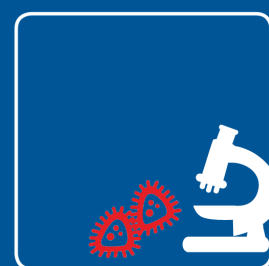


Søren Aabo:

Mikrobiologisk risikoklassificering af genindvundet og recirkuleret vand på mejerivirksomheder (G/R vand)

Microbial risk classification of recovered and recycled water in the dairy industry



Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

Mikrobiologisk risikoklassificering af genindvundet og recirkuleret vand på mejerivirksomheder (G/R vand).

2. Projektleder

Seniorforsker Søren Aabo
Kemitorvet, Bygning 201, DTU, 2800 Lyngby
sabo@food.dtu.dk

3. Øvrige medarbejdere

- Ph.d.-studerende Sisse Wagtberg Hansen
- Seniorforsker Tina Beck Hansen
- Postdoc Tasja Buschhardt
- Postdoc Maria Helmér
- Laborant Resadije Idrizi
- Postdoc Patrick Murigu Kamau Njage (ikke lønnet af projektet, varetog machine learning-analysen)
- Professor Lisbeth Truelstrup Hansen (ikke lønnet af projektet, varetog 16S-rRNA gen-baseret identificering af bakterielle isolater)

4. Finansieringskilder

- Mælkeafgiftsfonden
- Miljøstyrelsen /Vandeffektive Mejerier
- DTU

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF-finansiering: 1. januar 2015-31. december 2018

Evt. revideret: 1. januar 2015-30. juni 2019

6. Projektresumé

Dansk:

Formålet var karakterisere den mikrobielle flora i genindvundet og recirkuleret vand (G/R-vand) og at kunne beskrive vækstmuligheden af patogener i G/R-vand ved forskellige opbevaringstemperaturer. Dette skulle kombineres med måling af fysisk-kemiske parametre med henblik på at kunne udpege mulige markører, som virksomheder let kan analysere for at afgøre, hvor lang tid vandet kan opbevares ved en given temperatur, uden at der opstår kritisk vækst af patogener. I ultrafiltreret (UF)- og omvendt osmose-behandlet (RO) vand fra fire mejerier fandtes et total kimaltal på mellem <1 op til 5500 CFU/ml. Der blev påvist en række forskellige mikroorganismer, der varierede mellem mejerierne. Floraen vurderes at være relateret til kolonisering af procesanlægget. Flere bakteriearter tilhørte familien Enterobacteriaceae og ved helgenomsekventering (WGS) og virulensgenanalyse blev kun *Klebsiella pneumonia* identificeret som potentiel patogen. Der fandtes vækstunderstøttelse af varierende styrke i både RO-vand, polisher-vand (2 x RO-behandling) og Biobooster-vand (biologisk filtreret RO-vand) for alle de undersøgte patogener (*Salmonella*, *Listeria*, STEC og *Klebsiella*) ved 10 °C, 20 °C og 30 °C. Der observeredes ingen vækst af de udvalgte patogener ved 10 °C inden for de første 24 timer, hvilket indikerer, at sikker opbevaring i forhold til vækst af patogener kan ske ved temperaturer på 10 °C eller derunder. Alle RO-vand, polisher-vand og Biobooster-vandprøver blev analyseret kvantitativt for pH, nitrat, nitrogen, urea, COD, laktose og citrat. Mulige markører for vækstbegrænsning blev identificeret ved hjælp af maskinlæring, der som responsvariabel anvendte den tid, der medgik til fire generationers vækst af de fire patogener i de i alt 72 vandprøver fra de tre typer filtreringsanlæg. Tiden til fire generationer blev fastlagt ved prædiktiv modellering. Analysen indikerede, at en vækst for de fire patogener på højst fire generationer ved en opbevaringstemperatur på 20 °C kræver, at faktorerne pH, fosfat, og nitrogen i procesvandet alle skal være lavere end henholdsvis 5,3 mg/L, 2,2 mg/L, og 6,3 mg/L. Et fremtidigt perspektiv er at kunne udvikle et program, der kan fortælle virksomhederne, hvor lang tid deres RO-vand kan lagres alt efter lagringstemperatur og koncentrationerne af nitrogen, pH og fosfat i RO-vand, polisher-vand og Biobooster-vand uden at der sker vækst til mere end fire generationer af de patogener, der blev undersøgt i dette projekt.

English:

The purpose was to characterise the microbial flora in recovered and recirculated water (G/R water) and to describe the growth capacity of pathogens in G/R water stored at different temperatures. This should be combined with biochemical characterisation with the aim to identify parameters, which could be easily be analysed for by the industry, and which could advice the company how long timer G/R water can be stores at which temperature without critical growth of pathogens. In ultrafiltrated (UF) and reverse osmosis (RO) water from four dairy companies a total cell count between <1 and 5500 CFU/ml was observed. An array of different bacteria was identified, which varied between companies, and was associated to colonisation of the process equipment and not as transferred from raw milk. Several bacteria species belonged to the family Enterobacteriaceae. By whole genome sequencing (WGS) virulence gene analysis only *Klebsiella pneumonia* was considered a potential pathogen. Growth support of varying strength was observed in RO-water, polisher water (2 x RO water), and Biobooster water (biologically filtered RO water) for all the investigated pathogens, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Listeria* and STEC at 10 °C, 20°C and 30°C. Common for all pathogens, no growth was observed at 10 °C the first 24 hours, which indicate that a safe storage in relation to growth of the pathogens before reuse can be obtained at or below a temperature of 10 °C. All RO-water, polisher water, and Biobooster water samples were analysed for pH, nitrate, nitrogen, urea, COD, lactose and citrate. Machine learning was used to identify possible growth limiting factors using a response variable "time to four generations" estimated by predictive microbial modelling on growth data on the four pathogens from 72 water samples. The analysis showed that factors leading to growth limitation differed between the pathogens. The data indicated that at 20 °C, all three factors pH, phosphate, and nitrogen in the process water should be lower than 5.3 mg/L, 2.2 mg/LI, and 6.3 mg/L, respectively. A future perspective is to develop a program, which can estimate how long process water can be stored at a given temperature if the concentrations of nitrogen, phosphate and pH in RO-water, polisher-water, and Biobooster-water are below certain values.

7. Projektets formål

Dansk:

Det oprindelige formål med projektet var at etablere grundlæggende viden om sammensætningen af hele bakterieflo-
raen under proces og lagring af G/R-vand, samt at udpege mikrobielle indikatorer, der sammen med prædiktive mo-
deller for vækstpotentialet af patogene mikroorganismer, kunne bruges som grundlag for at inddele G/R-vand i for-
skellige risikoklasser. Målet var endvidere at tilvejebringe grundlag for udvikling af en kvantitativ PCR-metode til påvis-
ning af udvalgte indikatorer, som mejerier kunne bruge til hurtig risikoklassifikation af G/R-vand.

I starten af projektet ændredes definitionen af RO-vand på mejerier til at være en fødevare, hvilket betød at behovet
for inddeling i risikoklasser af vand i forhold til anvendelse på mejeriet ændrede sig. Ved et møde med Claus Heggum,
Landbrug & Fødevarer, i juni 2016 blev det besluttet at korrigere formålet, så et væsentligt formål var at kunne be-
skrive vækstmuligheden af patogener ved opbevaring af G/R-vand i tanke ved forskellige temperaturer. Dette skulle
kombineres med måling af fysisk-kemiske parametre med henblik på at kunne udpege markørparametre, som virk-
somheder let kan analysere for at afgøre, hvor lang tid vandet kan opbevares ved en given temperatur, uden at der
opstår kritisk vækst af patogener. Arbejdet med udpegning af eventuelle biokemiske indikatorer erstattede de dele af
det oprindelige formål, som vedrører identifikation af bakterielle indikatorer og udvikling af en qPCR-metode til påvis-
ning af disse.

English:

The purpose according to the application was to establish a basic knowledge on the composition of the bacterial flora
during processing and storage of RO-water and to define microbial indicators, which, together with predictive models
for the growth potential of pathogenic bacteria could serve as a basis for defining different risk classes of RO-water.
Furthermore, the purpose was to establish the basis for a quantitative PCR method for detection of selected indica-
tors, which could be used by the dairy industry for rapid risk classification of RO-water.

Soon after embarking on the project, the definition of RO-water from the dairy industry changed to be a food product.
By this, the need to risk classify RO-water was no longer relevant. At a meeting with Claus Heggum, Danish Agriculture
& Food Council, in June 2016, it was decided to modify the purpose of the project, so the essential goal was to de-
scribe the growth capacity of pathogens during tank storage of RO-water at different temperatures. This was to be
combined with measurement of biochemical parameters with the purpose to identify biochemical markers, which
could be used by the dairy industry to estimate how long time RO-water could be stored at a given temperature with-
out risk of critical growth of pathogens. The work associated with pointing out possible biochemical indicators did sub-
stitute for the work on pointing out bacteria indicators and the development of a qPCR method for detection of those.

8. Projektets baggrund

Vand er en begrænset ressource i Danmark og i store dele af verden. Med en støt stigende befolkning i verden vil
knaphed på rent vand blive en af fremtidens udfordringer. Projektet vil understøtte udviklingen af principper for, hvor-
dan mejerier kan genindvinde vand fra mælk og forøge anvendelsen af recirkuleret vand. Dette vil medføre, at mejeri-
erne vil forbruge mindre grundvand samt reducere udledningen af spildevand.

Specifikt er målet med projektet at risikovurdere genanvendelse af vand på danske mejerivirksomheder og dermed
medvirke til at dokumentere, at en nyudviklet branchekode omkring brug af G/R-vand ikke kompromitterer fødevare-
sikkerheden. Ved at etablere grundlæggende viden om udviklingen i sammensætningen af hele bakterieflo-
raen under proces og lagring af G/R-vand, er målet at udpege indikatorer, der sammen med prædiktive modeller for vækstpoten-
tiale af patogene mikroorganismer, kan bruges som grundlag for at vurdere sikre oplagringstider ved specifikke tem-
peraturer.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Projektet bestod af følgende delaktiviteter:

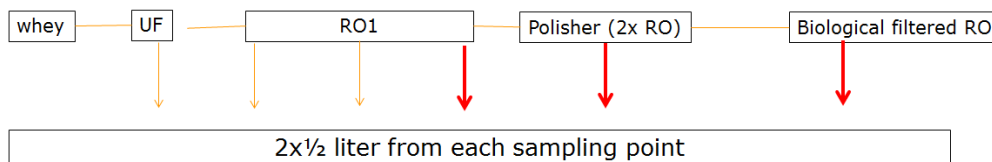
1. Undersøgelse af kimtal i RO-vand fra fire mejerier.
2. Identifikation af potentielle patogener isoleret fra RO-vand.
3. Kortlægning af vækstevne af relevante patogener i RO-vand.
4. Biokemisk karakterisering af RO-vand.
5. Modellering af biokemiske parametres indflydelse på patogeneres vækstevne i RO-vand.
6. Udpegning af mulige biokemiske parametre som markører for patogeneres vækstevne under lagring af RO-vand ved hjælp af maskinlæringsanalyse.

10. Afvigelser

Den ændrede målsætning, der er beskrevet under punkt 7, har ført til et ændret output ift. projektansøgningen. Endvidere afbrød den tilknyttede ph.d.-studerende sit studie og hendes opsigelse har gjort, at projektet ikke bidrager til ph.d.-forskeruddannelse. Imidlertid har der været tre postdocs associeret til projektet, hvorved projektet ad den vej har bidraget til forskeruddannelse.

11. Projektets resultater

Resultater delmål 1: Undersøgelse af kimtal i RO vand fra fire mejerier



Figur 1. Prøveudtagningspunkter i filtreringsprocessen. Gule pile: udtagning til mikrobiologi. Røde pile: udtagning til undersøgelse for vækstunderstøttelse.

Fire mejerier med produktion af forskellige ostetyper indgik i undersøgelsen. Der blev i 2016 udtaget G/R-vand efter ultrafiltrering og ved start, midt og til slut af RO-filtrering (Figur 1). Prøverne blev leveret kølede fra mejerierne og blev analyseret for vækst af den tilstedeværende baggrundsflora ved henstand i 21°C i 5 dage. Alle prøver viste synlig vækst af tilstedeværende bakterier.

Kimtal blev bestemt ved MPN-metode og ved filtrering. Baggrundsfloraen varierede i koncentration og sammensætning mellem mejerier, og data tyder på, at bakterieforekomsten er knyttet til anlægget (husflora) og ikke til fx mangelfuld pasteurisering eller rekontamination fra den rå mælk.

Tabel 1. Eksempel på middeltal i UF-vand og i RO-vand udtaget i starten, midt og slut på dagen fra tre prøvetagningsdage på Mejeri A og B ved filtrering (antal bakterier/ml).

Mejeri A		RO inlet	RO outlet start	RO outlet midt	RO outlet slut
	Mean	1523	382	98	5500
	std dev	1442	608	84	2448
Mejeri B		RO inlet	RO outlet start	RO outlet midt	RO outlet slut
	Mean	1	7	10	12
	std dev	2	9	15	19

Resultater delmål 2: Identifikation af potentielle patogener isoleret fra RO-vand

Efter udpladning på non-selektive plader blev der oprenset DNA fra kolonimateriale og ekstraheret DNA, som blev sendt til 16S-rRNA-gensekventering for at få artsbestemt isolaterne. Samlet blev 55 isolater fra de fire mejerier sekventeret, og undersøgelsen viste, at baggrundsfloraen bestod både af grampositive og gramnegative bakterier. En del af isolaterne tilhørte, eller var nært beslægtet med, Enterobacteriaceae.

Tabel 2. Fordeling af mikroorganismer (%) i mælkevand efter RO-behandling ved start (A) midt (B) og ved slut (C) på arbejdsdagen.

Bakterieslægter / familier	Efter RO behandling		
	A	B	C
Acinetobacter	33	10	
Enterobacteriaceae	67	60	
Enterococcus			4
Kocuria		10	4
Lactococcus		15	
Micrococcus		5	
Pseudomonas			
Staphylococcus			4

Generelt varierede sammensætningen af bakteriefloraen mellem mejerier, men fælles for mejerierne tyder det på, at bakteriefloraen stammer fra bakteriers etablering i anlægget.

Isolater tilhørende Enterobacteriaceae blev helgenom-sekventeret og analyseret i Center of Genomic Epidemiology (CGE).

For *E. coli* fandtes to MLST-typer (ST 540 og ST399). Alle syv *E. coli*-isolater blev analyseret for kendte virulensgener uden fund af toksingener og kendte virulensassocierede adhæsionsgener. De isolerede *E. coli* vurderes på basis heraf som apatogene og sandsynligvis af miljømæssig oprindelse. Ingen af *E. coli*-isolaterne bar kendte antibiotikaresistensgener.

Alle fire *Klebsiella pneumoniae*-isolater havde MLST-type ST2632 og bar antibiotikaresistensgenerne *fosA* *oqx*B *oqx*A *bla*SHV-93. *fosA* koder for fosfomycinresistens, der er udbredt i den gramnegative flora. *oqx*A/B koder for effluxpumper, der giver quinolonresistens og er påvist i kliniske isolater af *K. pneumoniae* (Hosseini et al. 2016). *bla*SVH-93 koder for ESBL-produktion og findes udbredt i den gramnegative flora (Tärnberg et al., 2009). Det er ikke muligt at analysere for virulensgener i *Klebsiella pneumoniae* i CGE VirulenceFinder, hvorfor der blev konstrueret en virulensgenetabase med 58 virulensgener rapporteret i et review af Paczosa og Mecsas (2016). Gensekvenserne blev downloaded fra NCBI's database og forekomst af de 58 virulensgener i tre af de fire RO-isolater blev analyseret med DBFinder i CGE og sammenlignet med forekomsten af generne i to kliniske isolater *K. pneumoniae* scm96 og *K. pneumoniae* 11286. Af de 58 virulensgener påvistes henholdsvis 75 %, 81 % og 74 % i de tre RO-isolater, mens de to kliniske *K. pneumoniae* isolater bar henholdsvis 76 % 67 % af virulensgenerne. Med det store gensammenfald mellem RO-isolater og kliniske isolater vurderes det, at de fundne *Klebsiella pneumoniae* er potentielt patogene. Et virulensgen, *waal*, var fraværende i alle RO-isolater, mens det forekom i begge kliniske isolater. Det vides ikke, om fravær af dette gen i RO-isolaterne vil kunne gøre dem apatogene.

Citrobacter freundii isoleret fra RO-vand husede alle ESBL-genet *bla*_{CMY-51}. ESBL-genet har ikke kunnet findes humant i *Citrobacter freundii* eller andre patogener ved litteratursøgning. Virulensgener i *Citrobacter freundii* er meget sparsomt beskrevet. Ti gener er blevet testet for deres evne til at understøtte blodinfektion i mus ved anvendelse af knockout mutanter (Anderson et al., 2018). Ingen af de ti gener kunne påvises i RO-isolaterne med DBFinder (CGE).

Resultater delmål 3: Kortlægning af vækstevne af relevante patogener i RO-vand ved forskellige lagringstemperaturer

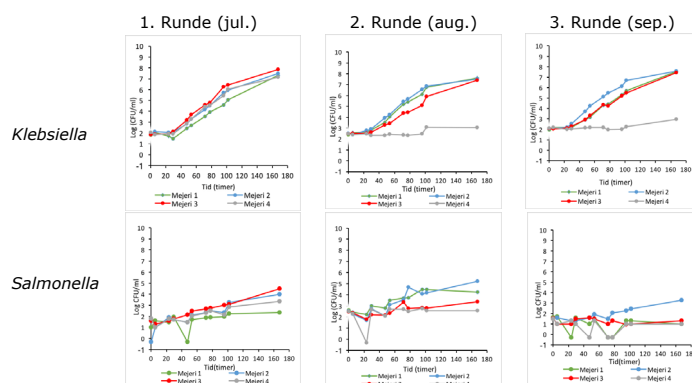
Virksomhederne har oplyst, at lagringstemperaturer for RO-vand lå mellem 7 °C og 28 °C. Med det udgangspunkt blev vækstforsøg for *Salmonella*, VTEC, *Klebsiella*, *Listeria* i RO-vand gennemført ved 10 °C, 20 °C og 30 °C.

Der blev gennemført i alt 48 vækstforsøg på RO-vand; 24 vækstforsøg med samme organismer i hhv. Biobooster-vand og polishervand.

RO-vandet blev udtaget sidst på dagen i fire mejerier over tre prøvetagningsrunder i perioden august til oktober 2017. For at se størst mulig variation blev der analyseret en prøve fra tre forskellige prøvetagningsdage fra hvert RO-anlæg. Der blev podet med en stammecocktail af 3-5 stammer pr. patogen for at inkludere evt. stammevariation. Startkoncentration ved podning var 10²-10³ cfu/ml.

For at kunne afdække patogenernes fulde vækstevne, blev RO-vandet sterilfiltreret for at undgå konkurrerende vækst af anden baggrundsflora.

Vækstevne af *Klebsiella* og *Salmonella* i SF R/O vand for fire mejerier ved 10 °C



Figur 2. Vækstevne ved 10 °C af *Klebsiella* og *Salmonella* i sterilfiltreret RO vand fra fire mejerier (eksempel på vækstforsøg).

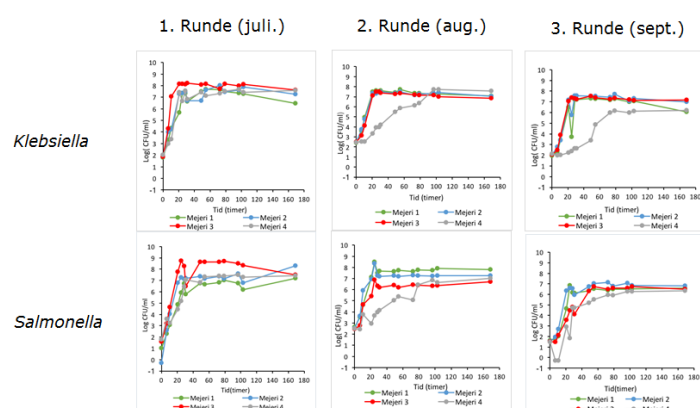
Ved 10 °C sås markant vækst af *Klebsiella* over 7 dage, mens der kun ses en svag stigning i kimtallet for *Salmonella* og VTEC. *Listeria* er psykrotrof og kan vokse under 5°C, men der observeres ingen vækst over de 7 dage.

Den præcise nærings sammensætning i RO-vandet kendes ikke. Apriori forventedes det, at tre væsentlige kilder til vækst kunne være urea, laktose og citrat. Urea fordi det ikke kan bortfiltreres, laktose fordi det er hovedsukkerarten i mælk og citrat fordi det, til tider, anvendes teknisk i produktionen af ost. *Klebsiella* er urease- og laktose-positiv, hvilket kan medvirke til den markante vækst ved alle tre temperaturer. Ingen af de øvrige organismer kan spalte urea. *Salmonella* kan leve af citrat alene, hvilket kan medvirke til at understøtte *Salmonellas* vækst. *Listeria*, ligesom VTEC, er laktose-positiv. I lyset af den generelle markante vækstunderstøttelse ved 20 °C og 30 °C (Figur 3) er det uventet, at *Listeria* ikke viser tegn på vækst over de 7 dage ved 10 °C.

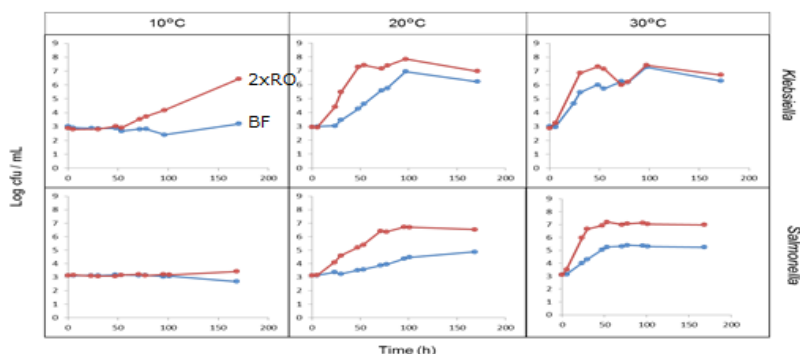
I første og andet halvår 2018 blev vækstforsøgene udvidet med polisher-vand og Biobooster-vand. Dels fordi det er væsentlige vandkilder, som det er vigtigt at få undersøgt, dels fordi der er brug for variation i data for vækstevne for bedre at kunne udpege biokemiske faktorer, som har vækstbegrænsende effekt. I andet halvår 2018 blev der afsluttet vækstforsøg på *Salmonella* og *Klebsiella* (Figur 5) og STEC og *Listeria* ved 10, 20 og 30 °C.

Både polisher-vand og Biobooster-vand har et næringsindhold, der tillader vækst af patogener. Vækstunderstøttelsen er dog mindre, end det generelt ses for RO-vand. I polisher- og Biobooster-vand ses en lavere vækstrate og et lavere maksimum kimtall ved 20 °C og 30 °C, specielt for Biobooster-vand (se eksempel for *Salmonella* og *Klebsiella* i Figur 5).

Vækstevne af *Klebsiella* og *Salmonella* i SF R/O vand for fire mejerier ved 30 °C



Figur 3. Vækstevne ved 30 °C af *Klebsiella* og *Salmonella* i sterilfiltreret RO-vand fra fire mejerier (eksempel).



Figur 4. Vækstevne ved 10, 20 og 30 °C af *Klebsiella* og *Salmonella* i Biobooster-vand (blå) og polisher vand (2x RO) (rød) over 7 dage.

Resultater delmål 4: Biokemisk karakterisering af RO-vand

Hensigten med de biokemiske analyser var, om muligt, at identificere biokemiske værdier, der kan være indikative for patogeners vækstevne i de forskellige vandtyper.

Alle RO-vand, polisher-vand og Biobooster-vandprøver blev analyseret med kommercielle kits for pH, nitrat, nitrogen, urea, COD og fosfat i triplikat. De specifikke kulstofkilder i RO-vandet kendes ikke præcist, men vandtyperne er karakteriseret ved COD og urea. Derfor blev der suppleret med HPLC-analyse for laktose og citrat (in house-metode/Peter Rudahl Jensen). Laktose er medtaget, da det er naturligt til stede, mens citrat er inkluderet, da det evt. kan være brugt procesteknisk.

To mejerier foretog en ekstra RO-behandling (polisher) med en biologisk filtrering (Biobooster-behandling) efter en primær RO-behandling. I Tabel 3 ses, at to RO-behandlinger (polisher) reducerer 4 af 6 parametre (fosfat og urea undtaget). Biobooster-behandling reducerer alle parametre undtagen nitrat.

Tabel 3. Sammenligning af biokemiske parametre for RO vand, polisher-vand og Biobooster-vand fra to mejerier (mg/L).

Mg/L	Nitrate	Chloride	Phosphate	COD	Total nitrogen	Urea
Dairy 3						
Biological filtered	0,9	44	0,05	0	0,9	4
RO water	1,1	337	4,4	988	98	102
Dairy 4						
Polisher	under range	23	17,0	148	34	69
RO water	0,1	95	4,6	3065	145	72

Resultater delmål 5 og 6: Modellering af biokemiske parametres indflydelse på patogeners vækstevne i RO vand

Modellering af "Tid til fire generationer":

Alle vækstkurver blev re-analyseret i ComBase og ud fra estimer for nølefase og vækstrate blev der for hvert af patogenerne *Salmonella*, STEC, *Listeria* og *Klebsiella*, for hver vandprøve, for hver biokemisk parameter og for hver af temperaturerne 10, 20 og 30 °C beregnet "tid til fire generationer" som er illustreret i Figur 5 og defineret som den tid, det tager bakterien at gennemløbe nølefasen og dele sig fire gange. En almindelig regressionsanalyse blev fravalgt til at analysere data til fordel for en analysemetode, der kort fortalt fungerer som en PCA-analyse, der peger systematiske forskelle ud, men kobler den information med sammenhængen til en responsvariabel (her tid til fire generationer).

Udpegning af mulige biokemiske parametre som markører for patogeners vækstevne under lagring af RO-vand ved hjælp af maskinlæringsanalyse:

Der blev gennemført en maskinlæringsanalyse på alle vækstdata for patogenerne og de tilhørende biokemiske parametre i alle RO-polisher- og Biobooster-vandprøver.

Datasættet blev testet med fire forskellige maskinlærings-algoritmer: Gradient Boosting (gbm), Random Forest (rf), Support Vector Machine Regression (svmr) og Support Vector Machine Linear (svml).

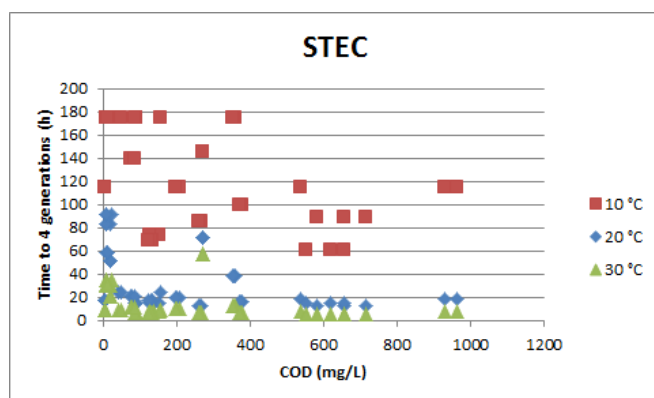
Effekten af de forskellige substrater på "tid til fire generationer" blev samlet analyseret med en linear mixed effect model, som blev fitted til data med temperatur som en random effekt under anvendelse af maximum likelihood function (REML). For at identificere hvilke substrater, der signifikant påvirkede "tid til fire generationer", blev der anvendt type III variansanalyse med Satterthwaites metode til angivelse af antal frihedsgrader. Substrater med signifikant effekt blev anvendt i den videre analyse.

Analyseresultat for substrater med signifikant effekt på "tid til fire generationer":

pH fandtes vigtig for alle fire patogener, mens nitrogen var vigtig for *Salmonella*, *Listeria* og STEC. COD var vigtig for *Listeria*, *Salmonella* og STEC, men ikke for *Klebsiella* antagelig fordi *Klebsiella* kan udnytte urea som kulstofkilde. Fosfat var vigtig for *Listeria* og STEC. At der påvises effekt af urea på *Salmonella* og af laktose på *Listeria* anses som indirekte effekter eller usikkerhed i analysen, da organismerne ikke kan omsætte de pågældende stoffer (Tabel 4).

Ved 10 °C er der ingen af substraterne, der begrænser væksten af de fire organismer. Det skyldes, at der generelt ikke ses vækst.

Ved 20 °C har flere faktorer vækstbegrænsende effekt. Vurderet for hver enkelt parameter har pH den laveste kritiske grænse for *Salmonella* (pH = 5,3). STEC har den laveste kritiske grænse for COD (167 mg/L) og fosfat (2,2 mg/L). For urea har *Klebsiella* den laveste grænse (15 mg/L). For nitrogen har *Klebsiella* den laveste grænse på 6,3 mg/L.



Tabel 4. Grænser for biokemiske parametre(mg/L), der signifikant forlænger "tid til fire generationer" til mere end 24 timer ved 10°C, 20 °C og 30 °C.

Organisme	Substrat (µg/L)	Temperatur (°C)		
		10	20	30
Klebsiella s	Nitrogen	>	6,3	<
	Urea	>	15	>
	pH	>	7,5	9,1
Listeria spp	COD	>	660	380
	Phosphate	>	>	1,72
	Nitrogen	>	>	80
	Lactose	>	>	0,11
	pH*	>	>	>
Salmonella	COD	>	460	<
	Urea	>	78	3
	pH	>	5,3	8,4
STEC spp.	COD	>	167	87
	Phosphate	>	2,2	0,1
	Nitrogen	>	114	<
	pH	>	6,9	7,9

>: vækst indtil fire generationer blev ikke opnået uanset koncentration af substrat.

<: Substratet var ikke vækstbegrænsende, idet væksten oversteg fire generationer ved enhver koncentration af substratet.

Hovedkonklusioner:

- 1) Baggrundsfloraen i RO-vand er som oftest lav og varierer meget mellem virksomheder og med tegn på, at det er etablerede husflora i RO-anlæggene.
- 2) Der er ikke fundet zoonotiske patogener eller indikatororganismer, som kan tyde på direkte overført smitte fra rå mælk som følge af mangelfuld pasteurisering eller efterkontaminering.
- 3) Potentielt patogene *Klebsiella pneumonia* (miljøbakterie) blev påvist i RO-vand.
- 4) Alle vandtyper udviste en betydelig, men varierende, evne til at understøtte bakteriel vækst.
- 5) Vækstforsøgene indikerer, at vækst af patogenerne Salmonella, STEC, Klebsella og Listeria kan undgås i alle tre vandtyper, hvis det opbevares ved højst 10 °C i højst 24 timer.
- 6) Data indikerer, at det måske er muligt at definere grænseværdier for nitrogen, pH og fosfat, der kan sikre, at vandtyperne ikke understøtter vækst ved 20 °C af de udvalgte patogener.
- 7) Et fremtidigt perspektiv er at kunne udvikle et program, der på basis af projektets resultater, kan fortælle virksomhederne, hvor lang tid deres RO-vand kan lagres alt efter oplagringstemperatur og koncentrationerne af nitrogen, pH og fosfat i RO-vand, polisher-vand og Biobooster-vand i forhold til vækst af de mest relevante patogener, der blev undersøgt i dette projekt.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribruget

Det er tidligere beskrevet, at RO-membraner i mejerier kan være kontamineret med bakterielle biofilm (Tang et al. 2009, 2015) og at mikrobiologisk forurening i spildevand, der fødes ind i et RO-anlæg, har betydning for biofilmdannelse i RO-membraner (Isaias, 2001). Så vidt vi ved, er vi de første der artsbestemmer de tilstedeværende bakterier og

kortlægger deres virulens-gener mhp. at estimere en evt. human infektionsrisiko fra disse bakterier. Lagring af RO-vand ved 25 °C har været beskrevet som kritisk og at behandling af vandet indenfor få timer eller køling er nødvendig for at undgå fordærv (Vourch et al., 2008). Der er ikke fundet litteratur, der modellerer sammenhæng mellem indholdsstoffer i RO-vand og holdbarhed under lagring, og vores studium ser ud til at være det første, der anvender en sådan modellering til at forudsige vækst i RO-vand og til at undersøge, om indholdet af de enkelte indholdsstoffer kan anvendes som markører for holdbarhed ved forskellige temperaturer.

Vores projekt har vist, at RO/Biobooster og polisher-behandling af ultrafiltreret valle fører til ubetydelig vækst af patogener over et døgn, hvis vandet opbevares under 10 °C. Vi har også – tilsyneladende som de første – forsøgt at af-dække, om koncentrationen specifikke indholdsstoffer kan anvendes som grænseværdier for sikker opbevaring over 24 timer. Projektet var i stand til at pege på potentielle grænseværdier for nogle af de undersøgte biokemiske parametre. Et perspektiv for et fremtidigt projekt kunne være at udvikle et program, der på basis af projektets resultater kan estimere hvor lang tid virksomheders RO-vand kan lagres alt efter oplagringstemperatur og koncentration af specifikke biokemiske parametre.

Referencer:

- Anderson, MT, Mitchell,,,, LA, Zhao,, L, and Mobley, HLT (2018). *Citrobacter freundii* fitness during bloodstream infection. Scientific reports, DOI:10.1038/s41598-018-301906-0
- Hosseini, SS, Eslami, G, Zandi, H, Vakili, and Mahmoud (2016). Frequency of *oqx*A and *oqx*B plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from urine of inpatients with urinary tract infections in Yazd City, Iran. Journal of Isfahan Medical School, 34, 1211-1217.
- Isaias, N (2001). Experience in reverse osmosis pretreatment. Desalination 139, 57-64.
- Paczosa, MK and Meccas J (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offence with a strong defence. Microbiol. Molecul. Biol. Review. 80, 629-666.
- Tang, X, Flint, SH, Brooks, JD, and Bennett RJ (2009). Factors affecting the attachment of microorganisms isolated from ultrafiltration and reverse osmosis membranes in dairy processing plants. J. Apl. Microbiol. 107, 443-451.
- Tang, X, Flint, S, Bennett, R, Brooks, J, and Zain, SNM (2015). Biofilm contamination of ultrafiltration and reverse osmosis plants. In: Biofilm in the dairy Industry, John Wiley and Sons Ltd.
- Tärnberg, M, Nilsson, LE, Monstein, HJ (2009). Molecular identification of *bla*SHV, *bla*LEN and *bla*OKP β -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* by bi-directional sequencing of universal SP6- and T7-sequence-tagged *bla*SHV-PCR amplicons. Molecular and Cellular Probes, 23, 195-200.
- Vourch, M, Balannec, B, Chaufer, B, and Dorange, G (2008). Treatment of dairy industry waste water by reverse osmosis for water reuse. Desalination, 219, 190-202.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Kongresbidrag:

Maria Hellmér, Tasja Buschardt, Tina Beck Hansen og Søren Aabo (2018). Growth potential of pathogens in reverse osmosis filtrated whey intended for water-reuse in cheese production. Food Micro 2018, Berlin.

Populærvidenskabelige artikler:

Sisse Wagtberg Hansen (2015). Kan vand indvundet fra mejeriprodukter (mælkevand) bruges i mejeriproduktionen? [Mælkeritidende 2015, 24: 8-9.](#)

Diplomingeniøropgaver:

Shene og Sharex Hama-Khoshid (2018): Vækstevne af zoonotiske patogener (E. coli og Listeria) fra kvæg i R/O vand beregnet til genanvendelse på mejerier.

Hatice Kur Cinar og Melike Özkahveci (2018): Vækstevne af zoonotiske patogener (Klebsiella og Salmonella) fra kvæg i R/O vand beregnet til genanvendelse på mejerier.

14. Bidrag til kandidat- og forskeruddannelse

Ph.d.-studerende Sisse Wagtberg Hansen har været tilknyttet projektet det første år. Som afløser for den ph.d.-studerende har postdoc Tasja Buschardt og postdoc Maria Helmer været ansat på projektet. Endelig var postdoc Patrick Murigu Kamau Njage tilknyttet projektet (finansiering fra andet sted).

15. Nye kontakter/projekter

Projektet har været tilknyttet projektet "Vandeffektive Mejerier" under Vandkvalitetsinstituttet og har bidraget til af-rapporteringen af dette projekt. Der er ikke nye projekter tilknyttet dette projekt.

16. Underskrift og dato

Projektet er formelt afsluttet, når projektleder og MFF-repræsentant (fx styregruppeformanden for den respektive styregruppe) har underskrevet slutrapporten.



Dato: 17/3 2021 Projektleders underskrift:



Dato: 26. februar 2021 MFF-repræsentants underskrift: