ved 37°C i 1 døgn og aflæst for typiske, rødlige kolonier. Der blev udført parallelle analyser med *Salmonella typhimurium* og *Salmonella enteritidis* til kontrol af metoden (DS266/1, 1999).

### *Cryptosporidium parvum*

Påvisning af *Cryptosporidium parvum* blev foretaget af Statens Serum Institut (SSI) og Statens Veterinære Serumlaboratorium (SVS).

Ifølge måleprogrammet skulle SSI varetage alle parasitundersøgelser af urinen fra samletankene. Da der imidlertid i nogle af urintankene blev fundet cryptosporidier, blev yderligere cryptosporidieundersøgelser igangsat. Urinprøver med positive fund af cryptosporidier blev sendt til SVS, der udfører identifikation af protozoerne *Cryptosporidium* og *Giardia* med mere specifikke diagnostiske teknikker end SSI. SVS foretog således kvalitative og kvantitative bestemmelser af *Cryptosporidium* og *Giardia* i urin, viabilitetsbestemmelser, samt infektionsforsøg i mus.

### *Påvisningsmetoder*

SSI foretog den indledende diagnostik v.h.a. en syre-fast (modificeret Ziehl-Nielsen) farvning på urinkoncentrat af 1000 ml urin. Ved positive fund af *Cryptosporidium parvum* blev et urinkoncentrat videresendt til SVS, som foretog kvalitative og kvantitative bestemmelser ved en specifik immunofluorescens-baseret metode (MERIFLOUR *Cryptosporidium*/ *Giardia* kit, Meridian Diagnostics, INC.), samt modificeret Ziehl-Nielsen farvning. Detektion af *Cryptosporidium* og *Giardia* blev foretaget ved anvendelse af det fluorescens-mærkede monoklonale antistof rettet mod antigener i parasitæggenes. Æggene fra *Cryptosporidium parvum* benævnes oocyster, mens æggene fra *Giardia* benævnes cyster.

### *Bestemmelse af viabilitet*

Viabilitetsbestemmelserne blev lavet med en DAPI/PI (4',6-diamidino -2-phenylindole/propidium iodide) farvemethode, som er baseret på inklusion eller eksklusion af fluorescerende vital farver i parasitæggenes. Ved mikroskopi skelnes mellem følgende: tomme oocyster (DAPI/PI -/-), som ikke optager nogen farvestoffer; inklusion af begge farvestoffer (DAPI/PI +/+), som indikerer letal beskadigelse af celle væggen; inklusion af DAPI (DAPI/PI +/) som indikerer en metabolisk aktiv celle væg; samt synlig infrastruktur uden optagelse af farvestof (DAPI/PI -/-), der indikerer muligt levende oocyster (Jenkins et al., 1997).

TABEL 3.2: KORRELATION MELLEM *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* OOCYSTERS VIABILITET OG EVNE TIL AT OPTAGE FLOURESCERENDE VITAL FARVER.

Oocyst type	Oocyste indhold ved direkte lys	Inklusion af PI farve	Inklusion af DAPI farve	Viabilitet
Tom skal	Nej	Nej	Nej	Død
PI+	Ja	Ja	Ja	Død
DAPI+/PI-	Ja	Nej	Ja	Viabel

DAPI-/PI-	Ja	Nej	Nej	Muligvis viabel*
-----------	----	-----	-----	------------------

\* DAPI-/PI- oocyster kan konverteres til DAPI+/PI- og vice versa.

#### *Museinfektionsforsøg*

Ved en infektion med *C. parvum* vil der ske en opformering af oocyster i musens tarmceller. Oocyster der ikke forårsager en infektion vil derimod blive udskilt med fæces, og ikke kunne påvises i musens tarmkanal 7 dage efter tilførsel af oocyster.

Til museinfektionsforsøg blev der anvendt udavlede, neonatale mus, 1-4 døgn gamle. Musene blev tilført 100 µl suspension indeholdende ca. 50 *C. parvum* oocyster. Oocysterne blev opkoncentreret fra urin ved centrifugering (prøven fra Møns Museumsgård) eller immunomagnetisk separation ved hjælp af Dynabeads GC-Combo test kit (DynaL A/S, Norge) (prøven fra Hyldespjældet). Musene blev aflivet 7 dage efter tilførsel af oocyster, hvorefter en del af tarmkanalen blev fundet og opkoncentreret. Indholdet af musenes tarmkanal blev undersøgt ved det specifikke immunofluorescens kit for forekomst af *C. parvum* oocyster.

#### *Giardia*

Foruden undersøgelser for *Cryptosporidium* er der også undersøgt for protozoen *Giardia* ved SSI, samt ved SVS. Ved SVS anvendtes det specifikke immunofluorescens kit (MERIFLOUR *Cryptosporidium*/ *Giardia* kit, Meridian Diagnostics, INC.).

#### *Andre tarmpatogene parasitter*

SSI udførte analyser for rundorme og bændelorme æg ved standardmetode med opkoncentrering og identifikation i mikroskop.

#### *Antal analyser ved negative fund*

Principielt blev der for alle mikrobiologiske parametre ved negative fund, eksempelvis bakterielle smitstoffer eller antal bakterier under detektionsgrænsen, udført en efterfølgende analyse. Efter 2 på hinanden følgende analyser som gav et negativt resultat, ikke påvist eller under detektionsgrænsen, blev der ikke yderligere analyseret for den pågældende parameter.

### 3.5 EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER

#### *Urinprøver og måling af pH*

Overlevelsesforsøg med bakterielle smitstoffer blev udført i urin indsamlet i Hyldespjældet fra opsamlingstankene 4 og 5. Urinen blev opsamlet i sterile 1 l infusionsflasker, der blev opbevaret i op til 4 dage inden forsøgene blev påbegyndt. Flaskerne blev opbevaret ved henholdsvis 7 og 20°C. Inden påbegyndt forsøg blev pH målt dagligt i en uge.

#### *Bakterielle smitstoffer*

Bakterielle smitstoffer var referencestammer fra internationale stammekollektioner eller velkarakteriserede stammer fra kollektioner ved KVL. Bakteriestammerne repræsenterer de vigtigste årsager til bakterielt betingede tarminfektioner i ind- og udland.

De anvendte testbakterier var følgende:

1. *Vibrio cholerae* O1
2. *Vibrio parahæmolyticus*
3. *Salmonella typhimurium*
4. *Salmonella enteritidis*
5. *Shigella dysenteriae*
6. *Shigella flexneri*
7. *E. coli* 0157:H7
8. *Campylobacter jejuni*

Testbakterierne blev opformeret Brain Heart Infusion (BHI) bouillon i 16 - 18 timer ved 37°C. Dog blev *Campylobacter jejuni* opformeret i BHI bouillon i 44-48 timer ved 42°C i mikroaerofil atmosfære. Efter fastlæggelse af standardvækstkurver for de enkelte bakterier blev koncentrationen bestemt til  $10^9$ - $10^{11}$  bakterier pr. ml efter opformering i BHI-bouillon.

Bakterieceller til overlevelsesforsøg i urin blev opkoncentreret ved centrifugering af 1 ml overnatskultur ved 4200 rpm i 20 min. Bakteriecellerne blev derefter opslemmet i fysiologisk saltvand inden overførsel til 1000 ml urin. Startkoncentration af bakterier blev fastlagt til  $10^6$  -  $10^8$  pr. ml urin. Efterfølgende blev antallet af bakterier i urinen bestemt ved forskellige tidsintervaller efter overførsel af bakterieceller. Antallet af bakterier blev bestemt efter 10-folds fortyndinger ved direkte punkt inokulation af 10 µl på relevante, selektiv agarmedier. Den største undersøgte volumen var 100 µl, med en detektionsgrænse på 10 bakterier pr. ml.

Til dyrkning af *Vibrio* arter anvendtes Thiosulfat-Citrat-Galde-Sakkarose (TCBS) agar; SSI-agar blev anvendt til påvisning af til *Salmonella* og *Shigella* (Blom et al., 1999); blodfrit selektivt *Campylobacter*-medium (CCDA) til påvisning af *Campylobacter*; og MacConkey agar til dyrkning af *E. coli*. Alle agarmedier blev inkuberet ved 37° i 18-24 timer. CCDA agar blev dog inkuberet mikroaerofilt ved 42°C i 44-48 timer. De anvendte medier anvendes rutinemæssigt til påvisning af smitstofferne og bygger alle på et selektivt og indikativt princip.

Overlevelsesforsøg blev lavet som dobbeltforsøg.

## 4 Resultater

### 4.1 FYSISK-KEMISKE PARAMETRE

#### *Temperatur*

Temperaturen i urinprøver indsamlet fra Hyldespjældet og Møns Museumsgård i de fire første prøveindsamlinger (november 1999 – februar 2000) varierede mellem 6,0 og 10,0 °C. Ved temperaturmåling af urinprøver efter transport til analyselaboratoriet (marts – maj 2000) varierede temperaturen mellem 12,0 og 23,0 °C. De høje temperaturer målt i marts-maj 2000 skyldtes måling efter transport til laboratoriet. Samtidig med laboratoriets ændrede måleprocedure skiftede laboratoriet prøveudtager.

Temperaturen af urinprøver i Hjortshøj målt umiddelbart efter prøveudtagning i perioden fra marts til juni 2000 var mellem 5,5 og 10,2 °C med den højeste temperatur målt i juni måned.

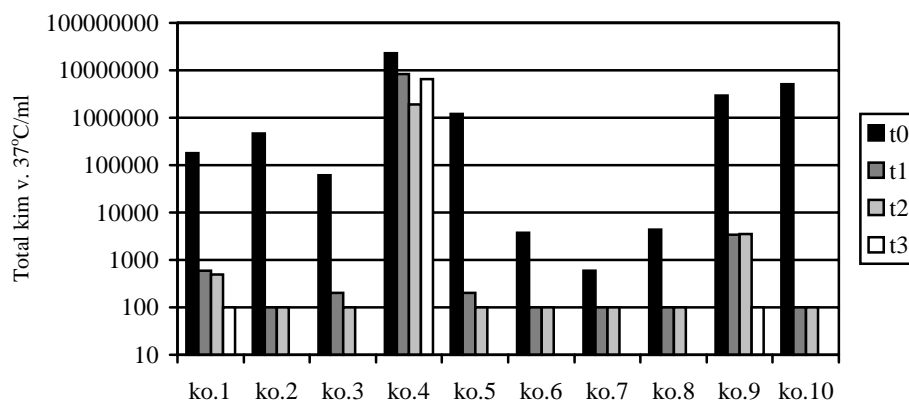
Temperaturen i urinbeholdere fra Kolonihaveforbundet opbevaret ved KVL varierede mellem 18,0 til 20,0 °C. Det kan bemærkes, at urinopsamlingsbeholderne i Kolonihaveforbundet ikke var nedgravet. Temperaturen af opbevaret urin i Kolonihaveforbundet må således forventes at variere med årstidens temperatur.

#### *pH*

Et gennemsnits pH på ca. 9 blev målt i urinprøver fra alle projekterne med værdier varierende fra 8,6 til 9,3. Der blev ikke fundet væsentlige forskelle af pH værdierne fra de 4 projektsteder. pH blev målt i laboratoriet fra marts til juni 2000 i prøver fra Hyldespjældet og Møns Museumsgård. Dette skønnes dog ikke at have influeret på værdierne.

### 4.2 FOREKOMST OG OVERLEVELSE AF MIKROORGANISMER

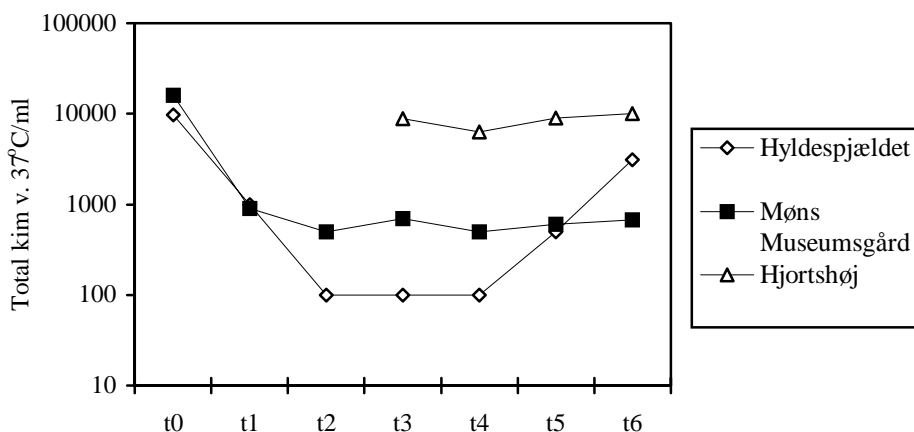
Der fandtes nogen variation mellem urinopsamlingsbeholderne med hensyn til fund af antal mikroorganismer, især kimtallene ved de første målinger ( $t_0$ ) i urin fra Kolonihaveforeningen udvidste variation. Kimtalsmålinger i prøver fra de relative små urinbeholdere som blev anvendt i Kolonihaveforeningen (<100 l) vil forventes at udvise større variation end kimtal fundet i prøver fra de langt større urintanke anvendt i de de andre projekter (>1000 l).



FIGUR 4.1 KIMTAL VED 37°C I KOLONIHAVEFORENINGEN

Forekomst af kimtal ved 37°C i Kolonihaveforeningens 10 opsamlingsbeholdere. Prøverne blev udtaget 5/10/99 (t0), 9/11/99 (t1), 6/12/99(t2) og enkelte prøver 17/1/00 (t3). Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Målinger under detektionsgrænsen på 100 bakterier pr. ml er angivet med værdien 100.

Antal totalkim ved 37°C i Kolonihaveforeningen var ved den første analyse (t0) mellem 600-2,3 x10<sup>7</sup> bakterier pr. ml (fig. 4.1). I alle beholdere undtaget nr. 4 (ko. 4) henfaldt totalkim til under detektionsgrænsen på 100 bakterier pr. ml på 1-4 måneder. Antal totalkim ved 37°C var under detektionsgrænsen efter 2 måneders opbevaring for 7 urinbeholdere. Beholder nr. 4 var delvis fyldt med frisk urin som kun havde været lagret kort tid inden undersøgelserne blev påbegyndt. De relative høje totalkimtal fundet i tank 4 kan formodes at være forårsaget af en relativ frisk fækalforurening og/eller forurening med jord eller andet bakterieholdigt materiale.



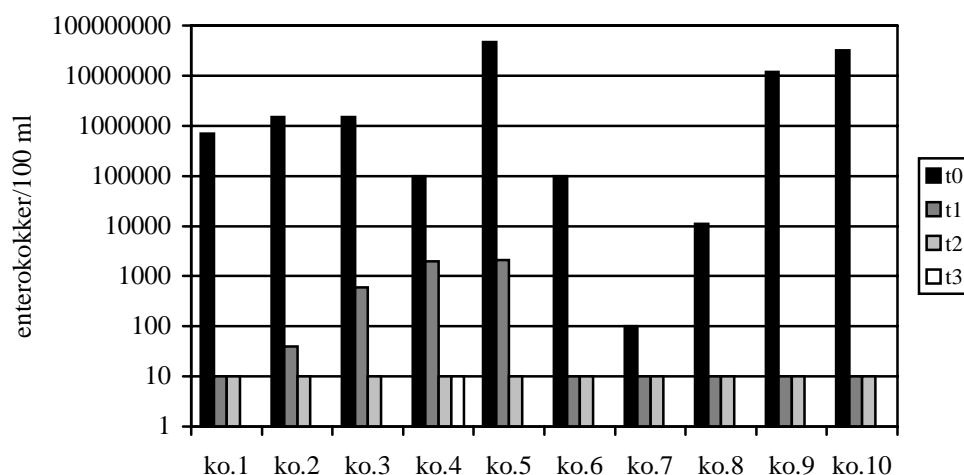
FIGUR 4.2 TOTAL KIM VED 37°C

Forekomst af kimtal ved 37°C i samletanke ved Hjortshøj, Hyldespjældet og Møns Museumsgård. Tidspunkterne t0-t6 er månedlige prøvetagninger indsamlet i perioden november 1999 – maj 2000. Hjortshøj fik dog kun udtaget prøver fra t3-t6 i perioden marts 2000 – juni 2000. Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Målinger under detektionsværdien 100 bakterier pr. ml er angivet som 100.

Antal totalkim ved 37°C faldt for Hyldespjældet og Møns Museumsgård efter 2 måneders lagring (fig. 4.2). Herefter fandets antal totalkim konstant (100-1000 bakterier/ml) i den efterfølgende 3-4 måneders periode. Der ses en lille stigning af kimtalsværdierne i forårs månederne (t5 og t6), hvilket eventuelt kan skyldes vækst i tankene. Antal totalkim ved 37°C for Hjortshøj udviste ringe variation ( $10^4$  per ml) igennem den 4 måneder lange analyseperiode. Det relativt højere totalkim ved 37°C i Hjortshøj kan skyldes, at der var en utæthed i låget i urintanken i Hjortshøj, igennem hvilken der kan være blevet tilført jord og dermed en lavgradig kontamination med jordbakterier.

#### *Enterokokker*

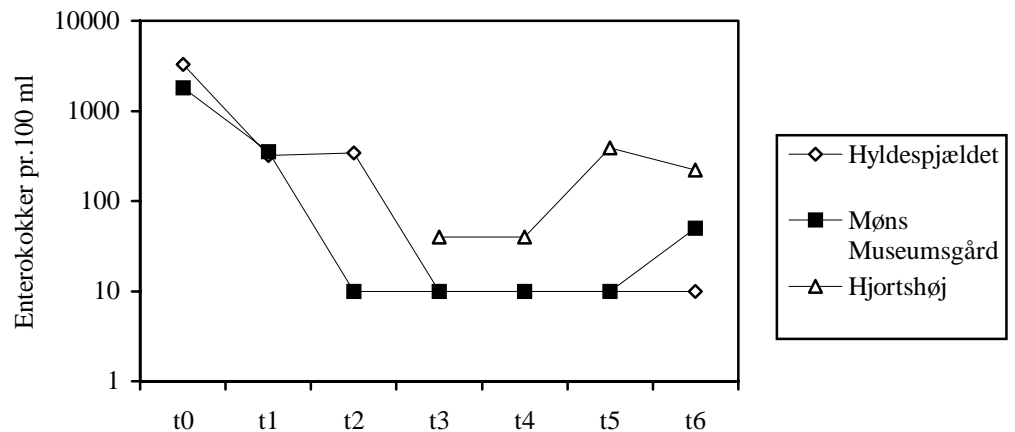
Forekomst og overlevelse af enterokokker i urin fra projekterne er vist i figurerne 4.3 og 4.4



FIGUR 4.3 ENTEROKOKKER I KOLONIHAVEFORBUNDET

Forekomst af enterokokker i urinopsbeholdere fra Kolonihaveforbundet. Prøverne er udtaget 5/10/99 (t0), 9/11/99 (t1), 6/12/99 (t2) og 17/1/00 (t3). Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Målinger under detektionsgrænsen 10 bakterier pr. 100 ml er angivet som 10.

Antallet af enterokokker i urinprøver fra Kolonihaveforbundet ved første prøveudtagning (t0) varierede mellem 100 og  $3,2 \times 10^7$  bakterier pr. 100 ml. Derefter faldt antallet til  $<10$  bakterier pr. 100 ml efter lagring af urinen i 1-3 måneder.



FIGUR 4.4 ENTEROKOKKER I HYLDESPJÆLDET, MØNS MUSEUMSGÅRD OG HJORTSHØJ

Forekomst og overlevelse af enterokokker i urintanke ved Hjortshøj, Hyldebjerg og Møns Museumsgård. Tidspunkterne t<sub>0</sub>-t<sub>6</sub> er månedlige prøvetagninger taget i perioden november 1999 – maj 2000. Hjortshøj har dog kun fået taget målinger fra t<sub>3</sub>-t<sub>6</sub> i perioden marts 2000 – juni 2000. Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Målinger under detektionsværdien 10 bakterier pr. 100 ml er angivet som 10.

Antallet af enterokokker målt i Hyldebjerg og Møns Museumsgård faldt markant til under detektionsgrænsen efter 2 måneders lagring af urinen, hvorimod antallet ved Hjortshøj ikke faldt, men derimod viste en svag stigning gennem måleperioden. Som for total kim ved 37°C, kan forurening via en utæthed i låget til urintanken have påvirket det målte antal enterokokker.

#### Hyldebjergs urintank 3, 4 og 5

Prøvetagningen i de oprindelige måleprogrammer inkluderede kun tank 2 i Hyldebjerg. Tank 1 blev kun delvist fyldt og indgik derfor ikke i undersøgelsen. For at udbygge datamaterialet vedrørende forekomst og overlevelse af total kim ved 37°C og enterokokker blev der yderligere foretaget analyser af prøver fra 3 urintanke i Hyldebjerg. Resultaterne er vist i tabel 3.4.1. Urinprøver blev udtaget fra tankene 03/07/00 efter 20 min. omrøring med cirkulationspumpe. Urin tilførsel til tank 3 blev stoppet 29/12/99; tilførsel til tank 4 blev stoppet 27/02/00; og urin tilførsel til tank 5 blev stoppet 22/04/00. Urinen i tankene var således lagret i 6 måneder for tank 3; i 4 måneder for tank 4; og i ca. 2 måneder for tank 5.

TABEL 4.1 URINPRØVER FRA HYLDESPJÆLDETS TANKE 3, 4 OG 5.

	Tank 3	Tank 4	Tank 5
Ophørsdato for urin tilførsel	29/12/00	27/02/00	22/04/00
Kimtal ved 37°C pr. ml	600	100	<100
Enterokokker pr. 100 ml	<10	70	100

Antal total kim ved 37°C og enterokokker fundet i urintankene 3, 4, og 5 i Hyldebjerg svarer således til resultaterne fra de øvrige målinger med lave kimtal efter ≥ 2 måneders lagring.

### *E. coli*

Antal *E. coli* var under detektionsgrænsen på 10 bakterier pr. 100 ml i alle analyserede urinprøver uafhængig af projekt, urintank, og prøvetagningstidspunkt. Dog fandtes der i alt  $3,1 \times 10^6$  *E. coli* per 100 ml urin i den første analyse (t0) i urinbeholder nr. 4 fra Kolonihaveforbundet. I de to efterfølgende målinger (t1 og t2) var antallet af *E. coli* under detektionsgrænsen på 10 bakterier pr. 100 ml. Urinbeholder no. 4 havde også relative høje antal totalkim ved 37°C.

### *Konklusion*

Antal enterokokker og *E. coli* faldt typisk til under detektionsgrænsen efter 3-4 måneders opbevaring af urinen med nogen variation mellem projekterne. Urinprøver fra Hjortshøj og Kolonihaveforbundet indeholdt et relativt højere antal kim ved 37°C. Faktorer af betydning for disse forskelle er relativt små urinvolumener og ringe tilførsel af skyllevand (lavere fortyndningsgrad) i Kolonihaveforbundet. Der er samtidig flere børn per voksen i Kolonihaveforeningen (1 barn:1,2 voksen) end i Hyldebjerg og Hjortshøj (1:1,6). Ved Møns Museumsgård er der oplyst 3 gange så mange voksne besøgende i 1999 sammenlignet med børn. Især små børn har svært ved at anvende separationstoiletterne korrekt, da toiletterne er dimensionerede til voksne, hvorved risikoen for fækal kontamination øges (Jönsson et al., 2000). Den relativt mere koncentrerede urin i Kolonihavernes opsamlingsstanke medførte ikke som forventet en højere pH værdi og større reduktion i kimtal.

## 4.3 SMITSTOFFER

### *Campylobacter spp. og Salmonella*

*Campylobacter spp. og Salmonella* blev ikke påvist i nogen urinprøver uafhængig af projekt, urintank, og prøvetagningstidspunkt i 2 på hinanden gentagne målinger.

### *Cryptosporidium parvum*

*Cryptosporidium parvum* blev påvist i prøver fra urintankene ved Hyldebjerg, Hjortshøj og Møns Museumsgård. *C. parvum* blev derimod ikke påvist i urinbeholderne fra Kolonihaveforbundet. I Hyldebjerg blev der ikke påvist *C. parvum* ved SSI i prøverne udtaget i november (t0) og december (t1), hvorimod oocyster påvistes ved SSI i de efterfølgende 6 prøveudtagninger (t2-t6). Ved SVS påvistes der derimod kun oocyster i urinprøverne udtaget ved t5 og t6 i Hyldebjerg.

I Hyldebjergs og Hjortshøjs urintanke blev der ved SVS påvist 1-3 oocyster per ml urin i 5 ud af 9 prøver. Med et så lille antal oocyster vil der være stor usikkerhed på viabilitetsbestemmelserne. Det kan dog med sikkerhed konkluderes, at nogle af de fundne oocyster ved SVS var levende og dermed potentielt infektiøse. I enkeltprøver fra tank 5 fra Hyldebjerg blev der ved SVS fundet et relativt højere antal oocyster på i alt 8,8 oocyster per ml urin, hvoraf 64% fandtes levende i DAPI/PI assayet.

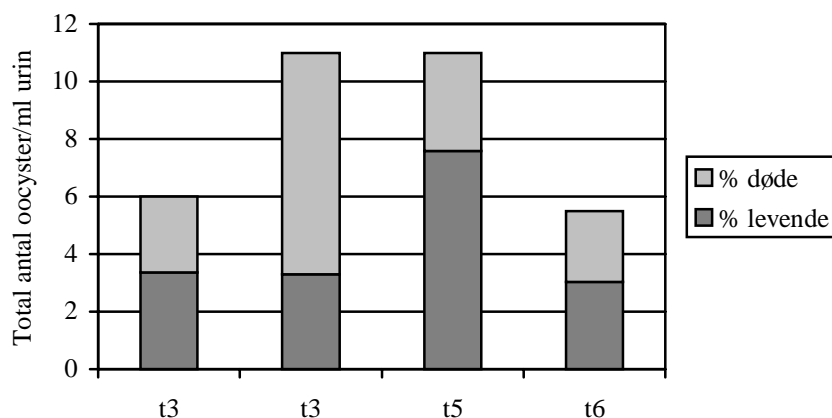
Der var store variationer i såvel antal fundne oocyster samt viabilitetsbestemmelserne udført ved SSI og SVS. Dette skyldes sandsynligvis især måleusikkerhed og forskelligt anvendte påvisningsmetoder. De anvendte kvantitative tællemetoder til påvisning og karakterisering af *C. parvum* er generelt behæftet med relative store måleusikkerheder. Der er samtidig stor forskel på især specificiteten af de anvendte kvantitative metoder. Den modificerede Ziehl-Nielsen farvningsmetode, som blev anvendt ved såvel SSI



og SVS, har en relativ lav specificitet sammenlignet med den antistof-baserede metode, som udelukkende blev anvendt ved SVS.

#### *Positive fund af Cryptosporidium parvum*

Det synes dog sikkert, at der er fundet *C. parvum* i urintankene ved Møns Museumsgård, Hyldebjerg og Hjortshøj.



FIGUR 4.5

Antal levende og døde *Cryptosporidium parvum* fundet i urin fra Møns Museumsgård. De viste fund er fra prøver udtaget 22/02/00 (t3), 27/04/00 (t5) og 23/05/00 (t6) og analyseret ved SVS. SVS påbegyndte analyser for *C. parvum* i februar (t3).

Den procentvise fordeling af antal døde og levende oocyster i urin fra Møns Museumsgård er vist i figur 3.4.5. Resultater fra t4 er ikke medtaget, da der i prøven blev fundet oocyster ved modificeret Ziehl-Nielsen farvning, men ikke ved den antistof-baserede metode.

Der blev ved SVS udført to museinfektionsforsøg med oocyster opkoncentreret fra urin i Hyldebjergs tank 5, samt oocyster fra Møns Museumsgård (t3). Det var kun muligt at gennemføre to infektionsforsøg på grund af det lave antal oocyster i urinprøverne.

TABEL 4.2 MUSEINFEKTIONSFORSØG MED *C. PARVUM*

	Udtagnings Dato	<i>C. parvum</i> oocyster pr. ml urin	Antal mus	Antal positive mus ved infektions forsøg
Møns Museumsgård t3	22.02.2000	11	6	0/6
Hyldebjerg tank 5	03.07.2000	9	3	1/3

Som vist i tabel 3.4.2 kunne 1 ud af 3 mus inficeres med oocyster fra Hyldebjergs, hvorimod ingen af de 6 mus kunne inficeres med oocyster fra

Møns Museumsgård. Det skal bemærkes, at der normalt anbefales en infektionsdosis på  $1-5 \times 10^5$  oocyster ved podning af mus. I dette forsøg var det dog kun muligt at opkoncentrere ialt 50 oocyster til podning. Trods den meget lave infektionsdosis, var det alligevel muligt at inficere en enkelt mus af i alt 3 mus med oocyster fra Hyldespjældets tank 5.

#### *Giardia*

Ved SVS blev *Giardia* påvist i Hjortshøjs urintank og i tankene 3, 4 og 5 fra Hyldespjældet. Der blev ikke fundet *Giardia* i urin fra tanken ved Møns Museumsgård eller i Kolonihaveforbundets beholdere. Det er ikke muligt med den anvendte metode at bestemme arten af de fundne *Giardia* oocyster. Der blev endvidere kun foretaget en kvalitativ analyse og ikke en egentlig tælling af *Giardia* cyster. Da oocysternes oprindelse må formodes at være fra mennesker vil den mest sandsynlige art være *Giardia duodenalis*, som er den hyppigst forekommende *Giardia* art i Danmark (Heidi Enemark, SVS, personlig meddelelse).

#### *Andre tarmpatogene parasitter*

Der blev ifølge SSI ikke identificeret andre tarmpatogene parasitter i urinprøver fra projekterne, herunder spolorm og børneorm.

#### *Konklusion*

Der blev ikke påvist *Salmonella* og *Campylobacter* i urinprøver uafhængig af sted og opbevaringstid af urin. Med antallet af personer som har urineret i tankene i de enkelte projekter, især i det offentlige toilet ved Møns Museumsgård, kunne det forventes at der var tilført urin indeholdende *Salmonella* og *Campylobacter*. Begge smitstoffer viste dog en yderst ringe overlevelse i de eksperimentielle forsøg (se efterfølgende) og et eventuelt antal af disse må derfor forventes at være blevet reduceret til under detektionsgrænsen efter få dage i perioderne under opfyldning af urintankene.

#### *C. parvum og G. duodenalis påvist*

Der blev i Hyldespjældet, Møns Museumsgård og Hjortshøj påvist levende *C. parvum* oocyster, af hvilke enkelte oocyster fra Hyldespjældet var infektiøse. Det relative antal levende oocyster syntes ikke at blive reduceret gennem forsøgsperioderne. Antal fundne oocyster var dog behæftet med så stor usikkerhed at en egentlig kvantificering ikke var mulig.

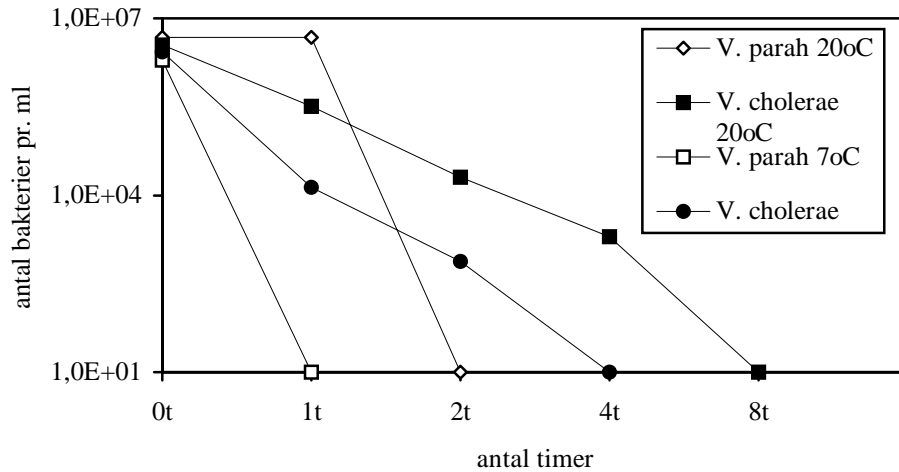
## 4.4 EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER

Da der ikke påvistes *Salmonella* og *Campylobacter* i nogle af Tema 3 projekterne, blev det besluttet at udføre eksperimentelle undersøgelser af overlevelsen af vigtige bakterielle smitstoffer i urin.

#### *pH*

pH i urin anvendt til de eksperimentelle undersøgelser udviste ringe variation ved begge temperaturer og måltes i forsøgsperioden til mellem 8,9 og 9,1.

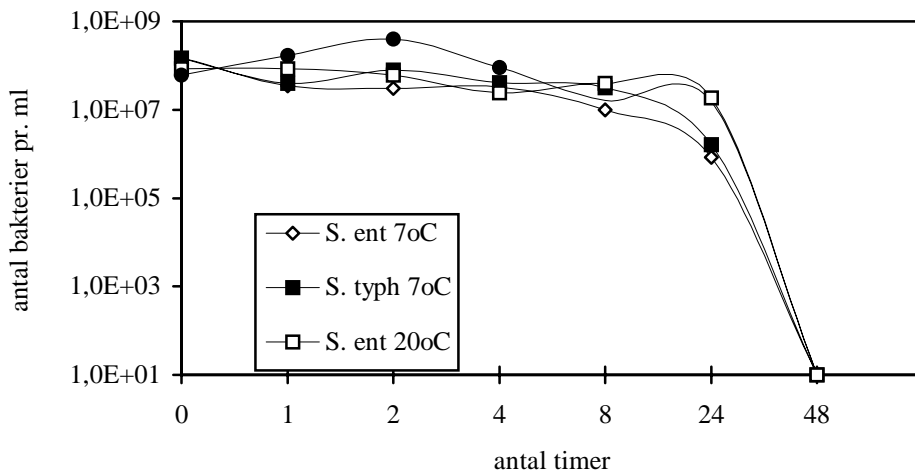
#### *Resultater fra henfaldsforsøg*



FIGUR 4.6

Overlevelse af henholdsvis *Vibrio parahæmolyticus* (*V. parah*) og *Vibrio cholerae* O<sub>1</sub> (*V. cholerae*) i urin fra separationstoiletter ved 20°C og 7°C efter 1 time, 2 timer, 4 timer og 8 timers eksponering. Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Detektionsgrænsen var 10 bakterier pr. ml (mindste undersøgte mængde var 0,1 ml urin).

Begge *Vibrio* arter viste yderst ringe overlevelse i urin, således kunne *V. parahæmolyticus* ikke påvises efter 2 timer og *V. cholerae* ikke efter 8 timer.

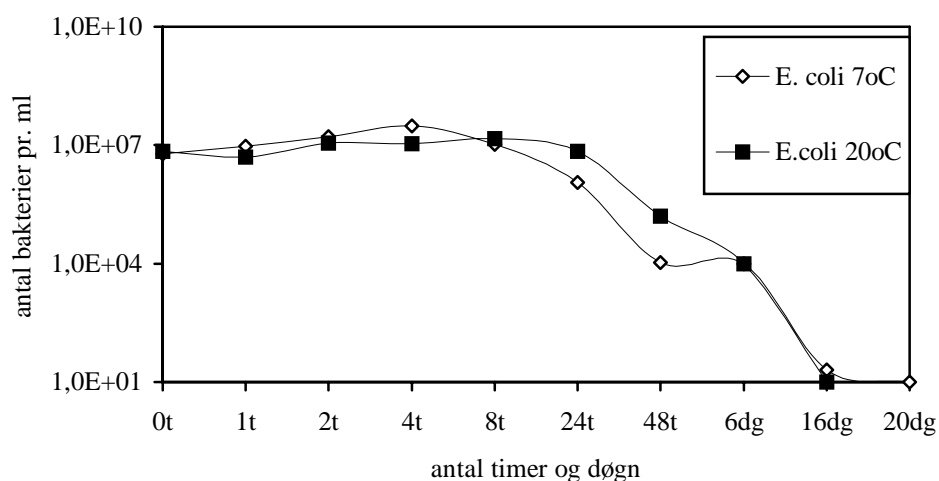


FIGUR 4.7

Overlevelse af *Salmonella enteritidis* (*S. ent*) og *Salmonella typhimurium* (*S. typh*) i urin fra separationstoiletter ved 20°C og 7°C efter 1 time, 2 timer, 4 timer, 8 timer, 24 timer samt 48 timers eksponering. Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Detektionsgrænsen er angivet som 10 bakterier pr. ml.

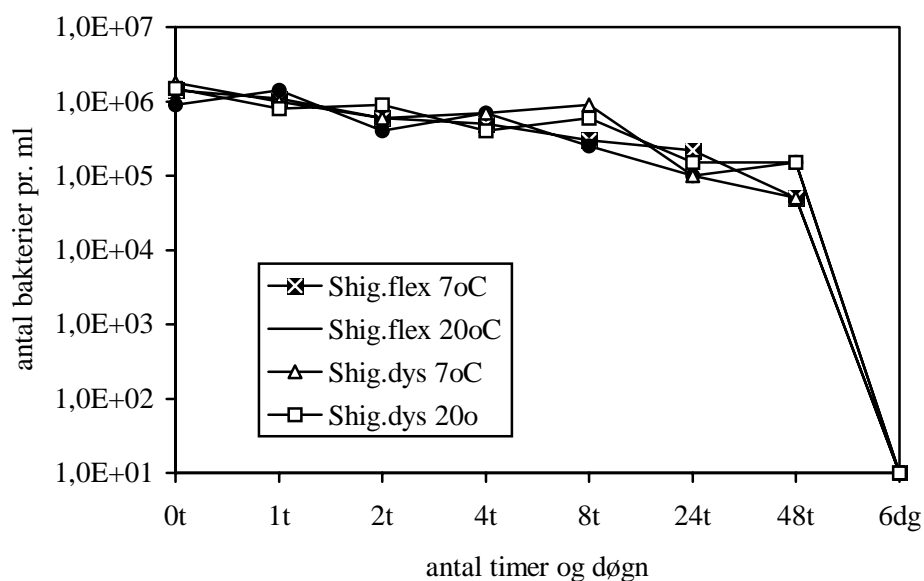
Begge de to *Salmonella* stammer viste ringe overlevelse, således faldt antallet af begge stammer svagt de første 24 timer, mens der ikke kunne påvises vækst efter 48 timer.

FIGUR 4.8



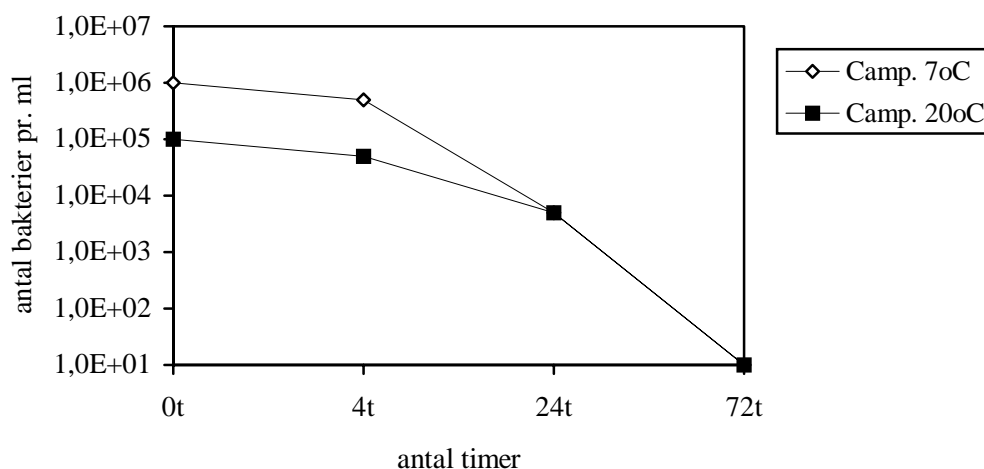
Overlevelse af *E. coli* O157:H7 i urin ved 20°C og 7°C efter 1 time, 2 timer, 4 timer, 8 timer, 24 timer, 48 timer, 6 døgn, 16 døgn og 20 døgn eksponering. Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Detektionsgrænsen var 10 bakterier pr. ml.

FIGUR 4.9



Overlevelse af *Shigella flexneri* og *Shigella dysenteriae* i urin ved 20°C og 7°C efter 1 time, 2 timer, 4 timer, 8 timer, 24 timer, 48 timer, 6 døgn eksponering. Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Detektionsgrænsen var 10 bakterier pr. ml.

Antallet af *E.coli* O157:H7 og *Shigella* bakterier viste et begrænset fald de første 48 timer i urin. Ingen af de to testbakterier kunne påvises efter 20 døgns eksponering til urin.



FIGUR 4.10

Overlevelse af *Campylobacter jejuni* ved 20°C og 7°C efter 4 timer, 24 timer og 72 timers eksponering. Bemærk at y-aksen er logaritmisk. Detektionsgrænsen var 10 bakterier pr. ml.

Antallet af *Campylobacter jejuni* faldt jævnt det første døgn og bakterien kunne ikke påvises efter 72 timer. Antallet af *Campylobacter jejuni* blev bestemt semikvantitativt, beregnet ud fra vækst/ikke-vækst på CCDA agar. En egentlig kvantitativ angivelse var ikke mulig, da *Campylobacter* viser sværmning på CCDA agar, hvilket umuliggør tælling af enkeltkolonier.

#### *Konklusion på overlevelse af bakterielle smitstoffer*

Det ses af figurerne 4.5-4.10, at antallet af alle bakteriestammer faldt til en værdi under detektionsgrænsen på 10 bakteriekolonier pr. ml i løbet af maksimalt 20 døgn. *V. parahæmolyticus* og *V. cholerae* stammerne henfaldt langt hurtigere end de andre smitstoffer. *Salmonella*, *Shigella* og *Campylobacter* kunne ikke påvises 2-3 døgn efter podning, mens *E. coli* O157:H7 havde den længste overlevelse på mellem 16 og 20 døgn.

## 5 Diskussion

### 5.1 DE MIKROBIOLOGISKE FUND I TEMA 3 PROJEKTERNE

Urin fra samletanke i de 4 repræsentative urinopsamlingsprojekter, Hyldespjældet, Møns Museumsgård, Kolonihaveforeningen og Hjortshøj, blev undersøgt i en periode på 3-6 måneder. Herved fandtes, at total kim v. 37°C og enterokokker typisk henfaldt til under detektionsgrænsen på henholdsvis 100 bakterier pr. ml og 10 bakterier pr. 100 ml efter 3-4 måneders lagring. *E. coli* blev kun påvist i en enkelt prøve fra Kolonihaveforbundet. Efter ikke at være påvist ved gentagne målinger blev der dog påvist få enterokokker ved Møns Museumsgård efter 6 måneders lagring. Antal total kim v. 37°C syntes at udvise en svag stigning efter 5 måneders lagring af urin i projekterne i Hyldespjældet og Møns Museumsgård. Yderligere undersøgelser bør fastlægge vækstmuligheder af total kim v. 37°C og enterokokker i lagret urin. Nordling (1998) fandt dog, at enterokokker kan vokse i frisk urin (pH 6) ved 10°C, men der er ikke foretaget vækst forsøg med bakterier i lagret urin fra separationstoiletter, hvor pH er ca. 9.

I Hjortshøj fandtes der ingen reduktion i såvel enterokokker og total kim v. 37°C efter 6 måneders lagring. Ved undersøgelse af opsamlingstanken fandtes låget til denne ikke tæt. Da tanken er placeret nedenfor en skråning, kan dette have betydet forurening af tanken med jord, plantebestanddele, og afløb af forurenede vand fra jordoverfladen. Tilførsel af kim fra miljøet er sandsynligvis forklaring på den manglende reduktion i antallet af total kim v. 37°C og enterokokker ved Hjortshøj.

De bakterielle smitstoffer *Salmonella* og *Campylobacter* blev ikke påvist i nogen prøver. De parasitære smitstoffer *Cryptosporidium parvum* og *Giardia* blev påvist ved gentagne prøveudtagninger fra tre af urinopsamlingsprojekterne. Ingen andre parasitære smitstoffer blev påvist. Yderligere undersøgelser af *C. parvum* viste, at en del af parasitæggene var både levende og infektive. Antal og viabilitet af disse æg syntes ikke at henfalde igennem prøveperioden. En egentlig kvantificering af *C. parvum* og *Giardia* oocyster var dog ikke mulig på grund af stor usikkerhed ved målemetodernes sensitivitet. Viabilitet og infektivitet af *Giardia* oocyster blev ikke undersøgt.

### 5.2 DANSKE EKSPERIMENTIELLE UNDERSØGELSER

De eksperimentelle forsøg med overlevelsen af *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *E. coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, og *V. parahaemolyticus* i urin opbevaret ved 7°C og 20°C viste, at antallet af alle smitstofferne blev reduceret til under detektionsgrænsen på 10 bakterier pr. ml efter 20 døgn uafhængig af opbevaringstemperaturen.

### 5.3 UDENLANDSKE UNDERSØGELSER AF FOREKOMST AF BAKTERIELLE SMITSTOFFER OG INDIKATORBAKTERIER I OPSAMLET URIN

Ved gennemgang af litteraturen vedrørende forekomst og overlevelse af mikrobielle smitstoffer i human urin er der kun fundet beskrivelser af resultater fra Sverige, hvor man har opsamlet og analyseret urin fra forskellige urinopsamlingsprojekter. I to af disse projekter er overlevelsen af mikroorganismer i urinopsamlingstanke undersøgt igennem perioder på 4 måneder (Höglund et al., 2000) og 6 måneder (Olsson, 1995). Olsson (1995) udtog og analyserede dog kun i alt 2 urinprøver. Höglund et al. (2000) undersøgte antallet af total coliforme bakterier, enterokokker, *E. coli* og sulfit-reducerende clostridier i 4 urinopsamlingsprojekter. Resultaterne viste, at antallet af enterokokker og total coliforme bakterier blev reduceret til <3 bakterier pr. ml efter 126 dage. *E. coli* blev ikke påvist og antallet af clostridier var uændret efter 126 dages opbevaring af urinen (Höglund et al., 2000). Olsson (1995) undersøgte antal enterokokker, *E. coli* og colifager i urin fra 7 urinopsamlingsprojekter og fandt mellem 7 og 12.000 enterokokker pr. ml. *E. coli* og colifager blev derimod ikke påvist. Der er ikke forsøgt givet en forklaring på de uventede manglende fund af colifager i Olssons undersøgelse. Tidsintervaller før og mellem prøveudtagninger varierede betydeligt i undersøgelse (Olsson, 1995).

I en anden svensk undersøgelse fandtes store mængder enterokokker i 14 enkeltprøver udtaget fra 11 forskellige urinopsamlingsprojekter. Således var der i 16 % af prøverne flere end 100.000 enterokokker pr. ml urin. Det fremgår ikke af undersøgelsen hvor længe urinen blev opbevaret inden prøveudtagning. En yderligere biokemisk karakterisering af enterokokker isoleret fra urinprøverne og fra biofilm udtaget fra rørsystemerne viste stor overensstemmelse i reaktionsmønstre, hvilket kunne tyde på vækst af enterokokker i urinopsamlingssystemet (Höglund et al., 1998).

### 5.4 SVENSK EKSPERIMENTIELLE UNDERSØGELSER

Höglund et al. (1998) fandt, at bakterierne *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella seftenberg*, *Salmonella typhimurium* og *Pseudomonas aeruginosa* ikke kunne påvises efter 3 dages eksponering i urin, mens *E. coli* ikke blev påvist efter 1 dag. Derimod blev antallet af den sporedannende bakterie *Clostridium perfringens* ikke reduceret efter 80 dages ophold i urin. Antal enterokokker blev reduceret med 90% efter 30 dage ved 4°C. Generelt fandt Höglund et al. (1998), at bakterierne overlevede længere ved 4°C end ved 20°C. Endvidere viste forsøg med fortynding af urinen med vand en bedre overlevelse af bakterierne i fortyndet urin.

Olsson (1995) fik lignende resultater som Höglund et al. (1998). Olsson (1995) undersøgte endvidere overlevelsen af *Campylobacter jejuni* tilsat urin samt *E. coli* i urin tilsat fækalier. *C. jejuni* blev ikke isoleret og *E. coli* tilsat urin med fækalier havde samme overlevelse som hvis *E. coli* blev tilsat urin i renkultur. *E. coli* blev reduceret fra  $5,4 \times 10^5$  bakterier pr. ml til < 10 bakterier pr. ml efter 7 dages opbevaring ved 4°C.

Overlevelsesforsøg i urin med rotavirus og bakteriofagen, *Salmonella typhimurium* type 28B, viste en ringe reduktion af antallet af disse ved 4-5°C, mens der ved 20°C fandtes 90% reduktion efter henholdsvis ca. 30 og 70 dage (Jönsson et al., 2000).

Antallet af levende æg fra svinets spolorm *Ascaris suum* blev ikke reduceret i urin efter 3 uger (Höglund et al., 1998). Antal levende æg blev bestemt ved fastlæggelse af æggenes evne til larveudvikling.

## 5.5 SAMMENLIGNING MED DE SVENSKES UNDERSØGELSER

Selvom der generelt er udtaget et færre antal prøver med lavere udtagningshyppighed i de svenske undersøgelser, syntes resultaterne at understøtte projektets fund i at total kim v. 37°C og enterokokker henfalder til under detektionsgrænsen efter 3-4 måneders lagring af urinen. *E. coli* kunne ikke påvises og udviser yderst ringe overlevelse i urin. Endvidere viser såvel de danske og svenske undersøgelser, at *Salmonella* og *Campylobacter* kun overlever kort tids eksponering til urin.

Sammenholdt med den ringe overlevelse af andre vigtige bakterielle smitstoffer vist i de danske undersøgelser, viser resultaterne, at gramnegative bakterielle smitstoffer, herunder slægterne *Pseudomonas* og *Aeromonas*, ikke kan forventes at overleve mere end ca. 30 dage i urin opsamlet fra separationstoiletter.

På baggrund af den relativ bedre overlevelse af de grampositive enterokokker må der forventes en generelt længere og bedre overlevelse af grampositive bakterier. Dette skyldes højst sandsynligt, at den relativt tykkere cellevæg i grampositive bakterier virker beskyttende overfor giftvirkningen af urin. Det skal bemærkes, at langt hovedparten af årsagerne til smitsomme bakterielle mavetarminfektioner hos mennesker skyldes gramnegative bakterier. Ved fortynding af urin med vand, lave opbevaringstemperaturer af urin og meget høje start koncentrationer af smitstoffer ( $>10^7$  per ml) vil der kunne forventes en øget og længere overlevelse af bakterielle smitstoffer. Som tidligere beskrevet bør eventuel eftervækst af total kim v. 37°C og enterokokker undersøges yderligere.

De svenske overlevelsesforsøg med bakteriofager, rotavirus og spolormeæg er få og ikke entydigt konklusive, men syntes at vise en øget overlevelse af virus og en række parasitæg i lagret urin sammenlignet med bakterier, selv efter flere måneders lagring. Det er således usikkert i hvilket omfang en 6 måneders lagring af urin vil reducere antallet af virus og parasitæg. Yderligere undersøgelser af overlevelse af virus og parasitæg i urin bør derfor gennemføres. Der henvises i øvrigt til en rapport om overlevelse af virus i urin, som er finansieret af Miljøstyrelsen og forventes offentliggjort i 2001.

## 5.6 DANSKE OG SVENSKES FUND AF CRYPTOSPORIDIER

Der er fundet *Cryptosporidium parvum* oocyster i urinprøver ved gentagne undersøgelser i flere Tema 3 projekter. Ved viabilitetsbestemmelser og infektionsforsøg i mus fandtes levende og infektiøse oocyster. Der blev ikke påvist andre parasitter i de danske undersøgelser.

Der foreligger ikke svenske undersøgelser af forekomsten af *C. parvum* eller andre parasitter i urin fra separationstoiletter. Svenske forskere har derimod udført eksperimentelle undersøgelser af overlevelsen af *C. parvum* i urin fra separationstoiletter ved 3 forskellige pH værdier over 133 dage (Höglund et al., 1999). Resultaterne viste, at ved pH 9 blev antal levende oocyster reduceret



til under detektionsgrænsen efter 63 dage, mens antal levende oocyster i urin med pH justeret til 5 og 7 ikke henfaldt til under detektionsgrænsen i forsøgsperioden. Da pH af urin opsamlet i de danske separationstoiletter viste en stabil pH værdi på ca. 9 skulle man ifølge de svenske undersøgelser forvente en kraftig reduktion i antallet af oocyster til under detektionsniveau efter få måneders lagring. Dette modsiges dog af de danske fund, hvor der blev påvist levende og infektive oocyster i urin lagret helt op til 5 måneder. Som for andre parasitæg er der behov for yderligere undersøgelser af overlevelse og infektivitet af *C. parvum* oocyster i lagret urin. Sådanne undersøgelser bør udføres med oocyster udskilt fra mennesker, idet oocyster fra kalve, som eksempelvis blev anvendt i svenske forsøg (Höglund et al., 1999), kan være af en anden type end oocyster fra mennesker (McLauchlin et al., 1998). Det er ukendt om forskellige oocysttyper udviser forskellig overlevelse i urin og infektivitet.

### 5.7 BEGRÆNSNINGER I METODER ANVENDT TIL PÅVISNING AF PROTOZOER I TEMA 3 PROJEKTERNE

Begrænsninger i de anvendte metoder eksisterer især for undersøgelserne af protozoslægterne *Cryptosporidium* og *Giardia*. Der eksisterer ikke standardiserede og gennemprøvede metoder til påvisning af disse protozoer i urin. De anvendte kvantitative påvisningsmetoder i Tema 3 projekterne, modificeret Ziehl-Nielsen farvning og immunofluorescerende antistoffer, synes således behæftet med stor usikkerhed af især deres sensitivitet, men også specificitet. Eksempelvis syntes der, at kunne forekomme gærceller i urin som ved en modificeret Ziel-Nielsen farvning kan fejlidentificeres som protozo oocyster.

Selvom der er uenighed i litteraturen angående hvilke metoder, der er de mest optimale til identifikation af protozoer, fastlæggelse af æggenes viabilitet og deres infektivitet betragtes de i projektet anvendte metoder blandt de bedste (Black et al., 1996, Quílez et al., 1996, Rodríguez-Hernandez et al., 1994).

Museinfektionsmodellen anvendt i Tema 3 projektet har dog den svaghed, at et stort antal oocyster (ca.  $10^5$ ) anbefales anvendt i modellen. Da der i Tema 3 projekterne blev isoleret et lavt antal oocyster (ca. 50/L urin) var det kun muligt at pøde musene med et markant lavere antal oocyster end det anbefalede. Dette kan have betydet, at oocyster fra en række prøveindsamlinger var infektive, men at der i infektionsforsøgene ikke blev podet med en tilstrækkelig mængde oocyster til at få etableret infektion. Endelig er det ikke nødvendigvis alle oocyster isoleret fra mennesker som kan give infektion i mus.

### 5.8 BEGRÆNSNINGER I METODER ANVENDT TIL PÅVISNING AF BAKTERIER I TEMA 3 PROJEKTERNE

Til de eksperimentelle undersøgelser med smitstoffer til podning i urin blev der anvendt referencetammer opformeret i vækstbouillon. Der blev i projektet forsøgt indsamlet fæces fra personer med klinisk sygdom som indeholdt relevante smitstoffer til eksperimentelle undersøgelser. Dette var desværre ikke muligt, især fordi tidsperioden fra udskillelse af smitstoffer, sygdomsdiagnose og til modtagelse af fæcesprøve, var så lang, at smitstofferne

oftest var døde eller fandtes i så lave antal at forsøg ikke kunne gennemføres. I et pilotforsøg med fæces fra en person med klinisk salmonellose forårsaget af *Salmonella enteritidis*, fandtes dog ingen forskelle i reduktion af smitstoffet efter tilsætning af fæces til urin og referencestammen (resultater ikke angivet). Olsson (1995) fandt endvidere, at fæces med enterokokker og *E. coli* podet til urin henfaldt på omtrent samme tid som referencestammer af disse organismer podet til urin.

Ved de eksperimentelle undersøgelser blev bakterielle smitstoffer påvist ved direkte udsæd på selektive agarmedier. Det er således ikke undersøgt, hvorvidt smitstofferne henfalder eller går over i et hvilestadium, hvor de ikke udviser vækst ved direkte udsæd (herunder såkaldte ”levende-men-ikke-dyrkbare” stadier af bakterieceller). Et pilotforsøg med *Vibrio cholerae* O1 viste vækst ved direkte udsæd på TCBS agar op til 4 timer efter podning af urinprøve, hvorimod der fandtes vækst på TCBS agar i op til 24 timer efter podning af urinprøve hvis urinprøven først blev opformeret i vækstbouillon inden agarudsæd (resultater ikke indeholdt i rapporten). Betydningen af disse fund er dog højst usikre. Resultaterne antyder, at bakterier i urin i en kort periode kan indgå i et hvilestadium, hvor de ikke kan vokse efter direkte udsæd, inden de dør. Disse fund synes dog at have ringe eller ingen betydning ved vurderingen af sundhedsrisici ved anvendelse af urin .

## 5.9 BEGRÆNSNINGER VED UNDERSØGELSERNE I TEMA 3 PROJEKTERNE

Tema 3 projekternes formål var, at undersøge forekomst og overlevelse af smitstoffer i urin opsamlet fra separationstoiletter. Det har således ikke været muligt at undersøge smitstoffers og indeholdte kemiske forbindelsers skæbne i miljøet efter udbringelse af urin som gødning i jordbruget. Yderligere undersøgelser bør fastlægge en række forhold vedrørende udbringning af urin i miljøet, herunder overlevelse af smitstoffer og nedbrydning af relevante medicinske stoffer og naturligt forekommende kemiske forbindelser.

## 5.10 ANBEFALINGER VEDRØRENDE LAGRINGSTID AF URIN INDEN GENANVENDELSE. BEKENDTGØRELSER VEDRØRENDE REGULERING AF ANVENDELSE AF URIN

De danske resultater viser, at efter en lagringsperiode af separeret urin på 4 måneder kan antallet af bakterielle smitstoffer og indikatorbakterier forventes reduceret til < 100 per ml urin. I Sverige anbefales en opbevaringsperiode på 6 måneder ved 20°C, hvis urinen skal anvendes som gødning til alle typer af afgrøder. Kortere opbevaringstider anbefales, eksempelvis 1 måned ved 4°C, hvis urinen ønskes anvendt som gødning på foderafgrøder; på afgrøder som efterbehandles inden human konsum; og hvis relativt små mængder urin anvendes, eksempelvis i egen have (Jönsson et al., 2000). De danske og svenske undersøgelser viser således at ved 4 måneders lagring af separeret urin opnås en markant reduktion af bakterieantallet. De målte reduktioner af bakterieantallet forudsætter, at lagringstanken ikke tilføres urin eller andet bakterieholdigt materiale efter lagring er påbegyndt.

Resultater vedrørende forekomst og overlevelse af parasitter, herunder *Cryptosporidium parvum* og *Giardia duodenalis*, og virus er utilstrækkelige men indikerer at såvel levende og infektiøse parasitstadier, samt virus kan findes i urin efter 6 måneders lagring.

I forhold til nuværende lovgivning skal anvendelse af human urin reguleres efter vejledning til bekendtgørelse om udbringning af spildevand. Ifølge denne bekendtgørelse og oplysninger fra Miljøstyrelsen betragtes lagret urin ud fra den smitstofmæssige reduktion som stabiliseret slam. Der er ved denne betragtning ikke taget hensyn til eventuelt forekomst af medicinrester i lagret urin.

## 6 Konklusion

- Ved 4 måneders lagring af separeret urin opnås en markant reduktion af bakterielle smitstoffer.
- Anvendelse af lagret urin som gødning synes at udgøre en yderst ringe risiko for bakterielt-betingede mavetarm infektioner hos dyr og mennesker ved håndtering af urin, samt ved indtagelse af afgrøder gødet med urin.
- Levende og infektiøse parasitstadier, samt virus kan forventes at findes i urin efter 6 måneders lagring. Yderligere undersøgelser er påkrævet til fastlæggelse af forekomst og overlevelse af parasitter og virus i lagret urin.

## 7 Referencer

- Albrechtsen, H. J. 1998. Boligernes vandforbrug. Mikrobiologiske undersøgelser af regn- og gråvandsanlæg. Bolig- og Byministeriet og Miljøstyrelsen, København.
- Armon, R. & Y. Kott. 1995. Distribution comparison between coliphages and phages og anaerobic bacteria (*Bacteroides fragilis*) in water sources, and their reliability as fecal pollution indicators in drinking water. *Water Science and Technology* 51 (5-6): 215-222.
- Black, E. K., G. R. Finch, R. Taghi-Kilani & M. Belosevic. 1996. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *FEMS Microbiology Letters* 135(2-3): 187-189.
- Blom, M., A. Meyer, P. Gerner-Schmidt, K. Gaarslev & F. Espersen. 1999. Evaluation of Statens Serum Institut enteric medium for detection of enteric pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (7): 2312-2316.
- DS 266. 1988. Vandundersøgelse: Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af Salmonella i vand, slam, sediment og jord. Dansk Standardiseringsråd, København.
- DS 2254. 1983. Vandundersøgelse: Bestemmelse af aerobt kimal ved 37°C. Dansk Standardiseringsråd, København.
- Fittschen I & Hahn, H.H. 1998: Characterization of the municipal wastewaterpart human urine and a preliminary comparison with liquid cattle excretion. *Wat. Sci.Tech.* 38 (6):9-16
- Hurst, C. J., G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach & M. V. Walter. 1997. *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Höglund, C & T. A. Stenström. 1999. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in source separated human urine. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 740-746.
- Höglund, C, T. A. Stenström, H. Jönsson & A. Sundin. 1998. Evaluation of faecal contamination and microbial die-off in urine separating sewage systems. *Water Science and Technology* 38 (6):17-25.
- Höglund, C, B. Vinnerås, T. A. Stenström & H. Jönsson. 2000. Variation of chemical and microbial parameters in collection and storage tanks for source separated human urine. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 35 (8): 1463-1475.
- Jenkins, M. B., L. J. Anguish, D. D. Bowman, M. J. Walker & W. C. Ghiorse. 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (10): 3844-3850.

- Jönsson H, B. Vinnerås, C. Höglund & T. A. Stenström. 1999: Source separation of urine. *Wasser and Boden* 51 (11): 21-25.
- Jönsson H, T. A. Stenström, J. Svensson & A. Sundin. 1997: Source separated urine –nutrient and heavy metal content, water saving and faecal contamination. *Water Science and Technology* 35 (9):145-152.
- Jönsson H., B. Vinnerås, C. Höglund, T. A. Stenström, G. Dalhammar & H. Kirchmann. 2000. Källsorterad humanurin i kretslopp.VA-FORSK RAPPORT, Stockholm.
- Lewis G.D. 1995. F-specific bacteriophage as an indicator of human viruses in natural waters and sewage effluents in Northern New Zealand. *Water Science and Technology* 31 (5-6): 231-234.
- McLauchlin J., D. P. Casemore, S. Moran & S. Patel. 1998. The epidemiology of cryptosporidiosis: application of experimental sub-typing and antibody detection systems to investigation of water-borne outbreaks. *Folia Parasitologica* 45(2): 83-92.
- Miljøprojekt nr. 351. Hygiejniske aspekter ved behandling og genanvendelse af organisk affald. Miljøstyrelsen, København.
- Modificeret ISO/DIS 7899/2, MST98. 1998. Vandundersøgelse. Bestemmelse af enterokokker i badevand. Membranfiltreringsmetode. Miljøstyrelsen, København.
- Modificeret ISO/DIS 9308/1, MST98. 1998. Vandundersøgelse. Bestemmelse af coliforme bakterier og *Escherichia coli* i badevand. Membranfiltreringsmetode. Miljøstyrelsen, København.
- Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover & R. H. Tenover. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC.
- NMKL 119/2. 1990. *Campylobacter jejuni/coli*. Påvisning i livsmiddel. 2. udg., Nordisk Metodikkomité for Livsmedel. Esbo.
- Nordling, J. 1998. Growth of enterococci at optimal and psychrotrophic temperature conditions related to growth in an urine source separating sewage system. Master thesis, Department of Biology, Stockholm University, Sweden.
- Olsson, A. 1995. Källsorterad humanurin – förekomst och överlevnad av fekala mikroorganismer samt kemisk sammansättning. SMI rapport 208, Institutionen för lantbruksteknik, Sveriges Lantbruks Universitet, Uppsala.
- Quilez J., C. Sánchez-Acedo, A. Clavel, E. del Cacho & F. López-Bernad. 1996. Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Veterinary Parasitology* 67(1-2): 75-81.

Rodríguez-Hernandez, J., A. Canut-Blasco, M. Ledesma-Garcia & A. M. Martín-Sánchez. 1994. Cryptosporidium oocysts in water for human consumption. *European Journal of Epidemiology* 10 (2): 215-218.

Stenström, T. A., C. Höglund & H. Jönsson. 1999. Evaluation of microbial risks and faecal contamination of urine diverting sewage systems. *Wasser und Boden*, 51 (10): 11-14.

Thaysen, J. H., I. Lorenzen, L. K. Christensen, 1986. *Medicinsk Kompendium*. Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck, København.

Tree J.A., M.R. Adams & D.N. Lees. 1997. Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a 'viral indicator'. *Water Science and Technology* 35 (11-12): 227-23.