

# ÖVERLEVNAD AV BETSYSTNEMATODEN *HETERODERA SCHACHTII* UNDER BIOGASPROCESSEN

## 1. Bakgrund

Biogas är en förnyelsebar energikälla som kan användas som fordonsbränsle men också för uppvärmning och produktion av elektricitet. Intresset för tekniken ökar och marknadens expansion styrs av miljöskatter, investeringsstöd, miljömål och förändringar i lagstiftningen. I Sverige märks en tydlig ökning både av antalet biogasanläggningar och i deras kapacitet (Nordberg, 2006) och idag finns ca 225 anläggningar, 120 publika tankstationer och ca 32 000 fordon som drivs på biogas ((Energigas Sverige ([www.energigas.se](http://www.energigas.se)), Fordonsgas ([www.fordonsgas.se](http://www.fordonsgas.se))). Just nu ligger Sverige i frontlinjen vad gäller teknik för biogasproduktion och uppgradering av denna till bränslekvalitet (Börjesson och Mattiasson, 2007). Idag används huvudsakligen olika typer av organiskt avfall för gasproduktion och under 2010 producerades gas motsvarande 1387 GWh, 1,5 Twh/år (ES2010:07). Den teoretiska potentialen har dock beräknats till 14-17 TWh/år (Linné et al 2008) där 80% kommer från lantbrukssektorn i form av gödsel, grödor eller restprodukter från dessa. I Sverige finns därför just nu ett stort intresse att ta in mer material från jordbruket i biogasproduktionskedjan.

I biogasprocessen bevaras och koncentreras näringsämnen vilket gör rötresten till ett utmärkt gödningsmedel. Vid användning av rötrest som gödningsmedel är det viktigt att minimera riskerna med spridning av olika patogena organismer. För att uppnå tillräckligt hög grad av avdödning av humanpatogener görs ofta en sk hygienisering av materialet som ska rötas. Biprodukter från djur hygieniseras enligt EU-föreskrifter (EC 1774/2002, EC 208/2006). Det innebär oftast behandling vid 70 °C i en timme. För grödor eller växtbaserade material som substrat för biogasproduktion krävs idag ingen hygienisering av då de anses innebära en liten risk för spridning av humanpatogener. Hygienisering vid 70°C avdödar många patogener men vissa organismer, t ex sporbildande klostridier och svampar så väl som värmestabila virus, kan överleva hygieniseringen (Bage et al 2005, Schnürer och Schnürer 2006, Sahlström et al 2008, Arthurson, 2009). En alternativ metod för hygienisering är enbart rötning, som i sig själv har en negativ påverkan på överlevnaden av olika patogener. Vanligtvis körs processen antingen vid mesofil (ca 37 °C) eller termofil (ca 55 °C) temperatur och speciellt den högre temperaturen har visat sig ha en positiv effekt på inaktiveringen av olika patogener, både bakterier, svampar och virus (Berg och Berman 1980, Sahlström 2003). Utöver temperaturen kan även kvävehalten under rötningen påverka graden av avdödning. Vid rötning av proteinrika material frigörs ammonium/ammoniak, som i tillräckligt höga halter visats ha en avdödande effekt på bakteriella patogener (Ottoson et al 2008). För att få en god hygieniseringseffekt med enbart rötning krävs emellertid behandling under en längre tid än vid upphettning till 70°C. Idag körs de flesta storskaliga biogasprocesser i Sverige kontinuerligt (sk CSTR reaktorer), dvs matning och uttag görs flera gånger per dag, varför tiden i röt-kammaren då kan bli för kort för att nå tillfredsställande hygienisk kvalitet. För att nå motsvarande grad av hygienisering som vid 70 °C i 1 timma krävs t.ex. minst 10 timmar mellan vid 52°C, dvs tiden mellan inmatningarna i processen måste vara minst 10 timmar (Jordbruksverket. Rötning av animaliska biprodukter, 20110921). För att kunna ta fram rekommendationer för matningsfrekvens och retentionstider för en optimal reduktion av antalet patogener behöver avdödningstider för viktiga grupper av patogener bestämmas. Detta har gjorts för många viktiga human- och djurpatogener medan växtpatogener är betydligt mindre studerade. Noble et al (2009) har sammanfattat resultaten från studier av överlevanden av värmebehandling av olika växtpatogener (bakterier, virus, svampar, oomyceter och

slemsvampar) i system som skall efterlikna kompostering. Resultaten från sådana studier kan emellertid inte direkt jämföras med kontinuerligt körda biogasreaktorer eftersom uppehållstiden är så kort. Komposteringsprocessen sker också, till skillnad från rötning, i närvaro av syre, vilket ev också kan ha en inverkan på överlevnaden. Överlevnad av växtpatogener under rötning har endast tidigare studerats av Termorshuizen et al (2003) i ett satsvist system under mesofila förhållanden. Studien visade att de flesta studerade patogener var avdödade efter 21 dagars rötning. Då tiden mellan inmatningar i kontinuerliga biogasanläggningarna är betydligt kortare än så (oftast bara några timmar) är det därför troligt att flera olika patogener kommer överleva och återfinnas i rötresten. Emellertid är odlingssäsongen i Sverige relativt kort vilket betyder att rötresten måste lagras innan den används som gödselmedel. Denna lagring sker normalt aerobt i stora tankar. En tidigare studie vid institutionen visade att avdödningen av svampsporer försätter under denna tid. Det är därför möjligt att lagring under en viss tid kan säkerställa god hygienisk kvalitet även om avdödning innan eller under rötning inte är fullständig (Schnürer and Schnürer 2006).

Användning av jordbruksgrödor i biogasproduktionen förväntas öka och en av de grödor som är intressanta för rötning är sockerbetor eftersom den ger ett högt utbyte per hektar och har en hög metanproduktionspotential. Om rötresten skall användas som gödselmedel är dock viktigt att inte några patogener som orsakar sjukdom hos sockerbetor finns kvar i rötresten då detta kan leda till en oönskad spridning av dessa till fält som tidigare varit fria från patogenen. En sådan riskorganism är den vita betcystnematoden *Heterodera schachtii* som bildar motståndskraftiga cystor, vilka kan överleva flera decennier i jorden. Tidigare studier i USA har visat att cystor av *H. schachtii* kan överleva passage genom tarmsystemet hos nötdjur och även överleva i ett ökenliknande klimat vid temperaturer upp till 65 °C (Kontaxis et al 1976). Detta indikerar att det är möjligt att Betcystnematoden skulle kunna överleva rötning, speciellt om uppehållstiden i reaktorn är kort.

Syftet med denna studie var att undersöka huruvida inaktiveringen vid rötning av cystformen av betcystnematoden är tillräcklig för att rötresten ska kunna användas som gödselmedel utan risk för spridning av patogenen.

## 2. Material och metoder

### 2.1 Material

Cystor av betcystnematoden *Heterodera schachtii* köptes från HZPC Holland B.V. (Metslawier, Holland) vid tre tillfällen under 2010, 9/6, 7/9 och 12/10. Cystorna förvarades vid +4 °C tills de användes. Sockerbetsfröer av en känslig sort erhöles från Britt-Louise Lennefors, Syngenta Seeds AB, Landskrona, Sverige. Påsar med maskstorlek 210 µm tillverkades av SEFAR POLYPYLTEX (Bigman AB, Sundyberg, Sverige). Denna maskstorlek håller kvar cystor men är tillräckligt stor för att larver skall kunna lämna påsen. För att förenkla borttvättningen av rötrest efter behandling användes dubbla påsar (inre 3×3 cm och yttre 4×4 cm).

Sandjord var åkerjord från, Ärentuna, (Storvreta) och förvarades vid + 4 °C. Precis före användning autoklaverades jorden 2 ggr vid 120 °C med 48 h mellanrum. Jorden blandades med 2 delar sand (0,5 mm från Råda Sand AB, Linköping, Sverige).

De substrat som användes beskrivs i Tabell 1.

Försök	Anläggning	pH	Kvävehalt g/L (TAN)	Körs huvudsakligen på
Infektionsstudie + tidsstudie	Sötåsen	7,8	2,0	Nötgödsel
Infektionsstudie + tidsstudie	Hagavik	8,1	5,2	Höns gödsel, stärkelse samt rester från bageri
Hygienisering	Uppsala	6,9	2,5	Källsorterat hushållsavfall

Räkning av frigjorda larver gjordes i en egenkonstruerad räknecammare. Denna bestod av den sexhåls-platta med 2 cm stora brunnar. Under botten fästes ett genomskinligt rutnät med 0,5 × 0,5 cm stora numrerade rutor. Räkningen gjordes i ett mikroskop med omvänd faskontrast (Olympus) under 40x förstoring.

### 2.2 Överlevnad under rötning i modellreaktorer

Påsar innehållande ca 200 cystor placerades i 100 ml röt-kammarmaterial i 300 ml glasflaskor (två flaskor med material från olika anläggningar i de olika flaskorna) vilka, efter att ha fyllts med N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20%), förslöts med en gummiprop och aluminiumkork. Proppen perforerades med en kanyl kopplad till en påse för uppsamling av den gas som producerades (Bild 1). Flaskorna inkuberades vid 37 °C under skakning (130 rpm). Under tidsstudien öppnades flaskorna vid de tidpunkter som visas i tabell 2 och två påsar togs ut varefter flaskan åter fylldes med gas och förslöts. I infektionsstudien inkuberades påsar på liknande sätt men flaskorna öppnades då först efter 20 dagar. Den yttre påsen togs bort och den inre sköljdes noga i avjoniserat vatten innan kläckning respektive infektionsförmåga undersöktes.



Bild 1. Modellreaktorer med 300 ml substrat och modifierad atmosfär (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). Reaktorerna försågs med en påse för uppsamling av bildad gas.

### 2.3 Överlevnad under hygienisering av rötresten

För att undersöka effekten av olika hygieniseringsmetoder, dvs upphettning 70 °C under en timma eller upphettning till 52 °C under 10 timmar, placerades påsar med cystor i ett slutet kärl med röt-kammarmaterial som upphettades till 52 °C resp 70 °C. Behandlingen pågick sedan i vattenbad vid 70 °C under en timme med omrörning eller vid 52 °C under 10 timmar under skakning. Kläckning *in vitro* följdes sedan under 10 veckor.

#### 2.4 Överlevnad under aerob lagring

För att simulera förhållandena under aerob lagring efter rötning placerades påsar med cystor i plastkärll med 100 ml rötrest vid 10 och 25 °C under en och två veckor. För att förhindra avdunstning placerades kärnen i plastpåsar med ett fuktigt papper.

#### 2.5 Detektion av överlevnad genom in vitro kläckning

De väl tvättade påsarna placerades i 10 ml ZnCl<sub>2</sub> (Clarke and Shepherd 1966, Greet 1974) och inkuberades vid 25 °C under 10 veckor. En gång i veckan byttes lösningen och antalet larver räknades. Kläckning in vitro följdes sedan under 10 veckor.

#### 2.6 Detektion genom infektion av sockerbetsplantor

Sockerbetsfröer såddes i en blandning av två delar sand en del sandjord. Tjugofem stycken en vecka gamla plantor flyttades till 13 × 13 cm stora krukor innehållande samma jordblandning med eller utan cystor. All odling skedde vid 25 °C vid en luftfuktighet av ca 90% och med 12 timmars ljus och 12 timmars mörker. Första veckan vattnades plantorna dagligen med kranvatten och därefter med ”Wallco växtnäring 51-10-43 + mikro” (Cederroths International AB, Falun) spädd 500 ggr. Påsarna med cystor, inkuberade i rötkammarinnehåll under 20 dagar, öppnades och slammades i 15 ml avjoniserat vatten, vattnades ut jämnt i en kruka. Cystorna täcktes sedan med ca 2 cm jordblandning varefter 25 sockerbetsplantor planterades i krukorna (4 replika krukor med 25 plantor i varje). Obehandlade cystor användes som positiv kontroll (4 replikat) och vatten som negativ kontroll (4 replikat).

Efter 30 dygn, motsvarande 360 daggrader, undersöktes 50 plantor för närvaro av vita cystor på rotsystemet. Jorden vattnades igenom ordentligt och fick stå i några timmar. Därefter sköljdes jorden försiktigt av från rötterna. Rotsystemet studerades sedan under lupp och förekomst eller frånvaron av vita cystor noterades. För att säkert kunna säga att frånvaron av cystor vid denna tidpunkt inte berodde på en fördröjning av kläckningen till följd av behandlingen studerades ytterligare 15 plantor i veckan från den negativa kontrollen och krukor med tillsats av rötade cystor under de tre följande veckorna.

### 3. Resultat

#### 3.1 Förstudier

Innan rötningstudierna inleddes gjordes en förstudie av kläckning i ZnCl<sub>2</sub>. I denna undersöktes den tid som krävdes för kläckning, hur länge nya larver frigjordes samt hur dessa bäst kvantifierades. Det bästa sättet visade sig vara räkning i en egenkonstruerad räknekammare som kunde scannas av och larverna räknas ruta för ruta (bild 2). Larvernas rörlighet var begränsad och de flyttade sig sällan mellan rutorna. De flesta larverna kläcktes inom ett par veckor och inkubering under tio veckor bedömdes som tillräckligt och valdes för de vidare studierna.

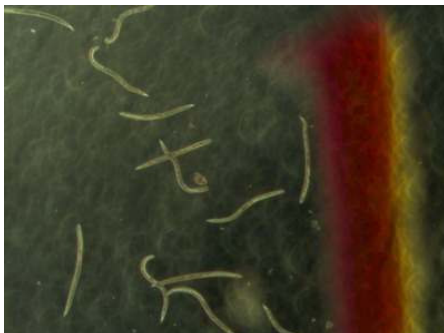


Bild 2. Frigjorda larver i del av en numrerad ruta i den egenkonstruerade räknekammaren.

I en annan förstudie undersöktes lämplig tid för detektion av infektion av sockerbetsplantor. Enligt litteraturen tar en infektionscykel ca 465 daggrader, dvs ca 39 dygn vid odling vid 20 °C. (Antalet daggrader fås genom addera den genomsnittliga dagliga temperaturen som överstiger +8°C vilket ger  $465 = x \times (20 - 8)$ ). Sockerbetsplantor skördades dagligen från 25 till 40 dygn efter plantering av plantor till jordinnehallande obehandlade cystor. Förekomsten av vita oocystor på rötterna studerades (bild 3) och efter 30 dygn, motsvarande 360 daggrader, bedömdes som lagom tid under de odlingsbetingelser som användes. Efter detta började cystorna bli bruna och lossnade lättare från rötterna vilket ökade risken för att de skulle sköljas bort med jorden. Ingen skillnad, t ex i storlek eller färg, sågs mellan infekterade och oinfekterade plantor på det här stadiet.



Bild 3. Rotsystem från en ung sockerbetsplanta. Cystorna ses som vita klumpar på rothåren.

### 3.2 Rötning med material från Hagavik- och Sötåsens biogasanläggningar

Den andra leveransen av cystor användes för en infektionsstudie och *in vitro*-kläckning i 3 mM ZnCl<sub>2</sub> med röt-kammarmaterial från två olika biogasanläggningar, Hagavik och Sötåsen, för att undersöka huruvida kvävehalten i rötresten påverkade eventuell avdödning av cystorna. Båda dessa anläggningar drivs vid 37 °C men på olika substrat, vilket medför olika kvävehalt då det är känt att det ammonium som bildas från kväverikt material i reaktorn kan ha en avdödande effekt på olika organismer. Reaktorn i Hagavik körs på bland annat bageriavfall, hönsavfall och ren stärkelse från en stärkelsefabrik och hade en hög kvävehalt. Reaktorn i Sötåsen matas huvudsakligen med nötgödsel och hade därför låg kvävehalt. Från *in vitro*-kläckningsstudien stod det efter ett par veckor klart att cystorna inte kläcktes på samma sätt som under förstudien. Detta bekräftades också i den parallella infektionsstudien där sockerbetsplantor skördades från dag 25 till dag 40 men där inga cystor kunde ses i den positiva kontrollen, varför försöket avbröts. Enligt leverantören kläcktes cystorna från denna batch normalt hos dem så misstanke finns att något hänt under transporten. Denna studie gav alltså inget resultat. En ny omgång cystor beställdes och infektionsstudien startades om med en rötrest (Sötåsen) medan *in vitro*-kläckningen upprepades med båda rötresterna.

#### 3.2.1 Infektionsstudie med rötrest från Sötåsen

Efter 30 dygn, dvs 360 daggrader, var 100% av rötterna på de plantor som odlats i närvaro av obehandlade cystor infekterade, dvs vita cystor kunde ses i alla rotsystem. På i den negativa kontrollen sågs inga cystor och inte heller på de som odlats i närvaro av cystor som inkuberats i satsvisa biogasprocesser. Plantor från de två senare studerades en gång i veckan under

ytterligare tre veckor utan att några cystor kunde ses. Efter rötning i 20 dagar fanns alltså inga infektiösa cystor kvar.

### 3.2.2 *In vitro*-kläckning

Kläckningen *in vitro* av cystor rötade i olika lång tid visas i tabell 2.

Tabell 2: Avdödning av cystor under tid i två olika substrat. Siffrorna anger totala antalet larver framkläckta under **fem** veckor (medel av två replikat) då primärdata för den fem följande veckorna saknas.

	0h	2h	4h	6h	8h	24h	48h	1 vecka
<b>Sötåsen</b>	>2500	1952	>2500	464	526	26	57	0
<b>Hagavik</b>	>2500	1220	307	68	4	9	7	0

### 3.3 Överlevnad under hygienisering

Överlevnad under hygienisering gjordes enligt Jordbruksverkets riktlinjer för animaliska biprodukter (Jordbruksverket. Rötning av animaliska biprodukter, 20110921) med en rötrest från Kungsängens biogasanläggning i Uppsala. Både hygienisering vid 70 °C i en timme och vid 52 °C i 10 timmar ledde till en total avdödning då inga larver sågs under de tio veckor som kläckningen följdes. Under samma period räknades >2500 larver från obehandlade cystor.

### 3.4 Överlevnad under aerob lagring

För att simulera förhållandena under aerob lagring efter rötning placerades påsar med cystor i rötrest (Kungsängen) vid 10 och 25 °C under en och två veckor. Efter lagring vid 25 °C sågs ingen kläckning, varken efter en eller två veckor. Vid 10 °C sågs totalt 10 larver efter en veckas lagring och fyra larver efter två veckors lagring.

## 4. Diskussion

Resultaten visar att cystor av betcystnematoden inaktiveras under rötning men att avdödningen är tidsberoende. För båda de undersökta rötresterna var cystorna helt inaktiverade efter 1 veckas rötning i en satsvis process. Inaktiveringen började redan efter ett par timmar och gick snabbare i substratet från Hagavik med en högre kvävehalt än i det från Sötåsen med en lägre kvävehalt. Detta antyder att kvävehalten kan ha en effekt på inaktiveringen. För att säkerställa detta samband behöver dock fler studier utföras med material från flera olika anläggningar. Rötning med sockerbetor som enda material för biogasproduktion är svårt då dessa har för lågt innehåll av kväve för att tillåta tillväxt av de olika organismer som är aktiva i biogasprocessen. Därför tillämpas bäst sk samrötning när sockerbetor används. Om höga kvävehalter är positiva för avdödningen av betcystnematoden är det t ex av vikt att utreda om sockerbetsmaterial, infekterat med betcystnematoden, borde blandas med en viss typ av restmaterial, dvs proteinrikt, än ett annat om man vill ha en rötrest som utgör ett säkert gödselmedel.

Tiden mellan matningarna i en storskalig röttkammare är betydlig kortare än en vecka, snarare mellan ca 3-6 timmar. Det betyder att rötrest som ska används som biogödsel skulle kunna innehålla levande cystor, vilka skulle kunna kläckas i jorden och infektera känsliga grödor. Därför undersöktes även hur lagring av rötresten påverkar inaktiveringen. Två olika temperaturer, 10 och 25 °C valdes för att simulera olika årstider. Vid lagring vid 25 °C var cystorna helt inaktiverade redan efter en vecka. Vid 10 °C kläcktes totalt tio larver fram efter

lagring i en vecka och fyra efter lagring i två veckor. Värt att notera är att lagringsförsöken gjordes med ”rötade” cystor, dvs cystorna var helt intakta, medan cystorna i verkligheten först skulle ha rötats vilket troligen skulle ha gjort dem mer känsliga.

Hygienisering av infekterat material enligt Jordbruksverkets riktlinjer för biprodukter av animaliskt ursprung gav en total avdödning av cystorna. Idag hygieniseras dock inte växtmaterial men det skulle kunna vara en möjlighet, om än energikrävande och kostsam, om man vill uppnå en rötrest som inte innehåller denna typ av växtpatogener.

## 5. Slutsatser

Betcystnematoden *Heterodera schachtii*s cystform inaktiveras under rötning och tiden som krävs för inaktivering tycks vara beroende av halten av kväve i processen. Oberoende av kvävehalt står det klart emellertid klart att i kontinuerliga biogasprocesser, med inmatning flera gånger per dygn, är tiden i rötammaren för kort för att en fullständig inaktivering ska uppnås. Resultaten i denna studie visar dock att även aerob lagring har en inaktiverande effekt. Lagring av rötresten i två veckor vid en temperatur av minst 10 °C verkar vara tillräckligt för att ge en total inaktivering. Det bör alltså inte vara något problem att sprida rötrest från rötning av infekterat material såvida rötresten lagras en tid innan spridningen.

## 6. Referenser

- Arturson, V (2009). Closing the Global Energy and Nutrient Cycles through Application of Biogas Residue to Agricultural Land – Potential Benefits and Drawbacks. *Energies* 2: 226-242.
- Bagge, E., Sahlström, L. and Albiñ, A. 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Res.* 39: 4879-4886..
- Berg, G. and Berman, D. 1980. Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludge. *Appl Environ Microbiol.* 39: 361-368.
- Börjesson, P. and Mattiasson, B. 2008. Biogas as a resource-efficient vehicle fuel. *Trends Biotechnol.* 26:7-13.
- Clarke A.J. and Shepherd, A.M. 1966. Inorganic ions and the hatching of *Heterodera* spp. *Ann Appl Biol.* 58:497-508.
- ES2010.07 Produktion och användning av biogas år 2010. Energimyndigheten
- Greet, D.N. 1974. The response of five round cyst nematodes (*Heteroderidae*) to five artificial hatchinh agents. *Nematodologica* 20:363-364.
- Kontaxis, D.G., Lofgreen, G.P., Thomason, I.J. and McKinney, H.E. 1976. Survival of the sugarbeet cyst nematode in the alimentary canal of cattle. *California Agriculture* 30:15.
- Linné et al, 2008 Biogas produktion från inhemska råvaror. Rapport från Avfall Sverige 2008:02.
- Noble, R., Elphinstone, J.G., Sansford, C.E., Budge, G.E. and Henry, C.M. 2009. Management of plant health risk associated processing of plant-based wastes: A review. *Bioresource technol.* 100: 3431–3446.
- Ottosson, J.R., Schnürer, A. and Vinnerås, B. 2008. In situ production as a sanitation agent during anaerobic digestion at mesophilic temperature. *Lett Appl Microbiol.* 46: 325-330.
- Sahlström, L. 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresouce Technol.* 87: 161-166.

- Sahlström, L., BAgge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.-L. and Albiñ, A. 2008. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. *Bioresource Technol.* 99: 7859-7865.
- Schnürer, A. and Schnürer, J. 2006. Fungal survival during anaerobic digestion of organic household waste. *Waste Manag.* 26:1205.
- Ternorshuizen, A.J., Volker, D., Blok, E.J., ten Brummeler, T., Hattog, B.J.,Janse, J.D., Knol, W. and Wenneker, M. 2003. Survival of human and plant pathogens during anerobic digestion of vegetable, fruit and garden waste. *Euro J Soil Biol.* 39; 165-171.

## 7. Publikationer

**Överlever den vita betcystnematoden i en biogasprocess?** Karin Jacobsson och Anna Schnürer, Institutionen för mikrobiologi, Sveriges Lantbruksuniversitet. Accepterade för publicering i *Betodlare*, troligtvis nr 3 2012.