

Resultater af mikrobiologisk undersøgelse af damp-behandlede arealer ved Hedehusene

Rapport for prøvetagning 2003

Mikkel Bender, Susanne Elmholt, Anne Mette Madsen
og Carsten Suhr Jacobsen



Resultater af mikrobiologisk undersøgelse af damp-behandlede arealer ved Hedehusene

Rapport for prøvetagning 2003

Mikkel Bender, Susanne Elmholt, Anne Mette Madsen
og Carsten Suhr Jacobsen

Resultater af mikrobiologisk undersøgelse af damp-behandlede arealer ved Hedehusene

Rapport for prøvetagning 2003

Mikkel Bender¹, Susanne Elmholt², Anne Mette Madsen³ og Carsten Suhr Jacobsen¹

1: Danmark og Grønlands Geologiske Undersøgelse

2: Danmarks JordbrugsForskning

3: Arbejds miljøinstituttet

Resume	3
Baggrund	5
Materialer og metoder	7
Prøvetagning	7
Jordboende bakterie	8
Kolonidannende enheder (CFU) på 1/10 TSA og Goulds S1:	8
"Community level physiological profiling"- inokulering af Biolog Ecoplates:	8
Statistisk analyse	8
Jordboende svampe	9
Indledende svampeundersøgelser ved t=1 og t=2	9
Svampeundersøgelser ved t=3 t=4 og t=5	9
Luftbårne svampe samt svampe på vegetation	10
Sampling og kvantificering af luftbårne <i>A. fumigatus</i>	10
Tilstedeværelse af <i>A. fumigatus</i> på blade på jordoverfladen/græsplæne	10
Resultater bakterier	12
Kolonidannende enheder (CFU) på 1/10 TSA ved 20°C og 42°C (t=0 til t=4)	12
Kolonidannende enheder (CFU) på Goulds S1 ved 20°C og 42°C (t=0 til t=4)	15
"Community level physiological profile" på Biolog Ecoplates ved 20°C og 42°C (t=0 til t=5)	17
Resultater jordboende svampe	20
Resultater luftbårne svampe samt svampe på vegetation	24
Konklusioner og anbefalinger	27
Referencer	29

Resume

Nærværende rapport er resultat af et projekt udført for Københavns Amt. Projektet er en opfølgning på et projekt finansieret af Miljøstyrelsens teknologipulje, der har undersøgt en række biologiske og jordfysiske effekter af termisk assisteret jordrensning. Undersøgelserne i nærværende rapport har alene fokuseret på mikrobiologiske aspekter af den termisk assisterede jordrensning. Rapporten er udfærdiget i et samarbejde mellem Mikkel Bender og Carsten Suhr Jacobsen (GEUS), Anne Mette Madsen (AMI) samt Susanne Elmholt (DJF).

Oprensning af chlorerede opløsningsmidler på arealet ved Hedehusene ved hjælp af damp-injektion blev påbegyndt efteråret 2001 og afsluttet marts 2002. Under denne proces opvarmes jorden til ca. 100°C i nederste jordlag og til mellem 30°C og 40°C i overfladen. Denne påvirkning førte til fremvækst af en varmetolerant mikrobiel population, og blandt de mange forskellige varmetolerante organismer, der blev isoleret, var der flere potentielt patogene organismer. Disse organismer, der ikke blev fundet i jorden før damppåvirkning (11. september 2001), blev fundet i foråret 2002, og de var stadig tilstede i stort tal i prøver fra udtagningen i september 2002. For yderligere oplysninger om lokalitet og oprensningmetoder samt umiddelbare effekter af oprensningen på de biologiske processer på arealerne henvises der til kommende rapport fra det afsluttede projekt under Miljøstyrelsens teknologipulje.

For at undersøge om disse varmetolerante organismer og potentielle patogener stadig var at finde på arealerne efter mere end et års normale temperaturforhold, blev nye prøver udtaget 15. marts 2003, 20. maj 2003 samt 18. november 2003. Ved prøvetagningen den 18. november blev der endvidere indsamlet luftprøver og den 7. december 2003 blev der indsamlet bladprøver for måling af forekomst af *Aspergillus fumigatus* sporer over jorden.

Resultaterne fra disse prøver viser, at antallet af varmetolerante mikroorganismer stadig er meget højere i jorden end normalt, men at der er færre forskellige typer af varmetolerante mikroorganismer. Denne nedgang i antal typer er målt som et fald i den funktionelle diversitet af den varmetolerante mikroflora (det mikrobiologiske samfunds evne til at vokse på forskellige kulstofkilder, undersøgt på Biolog Ecoplates). Yderligere har vi påvist, at antallet af de potentielt patogene bakterier, der er blevet undersøgt (varmetolerante *Pseudomonas* spp., herunder *Pseudomonas aeruginosa*), er faldet markant og ligger under detektionsgrænsen ligesom før varmebehandling. Svampen *Aspergillus fumigatus* findes stadig i markant højere niveauer i de dampbehandlede jorde end i referenceprøven. Dette kan skyldes, at svampen har etableret sig stærkt i jorden og derved stadig, på trods af tilbagevenden til normale temperaturforhold, har en konkurrencemæssig fordel sammenlignet med den øvrige mikroflora.

Mikroorganismer danner i varierende omfang hvileformer. *A. fumigatus* er en svamp der danner meget holdbare sporer, der vides at kunne ligge i en naturlig jord i årevis uden at spire. Denne egenskab betyder også, at en detektion af sporer af *A. fumigatus* ikke behøver at betyde, at svampen stadig er aktiv i jorden. Bakterien *P. aeruginosa* danner derimod ikke egentlige hvileformer, så en detektion af denne mikroorganisme i jord, tyder på et miljø hvor de varmetolerante mikroorganismer generelt har en konkurrencefordel. Omvendt tolker vi et fald i antallet af *P. aeruginosa* som et følsomt mål for fald i vækst af mikroorganismer, der har en særlig konkurrencefordel som følge af de omgivende temperaturer.

Måling af lufprøver for *A. fumigatus* i november viste ingen forekomst af luftbårne sporer, hverken over kontroljorden eller over den dampbehandlede jord. En indsamling af bladprøver og efterfølgende analyse påviste sporer af *A. fumigatus* både på græsprøver over den dampbehandlede jord og over kontrol jorden. Undersøgelserne fandt *A. fumigatus* på flere bladprøver over behandlet jord (70%) end over kontroljorden (43%). De replikate grupper af bladprøver fra de forskellige prøvesteder udviser imidlertid en betragtelig variation. Da der ikke foreligger prøver af luft eller blade tidligere i undersøgelsesforløbet, er det vanskeligt at vurdere om der foreligger en forhøjet eller en normal situation.

Sammenfattende viser undersøgelserne, at dampbehandling af jord vil medføre en stor ændring af de mikrobielle samfund, i retning af flere bakterier og svampe, der kan vokse ved 42°C. Økosystemet forventes at vende gradvist tilbage til noget tæt på udgangspunktet, som det ses med den potentielt patogene bakterie *P. aeruginosa*, der ikke mere kan findes i jorden. Dog må det forventes, at mikroorganismer med hårdføre hvilestadier kan overleve igennem længere perioder.

Baggrund

Klorerede opløsningsmidler er et stort problem på en lang række forurenede grunde i Danmark. Den vertikale spredning af klorerede opløsningsmidler standses ofte af lavpermeable jordlag, hvor stofferne diffunderer ind i revner og sprækker. Traditionelle oprensningemetoder til brug *in situ* er ofte utilstrækkelige til en hurtig og effektiv oprensning. En lovende og effektiv *in situ* oprensningstype er termisk assisteret oprensning, f.eks. en kombination af dampinjektion og vakuumsug samt oppumpning af vand. Ved brug af denne metode er det således også muligt at bortskaffe disse stoffer fra svært tilgængelige områder f.eks. i dybtliggende jordlag eller jord under bebyggede områder uden at fjerne jorden.

Længere tids *in situ* opvarmning af jord kan potentielt have en række økotoxikologiske og humant toksikologiske effekter, idet det er sandsynligt at en sådan behandling vil kunne ændre væsentligt på sammensætningen af det mikrobielle samfund i jorden. Naturlige mikrobielle populationer, der udsættes for hurtige og markante temperaturstigninger, som f.eks. ved geothermale begivenheder eller kompostering, adapterer generelt til de nye omgivelser ved hurtige skift i struktur og artssammensætning (Norris et al., 2002, Dees and Ghiorse, 2001). Det er således kendt at sporer fra varme-resistente sporedannende bakterier kan spire ved varme påvirkning (Curran and Evans, 1945), samt at mange svampetyper fra jord generelt kan tolerere og gro ved høje temperaturer (Jesenska et al., 1993). Således vil en fremvækst af thermotolerante og thermofile mikroorganismer ved termisk assisteret oprensning forventes. Thermotolerante og thermofile mikrobielle samfund må generelt forventes at udgøre en vis risiko ved at indeholde en større mængde potentielt humant patogene bakterier og bakteriestammer.

Viden om effekterne på de mikrobielle samfund ved damp-remediering er yderst sparsom, og vi har således kun fundet en enkelt undersøgelse (Richardson et al., 2002). Denne observerer signifikante ændringer under remedieringen men en hurtig tilbagevenden til den naturlige samfundsstruktur efter remedieringens afslutning. Forfatterne har dog valgt at fokusere meget bredt på de mikrobielle samfunds aktivitet samt indhold af bakterier generelt ved mikroskopi og direkte tællinger hvorved eventuelle ændringer i sammensætning og temperaturtolerance ikke detekteres. Formålet med dette projekt har derfor været - med fokus på generel temperaturtolerance samt de potentielt patogene organismer *Aspergillus fumigatus* og *Pseudomonas aeruginosa* - at følge udviklingen i de mikrobiologiske samfund under tilbagevenden til "naturlige" tilstande efter afslutning af damp-remediering.

Eksposering af menneskets luftveje med *A. fumigatus* sporer er af interesse i relation til helbred. Som en del andre svampe danner den inhalerbare sporer, der er kilde til allergener som spiller en rolle i udvikling af f.eks. tærskerlunger og landmandslunger (f.eks. Yocum et al., 1976). *A. fumigatus*

sporer indeholder, som andre svampe, β -glucan, der tilsyneladende kan forårsage ikke-allergisk respirationssymptomer. Eksponering for svampesporer er i den senere tid i epidemiologiske studier også set at være forbundet med øjenirritation (e.g. Eduard et al., 2001). Endelig kan *Aspergillus fumigatus* forårsage infektion hos svækkede personer.

Partikler med en aerodynamisk diameter under $10\mu\text{m}$ er inhalerbare. Diameteren af *A. fumigatus* sporer kan variere med luftfugtighed og isolatets oprindelse (Leslie et al., 1988; Madelin and Johnson, 1992) og den aerodynamiske diameter af *A. fumigatus* sporer er beskrevet til at variere mellem 2.2 og $3.9\mu\text{m}$ (Leslie et al., 1988). Sporer af denne størrelse kan passere de øvre luftveje og trænge ind i de nedre luftveje i alveolerne, hvor de deponeres imellem to indåndinger. De partikler, der kommer ned i alveolerne, kan kun fjernes ved at gå i opløsning (hvis de er opløselige) eller ved at blive fagocyterede. Denne sidste proces kan være meget langsom – ifølge Midtgård et al. (1999) er halveringstiden typisk 60 dage. Derfor vil partikler som *A. fumigatus* sporer kunne genere de nedre luftveje i længere tid selv om de hos ikke-svækkede personer ikke er i stand til at inficere lungerne.

β -glucan er en del af svampecellevægge. Flere epidemiologiske studier og laboratorie forsøg har vist sammenhæng mellem eksponeringsniveau for β -glucan og effekter på luftvejene (f.eks. Thorn et al., 2001; Alwis et al., 1999). Hvis støv f.eks. tilsættes (spikes med) β -glucan kan det øge nasal inflammation i forsøgspersoner eksponeret for støv (Sigsgaard et al., 2003). Således tyder mange studier på, at β -glucan spiller en rolle i respirations-symptomer, og således er eksponering for *A. fumigatus* også af betydning som kilde til eksponering for β -glucan.

Materialer og metoder

Prøvetagning

Prøver blev udtaget før dampremediering den 11. september 2001 (t=0), under dampremediering den 15. marts 2002 (t=1), efter dampremediering den 19. september 2002 (t=2), den 17. marts 2003 (t=3), den 20. maj 2003 (t=4) samt den 18. november 2003 (t=5). Overfladejord (jord udtaget umiddelbart under jordoverfladen) samt "underjord" (udtaget fra ca. 40 cm dybde) blev udtaget ved udsugningsbrønde 140, 141 og 142 (dampbehandlet område) samt ved et lignende område ca. 50 m fra nærmeste udsugningsbrønd.

I det følgende refererer prøve 1, 2 og 3 til dampbehandlet overfladejord, og 5, 6 og 7 til dampbehandlet "underjord". Prøve 4 og 8 refererer til henholdsvis overfladejord og "underjord" fra referenceområdet.

Jordprøver af ca. 200 g blev udtaget med jordbor og overført til forseglede plastposer. Jordbor samt yderligere anvendte værktøjer blev rengjort mellem hver prøveudtagning. For at undgå forurening blev prøveudtagning først foretaget i reference området inden udtagningen påbegyndtes i det varme-påvirkede område. Jordenes vandindhold er vist i tabel 1.

	Vandindhold (%)			
Prøve	Sept 2002	Marts 2003	Maj 2003	Nov. 2003
1	8,8	8,5	16,0	13,5
2	7,9	12,8	16,9	13,6
3	8,7	15,0	17,5	15,9
4	6,8	14,0	19,8	19,5
5	10,1	4,2	9,6	9,2
6	13,6	8,9	9,8	8,4
7	23,3	5,4	17,7	17,2
8	5,8	0,3	9,9	9,0
KUPA-688			18,3	
KUPA-191			16,0	
KUPA-173			18,7	
KUPA-220			8,9	

Tabel 1. Vandindhold (%) i jordprøver til svampeanalyser, beregnet på tør-vægtsbasis. KUPA-jordprøver er tilfældigt udvalgte landbrugsjorde medtaget i svampeanalyserne ved udtagning t=4.

Jordboende bakterier

Kolonidannende enheder (CFU) på 1/10 TSA og Goulds S1:

Efter prøvetagning blev prøverne opbevaret ved 4°C indtil analysestart for bakterier den følgende dag. Prøverne blev homogeniseret og sigtet gennem en 4 mm sigte. Jord fra referenceområdet blev sigtet først og sigten blev rensset grundigt mellem hver sigtning. Jordsuspensioner fremstilledes som følger: 1,5 g jord fra hver prøve blev udrystet grundigt i 9 ml 0,010 M fosfatbuffer og herefter stillet til sedimentation i 20 min. (fortynding 10^{-1}). En 10-folds fortyndingsrække blev fremstillet herudfra ($10^{-2} - 10^{-4}$) og fra hver fortyndingsrække blev duplikater af 0,1 ml af 2 relevante fortyndinger overført til Petriskåle med 1/10 TSA-agar (1/10 TSA er et generelt medie, som vi har erfaring med er det bedste medie til bredt at isolere bakterier fra jordprøver på) samt Petriskåle med Goulds S1-agar (*Pseudomonas* sp. specifikt medie, se Johnsen & Nielsen, 1999). Pladerne blev inkuberet ved henholdsvis 20°C og 42°C. Antallet af fremvoksede bakteriekolonier blev talt efter 2 dages inkubation.

"Community level physiological profiling"- inokulering af Biolog Eco-plates:

Biolog GN EcoPlates er et vækstsystem, der tester nedbrydningsevnen i mikrobielle samfund som helhed og giver et såkaldt "community-level physiological profiling" af den analyserede prøve. Dette er således et udtryk for samfundets funktionelle diversitet. Hver plade består af 3 replikater af 32 brønde indeholdende en af 31 forskellige kulstofkilder samt en brønd med vand som referenceprøve. Kulstofkilderne er specifikt designet til at analysere jordlevende mikrobielle samfund. Ved respiration (og dermed vækst på den pågældende kulstofkilde) reduceres et tetrazolium farvestof og en lilla farve udvikles. Pladerne giver dermed et metabolsk "fingeraftryk" af nedbrydningsevnen i de undersøgte mikrobielle samfund og dermed et "fingeraftryk" af det mikrobielle samfunds sammensætning.

2 replikate Biolog Ecoplates blev inokuleret med 100µl fra hver prøve af 10^{-2} fortyndingen (se ovenstående). Pladerne blev inkuberet ved henholdsvis 20°C og 42°C. Farveudviklingen (væksten) i de enkelte brønde blev fulgt spektrofotometrisk ($\lambda=620\text{nm}$) efter 24, 48, 72, 96 og 168 timers inkubation. For hver brønd blev en relativ værdi (RV) udregnet som $OD_{t=72} / OD_{t=0}$. De enkelte brønde blev anset for positive (vækst på det givne medie) hvis $RV_{\text{substrat}} - RV_{\text{blind}} > 0,40 \times RV_{\text{substrat}}$ (Paixao et al., 2003). Øvrige brønde blev talt som negative.

Statistisk analyse

Til statistiske analyser af data for CFU og Biolog Ecoplates anvendte vi tovejs-ANOVA kombineret med Tukey's test på \log_{10} transformerede data. Et gene-

relt signifikansniveau på 5% anvendtes. Til udregningerne anvendtes Sigma-Stat (SPSS Inc., Chicago, IL.).

Jordboende svampe

Indledende svampeundersøgelser ved t=1 og t=2

Ved udtagning t=1 (marts 2002) fandt vi i alle prøver fra det dampbehandlede område skimmelsvampe på de petriskåle med Gould S1 agar, som havde været inkuberet ved 42°C. Svampekolonierne voksede langsomt og var meget små, og ved rendyrkning på svampemedium viste det sig at være *A. fumigatus*. Denne art er termotolerant og kunne være opformeret som følge af dampoprensningen, da den ikke blev fundet ved udtagning t=0, og heller ikke var tilstede i referenceprøverne. For at undersøge dette nærmere, blev jordprøver fra udtagning t=2 (sept. 2002) fremsendt for nærmere analyse af skimmelsvampe, specielt *A. fumigatus*. Prøverne nummereres løbende fra 1 til 8.

Prøverne blev opbevaret ved 2°C. Jordsuspensioner blev fremstillet på følgende måde: 10 g jord fra hver prøve blev vejlet ned i en 250 ml plastikflaske og blandet med 90 ml fortyndingsmedium, bestående af 0.0033M hexametaphosphate, HMP. Alle afvejninger af jord blev foretaget med to decimalers nøjagtighed. Flaskerne blev roteret på overhead-rysteapparat i 30 minutter og henstod til næste dag ved 2°C. Den efterfølgende dag blev rystningen gentaget, og 7.5 ml af denne suspension blev overført til reagensglas (Fortynding 10^{-1}). En 10-folds fortyndingsrække blev fremstillet herudfra ($10^{-2} - 10^{-4}$). Fra hver fortynding blev 0.1 ml overført til to replikate Petri-skåle med V8-agar med 50 ppm chloramphenicol og 25 ppm chlortetracyclin til hæmning af bakterievækst. Pladerne blev inkuberet ved 25 °C. Efter en uge optaltes det totale antal skimmelsvampe og som delmængde heraf, *A. fumigatus*. Øvrige skimmelsvampe ('Andre') blev beregnet som difference mellem totaltal og antal *A. fumigatus*. Jordens vandindhold blev bestemt på prøver á 10 g efter tørring i 2 timer ved 130°C. Baseret på optælling, fortyndingsniveau og vandindhold kan antal kolonidannende enheder (colony forming units, CFU) per g tør jord beregnes.

Svampeundersøgelser ved t=3 t=4 og t=5

Prøver på ca. 100 g fra hhv. udtag t=3, t=4 og t=5 blev analyseret for indhold af skimmelsvampe, specielt *A. fumigatus*. Prøverne blev nummeret fortløbende fra 1 til 8, og opbevaret ved 2°C til analyse. En pilotpladespredning gennemførtes til fastlæggelse af passende fortyndingsniveauer. Hertil udtog vi 10 g jord fra hver af de 8 prøver og forbehandlede prøverne som beskrevet ovenfor. En 10-folds fortyndingsrække blev fremstillet ($10^{-2} - 10^{-4}$), og fra hver fortynding overførtes 0.1 ml til to replikate petriskåle med V8-agar. Halvdelen af pladerne blev inkuberet ved 25 °C (fire dage) og halvde-

len ved 37 °C (tre dage). Efter inkubering optaltes det totale antal skimmel-svampe, gærsvampe (ikke ved pilotpladespredning) samt *A. fumigatus*.

Forud for den egentlige pladespredning, blev de otte prøver sigtet (4 mm), og tre replicate delprøver udtaget fra hver. Den nøjagtige mængde jord fra hver enkelt prøve (Tabel 2) samt fortyndingsniveauerne er baseret på pilot-pladespredningen og på ønsket om tælleletal på ca. 50 svampekolonier per petriskål. Hver delprøve blev vejlet ned i en 250 ml flaske med 90 ml HMP. Bortset fra at der her blev fremstillet tre replikate petriskåle per fortynding, gennemførtes forbehandling og pladespredning som ovenfor. Jordens vandindhold blev bestemt på dobbeltprøver som ovenfor.

Foruden den dampbehandlede jord og referencejorden fra området blev 4 tilfældige landbrugsjorde medtaget i svampeundersøgelser til t=4. Dette blev gjort for at give et fingerpeg af hyppigheden af svampe generelt og *A. fumigatus* i særdeleshed i normal landbrugsjord.

Luftbårne svampe samt svampe på vegetation

Sampling og kvantificering af luftbårne *A. fumigatus*

Luftbårne mikroorganismer blev kun samlet til t=5. (18/11 2003). Samlingen foregik på polycarbonatfiltre med GSP samplere i 10-60 minutter i indåndingszonen. Luftprøver blev samlet ved kontrol position, position 140 ved "ingen aktivitet" og under gravning. Endvidere blev der samlet ved position 141 ved "ingen aktivitet" og under græs trimning og ved position 142 under sammenpustning af blade. Ved alle positioner og arbejdsopgaver blev der samlet både med personbåret og stationært udstyr. De stationære målinger bruges til at beskrive eksponeringen ved ophold i et givet område med eller uden aktivitet. De personbårne mål bruges til at beskrive eksponering ved en given arbejdsopgave – f.eks. græstrimning.

Max. 2 timer efter sampling blev filtrene udvasket i en ekstraktionsbuffer i 15 min. ved 500 rpm. Suspensionerne blev pladespredt på DG18 (Dichloran-glycerol agar) og inkuberet ved 45 eller 25°C for fremvækst af hhv. *A. fumigatus* eller total antal dyrkbare mesofile svampe. Antal fremvoksede svampe blev talt efter 3 og 7 dages inkubation.

Tilstedeværelse af *A. fumigatus* på blade på jordoverfladen/græsplæne

Idet *A. fumigatus* ifølge litteraturen danner mange sporer som let frigives til luften (se f.eks. Latgé, 2001) blev blade indsamlet fra jordoverfladen for se om disse udgør en potentiel eksponering for *A. fumigatus*. Den 7. december 2003 blev 208 blade fra 10 områder fordelt i position 140, 141, 142 og

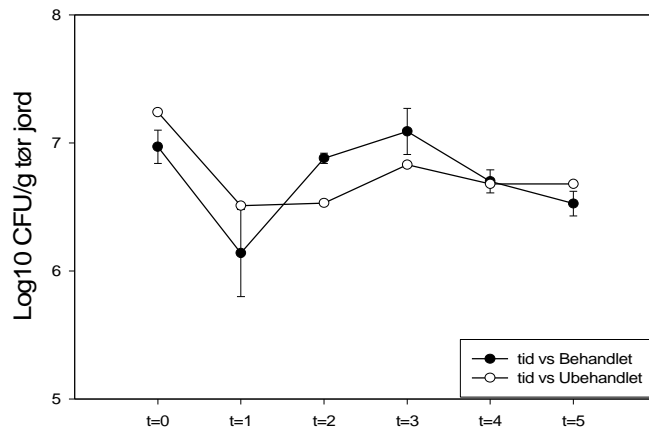
kontrol indsamlet fra jord/græsoverfladen. Denne dag var det stærkt blæsevejr og ca. -2°C .
Fra hvert blad blev der udskåret stykker på $0,5\text{ cm}^3$. Bladstykkerne blev placeret på DG18 agar og inkuberet ved 45°C .

Resultater bakterier

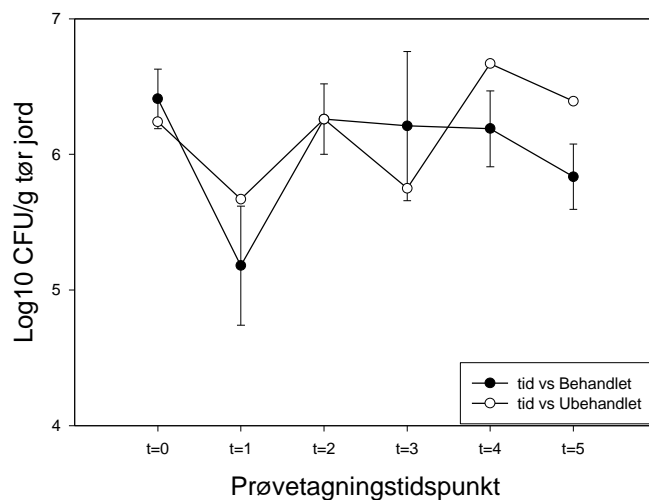
Kolonidannende enheder 1/10 TSA ved 20°C og 42°C

For bakterier, der er dyrket ved 20°C, kunne der ikke påvises en signifikant effekt af dampbehandling for hverken overjord eller underjord (1/10 TSA, 20°C, Figur 1, bemærk forskellige akser). Til tiden t=1 ser vi et lille fald i bakterieantal uden at det dog er statistisk signifikant. Fra t=2 og helt indtil t=5 finder vi et stabilt antal dyrkbare bakterier ved 20°C.

20°C 1/10 TSA overjord

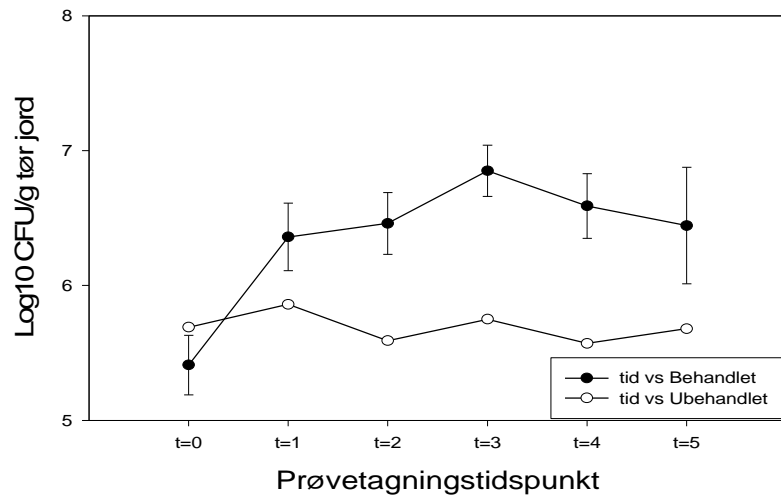


20°C 1/10 TSA underjord

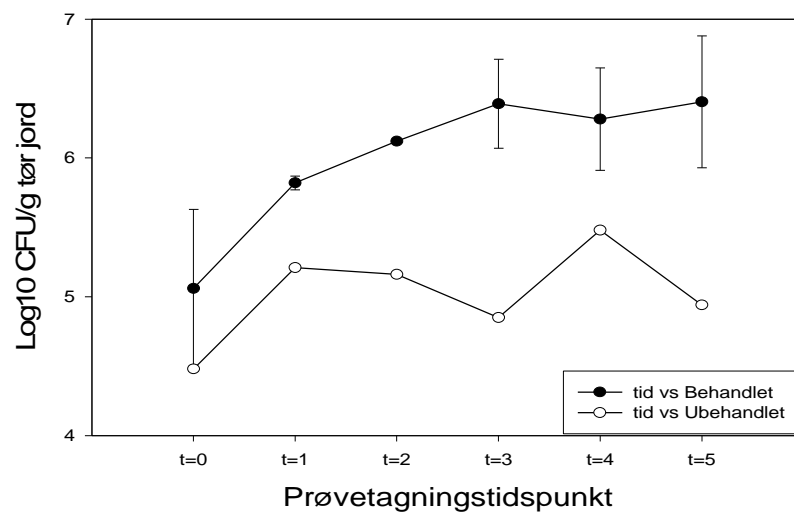


Figur 1: Kolonidannende bakterier (CFU) på standard dyrkningsmedie (1/10 TSA) ved 20°C.

42°C 1/10 TSA overjord



42°C 1/10 TSA underjord



Figur 2: Kolonidannende bakterier (CFU) på standard dyrkningsmedie (1/10 TSA) ved 42°C.

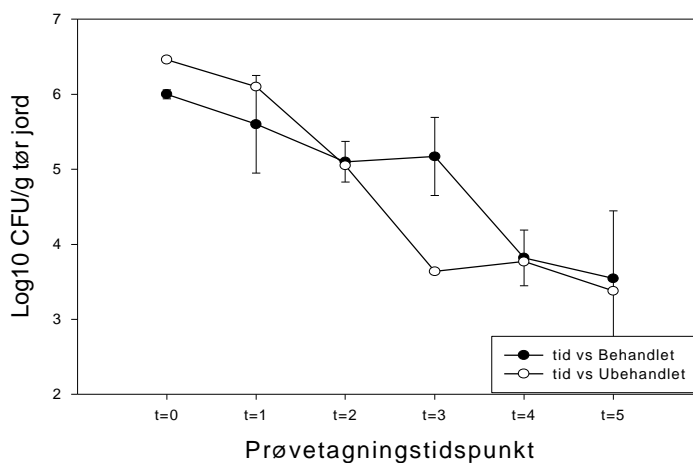
Antallet af mikroorganismer der kan vokse ved 42°C (CFU^{42°C}) stiger derimod under damp-behandlingen og fortsætter med at ligge på et højere niveau efter behandlingens afslutning (Figur 2, bemærk forskellige akser).

Antallet af CFU^{42°C} i reference-prøverne er derimod relativt konstant og ændres ikke signifikant over tid. Ved inkubation ved 42°C ses således en signifikant forskel ($P=0,05$) mellem behandlet og ubehandlet jord ved udtagningerne t=2, t=3, t=4 og t=5 i overjord og t=2, t=3 samt t=5 i underjord. Forskellen mellem antal CFU^{42°C} ved udtagningerne t=1, overjord samt t=1 og t=4, underjord er derimod ikke stor nok til at være signifikant.

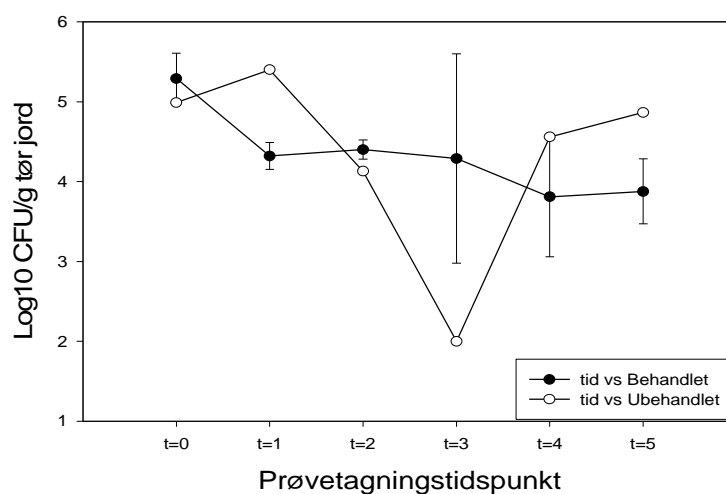
Det må således konkluderes, at dampbehandlingen har haft en signifikant indflydelse på antallet af termofile og termotolerante bakterier i jorden. Jorden er endnu ikke efter mere end et år vendt tilbage til en normalsituation.

Kolonidannende enheder på Goulds S1, 20°C og 42°C

20°C Goulds S1 overjord



20°C Goulds S1 underjord

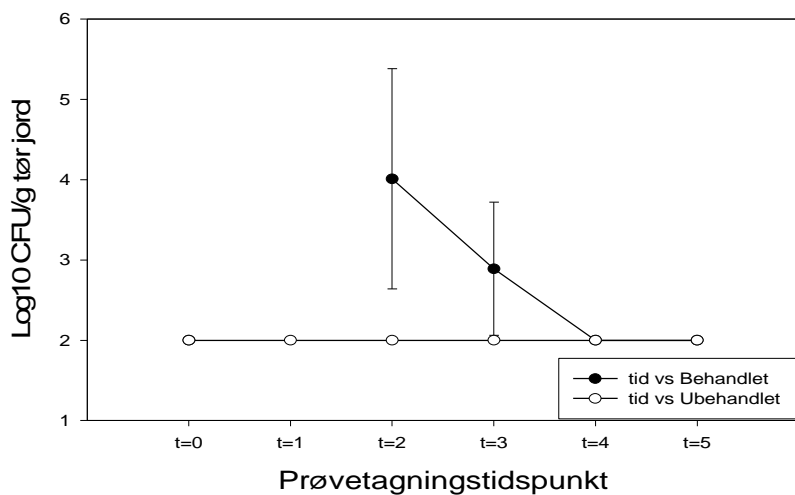


Figur 3: Kolonidannende bakterier (CFU) på *Pseudomonas sp.* selektivt dyrkningsmedie (Goulds S1) ved 20°C (t=0 til t=4)

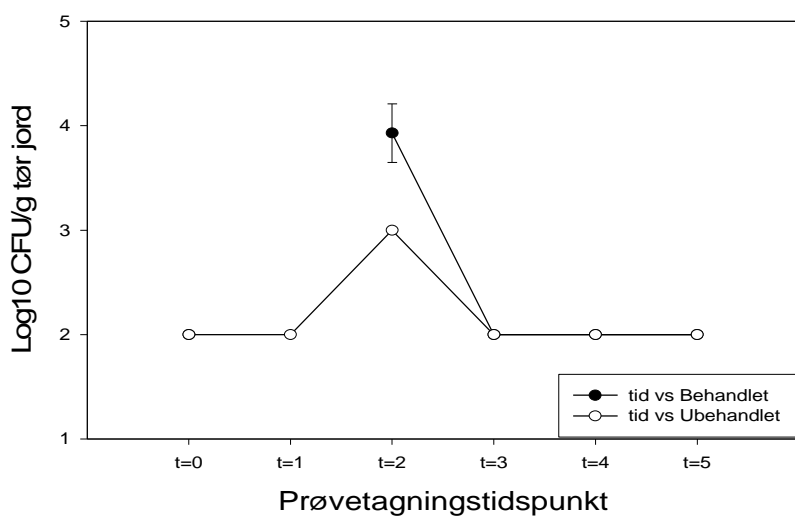
Antallet af log₁₀CFU på Goulds S1 ved inkubationstemperaturen 20°C er ikke signifikant forskellig mellem de to behandlinger bortset fra t=3, hvor vi fandt et usædvanligt lavt antal *Pseudomonas* spp. i den ubehandlede jord (Figur 4). Årsagen til dette meget lave antal er ikke umiddelbart forklarlig.

Yderligere ses et generelt fald over tid i antallet af *Pseudomonas* spp. både i behandlet og ubehandlet jord. Det er heller ikke muligt at give en sikker forklaring på årsagen til dette.

42°C Goulds S1 overjord



42°C Goulds S1 underjord



Figur 4: Kolonidannende bakterier (CFU) på *Pseudomonas* spp. selektivt dyrkningsmedie (Goulds S1) ved 20°C. Værdier for behandlet jord t=1 mangler på grund af svampevækst på pladerne. Bemærk forskellige akser samt at værdierne log10 CFU/g tør jord=2 refererer til detektionsgrænsen på 10² CFU/g tør jord.

Ved inkubation ved 42°C i 48 timer fandt vi kun kolonier på Goulds S1 i prøverne fra den behandlede overjord ved udtagningerne t=2 og t=3, samt både behandlet og ubehandlet underjord t=2. Bakterier, der vokser

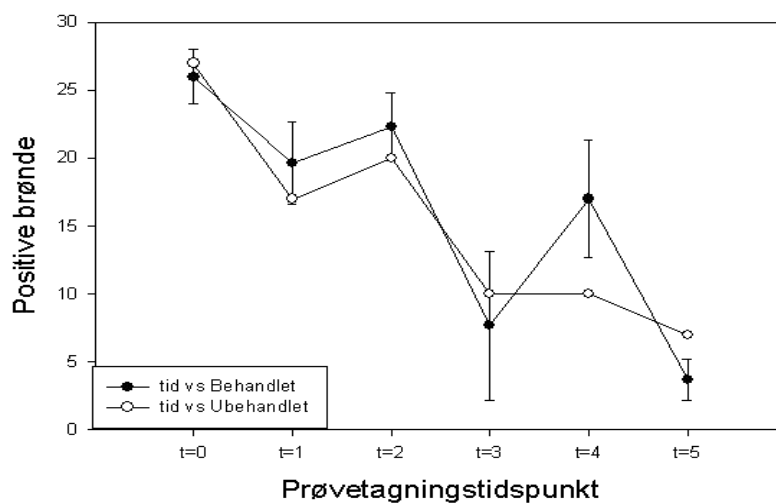
på Goulds S1 plader ved 42°C, er med stor sandsynlighed *P. aeruginosa*. Karakteriseringer på API 20NE af fundne kolonier fra prøvetagning t=3 viste sig således også at være *P. aeruginosa*. Vi fandt således kun bakteriekolonier efter 48 timers inkubation på udpladningerne fra den behandlede overjord ved prøvetagningerne t=2 og t=3, samt i underjord t=2 (Figur 4). Bemærk at værdierne log₁₀ CFU/g tør jord=2 refererer til detektionsgrænsen på 10² CFU/g tør jord, og er således maksimumværdier for de pågældende prøver.

Kun ved prøvetagningen t=2 var der signifikant forskel mellem behandlet og ubehandlet jord i antal kolonier. Det skal dog her bemærkes, at referenceværdierne fra den ubehandlede prøve sandsynligvis er et overestimat, da maksimumværdierne 10² CFU/g jord er brugt i de statistiske analyser. Yderligere observeredes i prøverne fra prøvetagningen t=4 efter længere tids inkubation (5 dg.) enkelte kolonier i alle behandlede overjordsprøver samt 2 af de 3 behandlede underjordsprøver. Selv hvis disse tællinger blev indregnet som data efter 48 timers inkubation ville antallet dog ikke være signifikant forskelligt fra detektionsgrænsen (data ikke vist). Dampbehandlingen har tydeligvis selekteret for *Pseudomonas aeruginosa*, men den er forholdsvis hurtigt efter behandlingen faldet i antal til et normalt niveau.

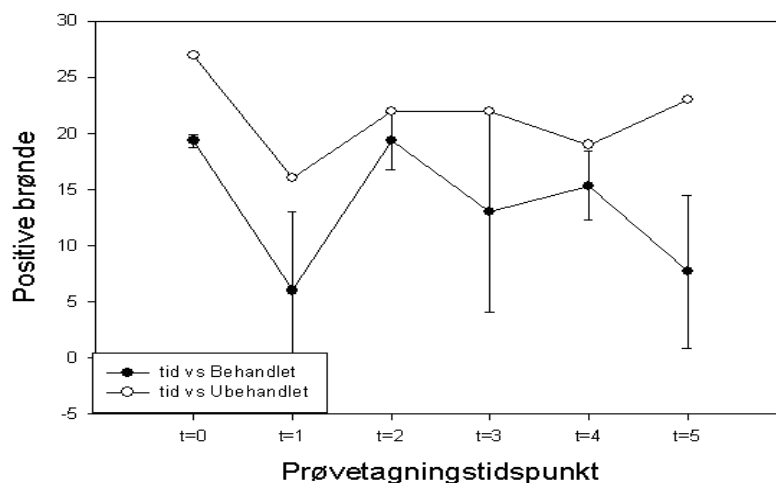
"Community level physiological profile" på Biolog Ecoplates ved 20°C og 42°C (t=0 til t=5)

Ved inkubationstemperaturen 20°C var der ikke signifikant forskel mellem behandlet og ubehandlet overjord i antallet af positive brønde på Biolog Ecoplates (Figur 5). Vi fandt et fald over tid i antallet af positive brønde i både den behandlede og den ubehandlede jord, hvilket indikerer et generelt fald i funktionel diversitet (funktionel diversitet = bakteriepopulationernes evne til at udnytte forskellige kulstofkilder) i overjorden ved 20°C. Årsagen til dette er ukendt. Vi konkluderer, at indflydelse af damp-behandling på den funktionelle fysiologiske diversitet ved 20°C ikke kunne påvises for overjorden. I underjorden så vi en signifikant generel forskel (P=0,05) mellem behandlet og ubehandlet jord også til t=0. Til de enkelte tidspunkter var der dog ikke signifikant forskel. Yderligere sås ingen forandring i effekt over tid. Den funktionelle fysiologiske diversitet ved 20°C konkluderes at være højere i den ubehandlede underjord end i den behandlede underjord, og heller ikke her kunne en signifikant indflydelse af dampbehandling på den funktionelle diversitet påvises.

20°C Biolog Ecoplate overjord



20°C Biolog Ecoplate underjord



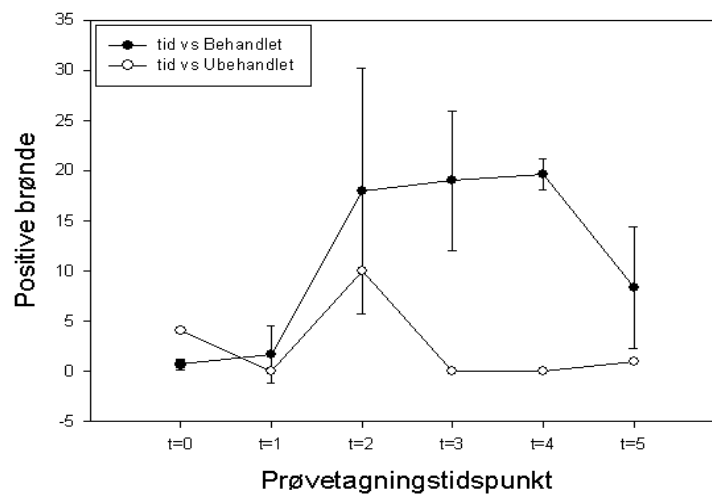
Figur 5: Funktiel diversitet af mikrobielle samfund ved dyrkning ved 20°C.

Ved inkubationstemperaturen 42°C var der signifikant forskel ved prøvetagningerne t=2, t=3 og t=4 mellem behandlet og ubehandlet overjord i antallet af positive brønde på Biolog Ecoplates (Figur 6), mens forskellen ikke længere var signifikant ved t=5. Yderligere fandt vi en signifikant stigning over tid i antallet af positive brønde indtil t=4, hvilket indikerer en generelt stigende funktional diversitet ved 42°C i den behandlede overjord. Denne tendens blev fulgt af et kraftigt fald ved prøvetagningen t=5. Samme tendenser fandt

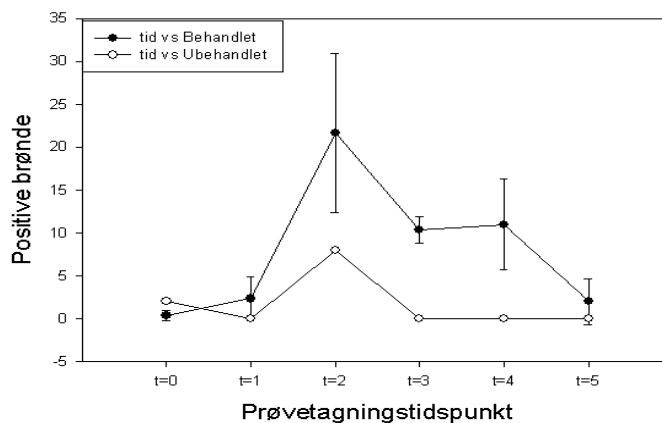
vi i underjorden. I den ubehandlede jord var diversiteten ved 42°C lav og ikke signifikant forskellig over tid. Samme tendenser fandt vi i underjorden.

Den funktionelle fysiologiske diversitet ved 42°C må derfor konkluderes at være stærkt stigende som følge af dampbehandlingen og denne høje funktionelle diversitet ved 42°C er stadig tilstede ved udtag t=4. Det sidste punkt (t=5) viser et fald i diversitet og dette kan tolkes som, at jorden er begyndt at vende tilbage til normaltilstanden.

42°C Biolog Ecoplate overjord



42°C Biolog Ecoplate underjord



Figur 6: Funktionel diversitet af mikrobielle samfund ved dyrkning ved 42°C.

Resultater jordboende svampe

Detailresultaterne for jordboende svampe kan ses i tabelform i Bilag 1.

Ved prøvetagningen under dampbehandlingen (t=2) blev *A. fumigatus* detekteret på "bakterieskålene" ved et tilfælde, men en egentlig tælling af antal CFU blev ikke udført. Efter identifikationen af *A. fumigatus* blev det besluttet at følge denne art specifikt ved de følgende prøvetagninger.

A. fumigatus blev detekteret til t=2 i samtlige behandlede prøver men ikke i de ubehandlede. Dette indikerer en generel fremvækst af *A. fumigatus* som følge af dampbehandlingen - både i over- og underjord men med meget stor variation prøverne imellem. Især Prøve 5 fra behandlet underjord fremstår med et højt indhold af *A. fumigatus*, i.e. mere end 400×10^3 CFU g^{-1} jord (Bilag 1). Også overjordsprøverne indeholder mere end 10^3 sporer af *A. fumigatus* g^{-1} jord.

Et totaltal (alle svampe) på 50×10^3 til 250×10^3 CFU g^{-1} jord (25°) anses for normalt for det øverste lag i en landbrugsjord (e.g. sammenligningsprøverne KUPA-688 og KUPA-173 i Bilag 1), mens værdier for underjordsprøver normalt er en del lavere (e.g. sammenligningsprøverne KUPA-191 og KUPA-220 i Bilag 1).

De indledende pladespredninger fra t=3 viste, at *A. fumigatus* stadig var til stede i både dampbehandlet over- og underjord. Svampen var til stede i største koncentrationer i overjordsprøverne 1 og 2. Udpladningerne blev foretaget på et generelt svampemedie (V8), hvor *A. fumigatus* vokser godt, især ved $37^\circ C$ hvor den vokser meget hurtigt. CFU resultaterne er vist i Bilag 1. Både ved $25^\circ C$ og $37^\circ C$ sås mere end 10^5 CFU g^{-1} tør jord (Prøve 1": ca. 250×10^3 og Prøve 2": ca. 140×10^3) af *A. fumigatus*. I den sidste overjordsprøve (Prøve 3) samt i alle underjordsprøverne (Prøve 5-7), var niveauet under 5×10^3 CFU g^{-1} . Den lave værdi i Prøve 3 sammenlignet med de øvrige overjordsprøver kan muligvis hænge sammen med, at denne prøve var mere sandet (mere som underjorden).

I den ikke-dampbehandlede overjords-referenceprøve (t=3, Prøve 4) ved $25^\circ C$ fandt vi en lille mængde *A. fumigatus*. Bemærk, at meget små CFU tal ($<10^3$ g^{-1}) skal tolkes varsomt, da disse er baseret på meget lave tællinger på petriskålene. Antallet af andre filamentøse svampe er på et normalt niveau, under 10^4 g^{-1} for de fire underjorde og mellem 10^4 g^{-1} og 10^5 g^{-1} for de fire overjorde (Bilag 1). Værdierne er lavest i prøverne med de største indhold af *A. fumigatus*. Dette skyldes formentligt, at *A. fumigatus* har udkonkurreret en del af de andre svampe enten i jorden eller på petriskålene. Indholdet af gærsvampe ("Yeast fungi") er lavt men alligevel normalt for jord ($10^3 - 10^4$ g^{-1} for overjord og $< 5 \times 10^5$ g^{-1} for underjord (Bilag 1).

Ved 37°C dominerer *A. fumigatus*, mens andre svampe kun udgør omkring 10^3 g^{-1} for overjord og mindre end 10^2 g^{-1} for underjord (Bilag 1). Antallet af *A. fumigatus* er relativt ens, når prøverne er inkuberet ved hhv. 37° og 25°C. Sammenlignes antallet af *A. fumigatus* CFU fra t=2 og t=3 ses et tydeligt fald i underjorden fra omkring $20 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ (i Prøve 5 endda knapt $400 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$) til $10^2 - 10^3 \text{ g}^{-1}$. På den anden side observeres et stigende antal i de tre overjordsprøver, specielt i Prøve 1 og 2, fra omkring $15 \times 10^3 \text{ CFU g}^{-1}$ ved t=2 til omkring $200 \times 10^3 \text{ CFU g}^{-1}$ ved t=3. Dette tyder på, at *A. fumigatus* er opformeret i overjorden, måske pga. udnyttelse af planterester eller andet organisk materiale. Ifølge Domsch et al. (1993) kan *A. fumigatus* udnytte en lang række kul- og kvælstofkilder til vækst. Det er bemærkelsesværdigt, at denne berigelse er sket henover en vinterperiode på trods af at *A. fumigatus* er kendt for at vokse bedst ved høje temperaturer.

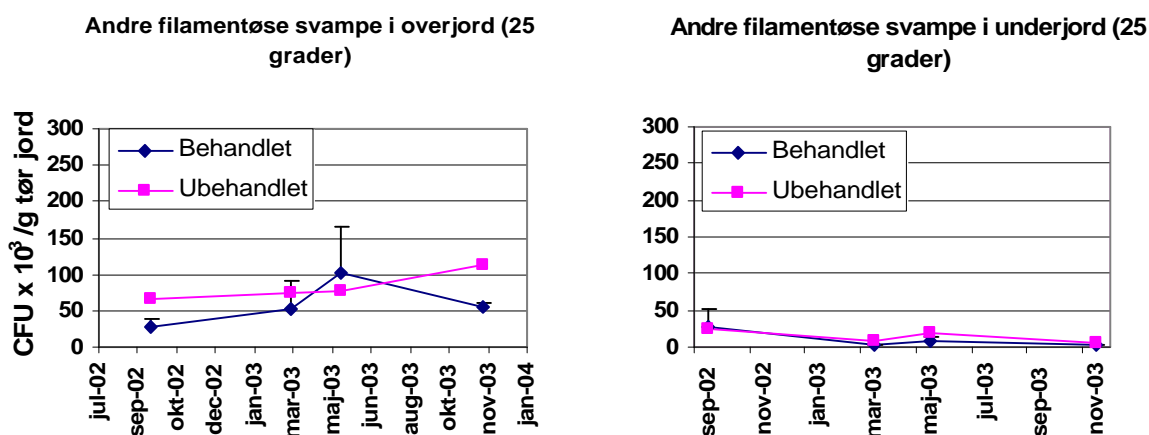
Ved forårsudtagningen t=4 forventede vi, at en øget mikrobiel aktivitet i jorden ville have ført til et fald i antallet af *A. fumigatus*. I overensstemmelse hermed viser resultaterne fra Prøve 1 og 2 et lavere antal *A. fumigatus* (Bilag 1). Dette fald sås både ved 25°C, hvor de fleste svampe vokser godt og *A. fumigatus* må konkurrere med andre arter på petriskålene, og ved 37°C hvor *A. fumigatus* forventes at være relativt enerådende. Resultaterne fra overjordsprøverne er dog ikke konsistente og i Prøve 3 observeredes således et stigende antal *A. fumigatus* fra $8 \times 10^3 \text{ CFU g}^{-1}$ ved t=3 til $27 \times 10^3 \text{ CFU g}^{-1}$ ved t=4. Ved t=4 var niveauet af *A. fumigatus* i overjorden mellem 30 og $80 \times 10^3 \text{ CFU g}^{-1}$ (Bilag 1). I Prøve 1 og 2 blev faldet i *A. fumigatus* fulgt af et stigende antal af andre filamentøse svampe. Denne trend var dog heller ikke konsistent og hyppigheden af andre svampe faldt således i Prøve 3 mens den ikke ændredes i referenceprøve 4.

Mere overraskende er stigningen i *A. fumigatus* i to af de behandlede underjordsprøver (Prøve 6 og 7, 37°C) ved t=4. I Prøve 7 detekteredes *A. fumigatus* ikke ved 25°C. Dette skyldes at petriskålene her var totalt overgroet af en anden filamentøs svamp, *Trichoderma* sp.. Antallet af *A. fumigatus* i Prøve 6 og 7 ved 37°C var ca. $80 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ jord, hvilket ligner niveauet for overjorden. Kun i Prøve 5 observeredes den samme lave mængde *A. fumigatus* som ved t=3. Bemærkelsesværdigt var det netop denne prøvelokalitet, der havde det højeste CFU for *A. fumigatus* ved t=2.

Ved den sidste prøveudtagning i november 2003 (t=5) var der stor variation i CFU for *A. fumigatus* i overjorden, fra 6×10^3 i Prøve 2 til knapt $130 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ i Prøve 3 (Bilag 1, 37°C). Prøve 3 viste foruden høje CFU for *A. fumigatus* også udtagningsseriens højeste indhold af andre svampe, der kan vokse ved den høje temperatur, nemlig knapt $20 \times 10^3 \text{ CFU g}^{-1}$. I underjorden var der derimod et generelt lavt niveau af *A. fumigatus*. Overjordsreferencen (Prøve 4) ligger på et ret højt niveau for andre filamentøse svampe (omtrent 115 CFU g^{-1}), hvilken tyder på at der har været en ganske stor svampe-sporulering i den forudgående periode (Bilag 1, 25°C).

Samlet konkluderes, at dampbehandlingen ved en længerevarende temperaturstigning og forøgelse af jordens vandindhold, har resulteret i en kraftig fremvækst af *A. fumigatus*. Dette ses i både over og underjord. I referencejorden var *A. fumigatus* således ikke detekterbar i fem af otte prøver, og tilstede i meget lavt antal i de resterende 3 referenceprøver. *A. fumigatus* anses for en "narrow-amplitude species" (Keller & Bidochka, 1998), hvilket betyder at den er hyppig i forekomst når den findes, men at den kun findes i et begrænset antal områder. *A. fumigatus* var således heller ikke detekterbar eller meget sjældent i de her testede landbrugsjorde (Bilag 1, KUPA-prøver). Keller og Bidochka (1998) fandt *A. fumigatus* i en af fire testede jorde og i antal der er sammenlignelige med vores resultater fra udtag t=4. Forfatterne rapporterer den højeste hyppighed i sommerperioden og forklarer dette med *A. fumigatus*'s termotolerante egenskaber. Vi har ingen prøveudtag i sommermånederne 2003.

Detailresultaterne fra Bilag 1 er vist i oversigtsform i Figur 7 ("Andre filamentøse svampe") og Figur 8 (*A. fumigatus*).



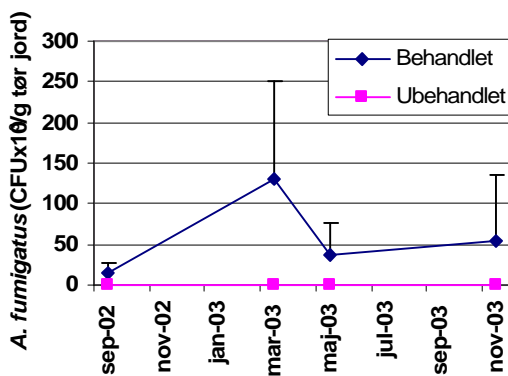
Figur 7: "Andre filamentøse svampe" i hhv. over- og underjord. Resultater fra prøvetagning t=2 til t=5 (25°C). De behandlede prøver er udregnet som middelværdier med standardafvigelse (SD) for de tre udtagningspunkter i overjord (Prøver 1-3) og underjord (Prøver 5-7) mens Prøve 4 er ubehandlet overjord og Prøve 8 ubehandlet underjord. Se Bilag 1 for detaljer.

Set over tid falder antallet af *A. fumigatus* i underjorden henover vintermånederne fra t=2 til t=3 fulgt af en stigning i foråret 2003 fra t=3 til t=4 og et fald fra forår til efterår 2003 (t=4 til t=5). Der kan muligvis have været en fortsat stigning henover sommeren 2003 inden dette fald, det kan vores data ikke afsløre, da vi ingen udtagninger har fra sommerperioden. I en del af de behandlede overjordsprøver fandt vi den modsatte trend, nemlig en stigning fra t=2 til t=3 og et fald fra t=3 til t=4. Det gennemsnitlige niveau i overjorden ved t=5 er det samme som ved t=4, dog dækkende over store variationer mellem de tre behandlede prøver. Den forøgede hyppighed i underjorden ved t=4 kan være et resultat af svampevækst men kunne også

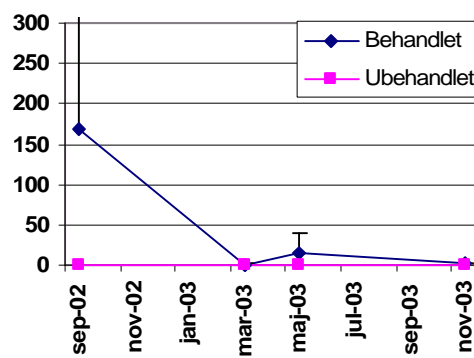
skyldes passiv transport af sporer fra over- til underjorden efter kraftige regnskyl. Den sidste forklaring kunne forklare en del af den observerede reduktion i hyppighed i overjorden. Dog var det meget store fald i Prøve 1 (overjord ved dampudtagningsbrønd 140) fra t=3 til t=4 ikke ledsaget af en stigning i hyppigheden i Prøve 5 (underjord ved dampudtagningsbrønd 140), tværtimod sås et fald. Imod "nedvaskningshypotesen" taler også, at vi fandt en stigning i *A. fumigatus* CFU i Prøve 7 samtidig med en stigning - og ikke en reduktion - af antallet i Prøve 3. Det er derfor mere sandsynligt at *A. fumigatus* er opformeret og har vokset aktivt i denne periode i underjorden. Den pludseligt høje hyppighed af *Trichoderma* indikerer således også en høj mikrobiel aktivitet i denne zone.

Den tidsmæssige udvikling i hyppigheden af *A. fumigatus* er vanskelig at forklare. Resultaterne viser dog, at når denne art først opformerer og etableres i jorden, er den vanskelig at slippe af med igen. Det kan heller ikke afvises, at hyppigheden på sigt vil forøges yderligere, specielt hvis sommer-temperaturer bliver høje, og fugt og næring er tilstede. Dette konkluderes, fordi hyppigheden af svampen i nogle af prøverne er så høj, at det i sig selv vil give den en konkurrencemæssig fordel i forhold til den øvrige svampeflora. Det skal yderligere bemærkes at *A. fumigatus* fandtes i en af de tilfældige landbrugsjorde (KUPA-220 figur 10), samt i referencejordene fra det behandlede område – men at den her aldrig fandtes med de høje værdier, vi så i de damp-behandlede prøver.

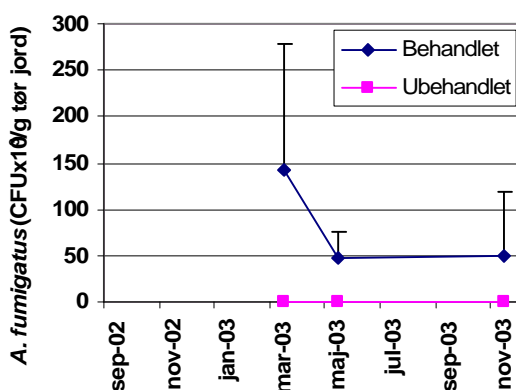
A. fumigatus i overjord (25 grader)



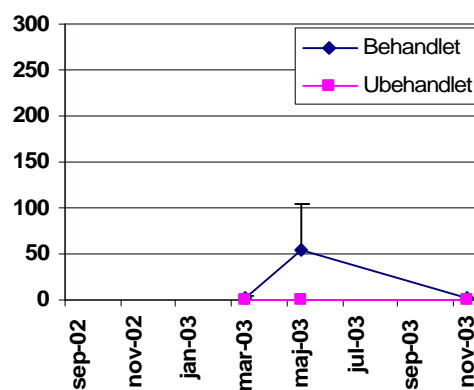
A. fumigatus i underjord (25 grader)



A. fumigatus i overjord (37 grader)



A. fumigatus i underjord (37 grader)

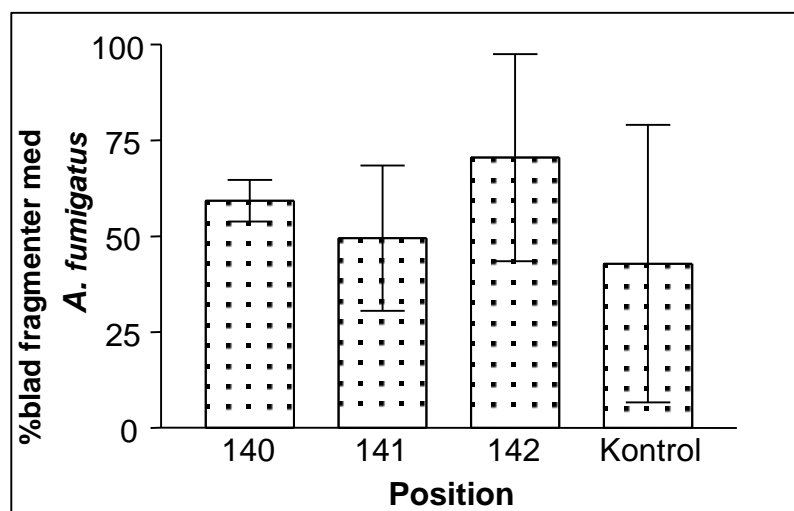


Figur 8: *Aspergillus fumigatus* i hhv. over- og underjord. Resultater fra prøvetagning $t=2$ til $t=5$ (25°C) og $t=3$ til $t=5$ (37°C). De behandlede prøver er udregnet som middelværdier med standardafvigelse (SD) for de tre udtagningsspunkter i overjord (Prøver 1-3) og underjord (Prøver 5-7) mens Prøve 4 er ubehandlet overjord og Prøve 8 ubehandlet underjord. Se Bilag 1 for detaljer.

Vi har ikke litteratureksempler, der viser om (eller hvordan) en eventuel korrelation er mellem hyppigheden af *A. fumigatus* i jord og koncentrationen af *A. fumigatus* i bioaerosoler i det omgivende miljø over jorden. Ifølge en tysk undersøgelse (Staib et al., 1978) er det sandsynligt, at jord-isolater udgør en sundhedsrisiko hvis de er tilstede i større mængder i luft. Der er tidligere lavet undersøgelser af sundhedsrisikoen af *A. fumigatus* relateret til pottjord i hospitalsmiljøer (Staib et al., 1978; Kenyon et al., 1984), komposteringsområder (Heller & Rabe 2001), samt behandling af biologisk husholdningsaffald og biologisk brændsel (Nielsen et al., 2000), se vedlagte Bilag 2 (engelsk) for mere om *A. fumigatus*.

Resultater luftbårne svampe samt svampe på vegetation

På de personbårne målinger var koncentrationen af *A. fumigatus* under 600 CFU m^{-3} og på de stationære målinger under 100 CFU m^{-3} luft. Mesofile svampe (de svampe, der ikke vokser ved høje temperaturer) blev kvantificeret i tre prøver fra personbårne målinger taget under havearbejde og de viste at eksponeringerne ved havearbejde var på $1000\text{-}2000 \text{ CFU m}^{-3}$.



Figur 9. Forekomst af *A. fumigatus* på indsamlede blade i de dampbehandlede områder (140, 141, 142) samt i kontrolområdet. Den store spredning i kontrolområdet dækker over to indsamlinger af 13 og 15 blade med henholdsvis 11 og 1 blad med forekomst af *A. fumigatus*.

A. fumigatus var til stede på 70 % af de indsamlede blade og i alle områder fra den behandlede jord. *A. fumigatus* blev endvidere fundet på 43 % af bladene indsamlet fra kontrolområdet (Tabel 1).

Eksponering for mikroorganismer, som fører til effekter på luftvejene, er ofte set ved undersøgelser i miljøer hvor organisk materiale håndteres. I dette studie er eksponeringsniveauer søgt målt i et udendørsmiljø, hvor der ikke eller kun håndteres små mængder af organisk materiale (f.eks. blade). Men viden om eksponeringsniveauer er vigtigt set i lyset af, at det i 2003 er blevet vist at der også udendørs i boligområder kan forekomme eksponering for aerosoler med så høje koncentrationer af mikroorganismer, som ellers kun beskrives i arbejdsmiljøer (Herr et al., 2003). Beboerne i disse områder rapporterede luftvejsproblemer som lignede problemer set i arbejdsmiljøer med høje eksponeringer for mikroorganismer. I vores studie blev *A. fumigatus* ikke fundet i de 18 luftprøver, der blev samlet. Det kan skyldes at luftprøverne blev samlet på en dag med meget høj luftfugtighed i en periode mellem regnbyger hvor også jorden var meget våd. Kun få mikroorganismer vil være til stede i luften under disse forhold, fordi jord med et højt vandindhold hæmmer støvning og fordi luftbårne partikler har en højere sedimentationshastighed ved høj fugtighed. Koncentrationen af mesofile svampe var også i den lave ende af hvad man ofte finder under lignende arbejdsprocesser.

Da det pga. af de vejræssige forhold ikke var muligt at gentage luftprøve-samlingerne over flere dage, indsamlede vi i stedet blade på jordoverfladen, idet de kan være kilder til eksponering. *A. fumigatus* blev fundet på 70% af de blade, der blev indsamlet i området med forhøjet *A. fumigatus* koncentration i jorden. Idet svampen blev fundet på en så høj andel af bladene er der en sandsynlighed for, at den har koloniseret bladene og har mulighed for at frigive sporer til luften f.eks. ved blæst, udtørring eller menneskelige aktiviteter. Derfor er det højst sandsynligt, at *A. fumigatus* på nogle dage kan findes i luften og give anledning til humaneksponering. *A. fumigatus* er i andre undersøgelser kun sjældent fundet i luften i beboelsesområder. Således har AMI i tidligere udendørs målinger i vinterhalvåret, i sådanne områder fordelt over hele Danmark, kun fundet *A. fumigatus* i 5 af 53 områder. I disse 5 prøver blev *A. fumigatus* fundet i koncentrationer mellem 8 og 15 CFU m⁻³ luft. I den foreliggende undersøgelse blev *A. fumigatus* også fundet på blade fra kontrolområdet, hvilket kan skyldes at disse blade eller frigivne sporer er transporteret med vinden over til kontrolområdet. Dette er sandsynligt fordi *A. fumigatus* sporer tilsyneladende kan transporteres med vinden i så høje koncentrationer (300 CFU m⁻³), at de er målbare. Således viste målinger, der blev foretaget ca. 250 m fra flisfyrede varmeværker med høje koncentrationer af *A. fumigatus*, at *A. fumigatus*

ofte findes i sådanne naboområder i indåndingszonen (Madsen, ikke publiceret).

Hvor langt *A. fumigatus* sporer transporteres med vinden vil afhænge af lufthastighed og af om sporerne optræder enkeltvis eller i agglomerater eller f.eks. sidder på blade. Ca. en time efter ophør af slamhåndtering er koncentration af luftbårne sporer af *A. fumigatus* i indåndingszonen set at vende tilbage til et baggrunds niveau (Passman, 1983), hvilket er i overensstemmelse med en sedimentationshastighed af *A. fumigatus* sporer på ca. 1 m time⁻¹ (Gregory, 1973). Under lignende omstændigheder vil der således kunne forventes en forhøjet luftkoncentration af *A. fumigatus* sporer i indåndingszonen i op til en time efter ophør af håndtering af de blade, der indgår i dette studie.

Mange faktorer spiller ind, når man skal evaluere helbredseffekter af bioaerosoler: Sammensætning, koncentration, eksponeringsperiode og den anvendte målemetode og individuel modtagelighed som f.eks. atopy, allergi eller et nedsat immunforsvar. Sidstnævnte er i særdeleshed vigtigt mht. eksponering for *A. fumigatus*, idet svampen kan være infektiøs hos svækkede personer. Ved vurdering af betydning af eksponeringsniveauet bør følgende faktorer derfor tages i betragtning: 1) at der i området bor ældre mennesker, som kan være svækkede og mere modtagelige end mennesker på arbejdsmarkedet; 2) at der nok ikke forekommer længere ophold i området som f.eks. ophold af 2 timers varighed; 3) at de målte eksponeringsniveauer kan afhænge af vejrforhold som vindhastighed og luftfugtighed; 4) at der teoretisk set kunne være ikke-dyrkbare *A. fumigatus* tilstede. Disse ville også kunne forårsage luftvejsproblemer, men ikke infektioner.

Konklusioner og anbefalinger

Den varmepåvirkning som er sket i forbindelse med oprensning ved dampinjektion har ført til, at de mikrobielle samfund er blevet ændret. De tre målinger i 2003 viser, at nogle typer termotolerante mikroorganismer er på retur, mens andre stadig var at finde i et højt niveau i enkelte af prøverne. Gennem hele prøvetagningsforløbet fandt vi flere termotolerante mikroorganismer i behandlet end ubehandlet jord. En del af disse udgøres af arter med forskellige former for hvilende sporer. Disse er mere persistente i jord end aktivt voksende organismer og må derfor forventes at overleve i længere tid.

Pseudomonas aeruginosa tilhører slægten *Pseudomonas*, der er gode repræsentanter for de hurtigtvoksende bakterier, der vokser hurtigt frem men typisk kun overlever i kortere tid i jordmiljøet. Det passer således glimrende, at denne type mikroorganisme forsvinder først. Den sidste måling for funktionel diversitet (BIOLOG) i november 2003 indikerer, at jordens generelle mikrobielle samfund er på vej mod normaltstanden.

Svampen *Aspergillus fumigatus* findes stadig i de dampbehandlede jorde i højere antal end hvad vi finder i kontroljorden ved sidste prøvetagning i november 2003. Da *A. fumigatus* danner sporer med relativt lang levetid i jord, vil et fald af antallet af sporer forventes at gå langsommere end for bakterier som *P. aeruginosa*. De nuværende undersøgelser støtter denne hypotese. De varierende niveauer af svampen kan dog også betyde, at den har haft perioder med aktiv vækst og sporulering i udtagningsforløbet. Gennem hele forløbet har der været stor variation i *A. fumigatus*'s forekomst i de enkelte delprøver, og det er derfor meget vanskeligt at sige noget sikkert om der er sket et fald henover tid. Dette gælder især for overjorden, hvor f.eks. en af de tre prøver viste et meget højt indhold også ved den sidste prøvetagning. For underjorden tyder resultaterne helt klart på et fald fra maj 2003 til november 2003. Dog skal det noteres, at værdierne for *A. fumigatus* også var ret lave i vinteren 02-03, og det kan ikke udelukkes at der er tale om sæsonmæssig variation.

Variation i biologisk data fra jord er et velkendt fænomen. Selv i geologisk intakte områder findes der en betydelig variation imellem prøver, der udtages med få meters afstand. Undersøgelsesområdet i Hedehusene er et inhomogent opfyldningsområde fra en gammel industrigrund, og man kan forvente, at den biologiske variation er langt større i vores prøver. Under selve prøvetagningen har vi minimeret variationen fra prøven i det udvalgte hul gennem at lave en stor velblandet jordprøve som er fordelt til de forskellige analyser. Variationen i de luftbårne kim er naturligvis meget afhængig af den aktuelle klimatiske situation, om det f.eks. regner eller det er en solrig og varm sommerdag.

Ved evt. fremtidige målinger af eventuelle sideeffekter af dampoprensning af forurenede jorde kan vi anbefale, at man måler for kolonier på Goulds S1 og V8 medie ved 42°C (37°C for svampe), samt registrere den funktionelle

diversitet ved hjælp af BIOLOG Ecoplates, som et udtryk for den periode, hvor der forefindes et forhøjet niveau i antallet af termotolerante mikroorganismer.

Referencer

Alwis K.U., Mandryk J & Hocking D., **1999**. Exposure to biohazards in wood dust: Bacteria, Fungi, Endotoxin, and (1→3)-β-D-glucans. *Appl. Occupatio. Environ Hyg.* **14**: 598-608.

Curran H.R., F.R. Evans, **1945**. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. *J Bacteriol.* **46**: 335-346.

Dees P.M., Ghiorse W.C., **2001**. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiol Ecol.* **35**:207-216.

Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T.-H., **1993**. *Compendium of Soil Fungi*. IHW-Verlag, Eching.

Eduard, W., Douwes, J., Mehl, R., Heederik, D., and Melbostad, E., **2001**. Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-response relations with eye and respiratory symptoms. *Occupational and Environmental Medicine* **58**, 113-118.

Gregory P.H.: 1973, II. Spores: Their Properties and Sedimentation in Still Air. In *The Microbiology of the Atmosphere*. Clarke, Doble & Brendson Ltd., Plymouth.

Heller, D. and Rabe, R., **2001**. Ausbreitung von Bioaerosolen aus Kompostierungsanlagen unterschiedlicher Bauart. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* **61**, 245-253.

Herr C.E.W., Nieden zur A., Jankofsky M., Stilianakis I N., Boedeker R-H, Eikmann TF., **2003**. Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents: a cross sectional study.. *Occup. Environ. Med.*, May 2003; **60**: 336-342. WWW.occenvmed.com.

Jesenska Z, E. Pieckova, D Bernat, **1993**. Heat resistance of fungi from soil. *Int J Food Microbiol* **19**:187-92

Johnsen K, Nielsen P., **1999**. Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation. *FEMS Microbiol Lett* **173**:155-62.

Keller, L. and Bidochka, M. J., **1998**. Habitat and temporal differences among soil microfungus assemblages in Ontario. *Canadian Journal of Botany* **76**, 1798-1805.

- Kenyon, E. M., Russell, L. H. and McMurray, D. N., **1984**. Isolation of pathogenic *Aspergillus* species from commercially-prepared potting media. *Mycopathologia* **87**, 171-173.
- Latge J.P., **2001**. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **9**:382-9
- Leslie C.E., Flannigan B. and Milne L.J.R., **1988**. Morphological studies on clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Veteri. Myc.* **26**:335-341.
- Madelin TM, Johnson HE., **1992**. Fungal and actinomycete spore aerosols measured at different humidities with an aerodynamic particle sizer. *J Appl Bacteriol.* **72**:400-9.
- Midtgård U., Simonsen L., & Knudsen L.E., **1999**. Toksikologi i arbejdsmiljøet. Bind 1 277 sider. Arbejdsmiljøinstituttet.
- Nielsen, B. H., Nielsen, E. M. and Breum, N. O., **2000**. Seasonal variation in bioaerosol exposure during biowaste collection and measurements of leaked percolate. *Waste Management* **18**, 64-72.
- Norris T.B., Wraith J.M., Castenholz R.W., McDermott T.R., **2002**. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl Environ Microbiol.* **68**:6300-9.
- Paixao S.M., Santos P., Baeta-Hall L., Tenreiro R., Anselmo A.M., **2003**. Alternative inocula as activated sludge surrogate culture for a toxicity test. *Environ Toxicol* **18**:37-44
- Passman F.J., **1983**. Recovery of *Aspergillus fumigatus* aerospora from municipal sewage sludge composting operations in the state of Maine. *Mycopathologia* **83**, 41-51.
- Richardson R.E., C.A. James, V.K. Bhupathiraju and L. Alvarez-Cohen, **2002**. Microbial activity in soils following steam treatment. *Biodegradation* **13**: 285-295
- Sigsgaard, T. Kjærgaard, S.K., Molhave, L. Bonefeld-Jørgensen, E.C., Bonlokke, J.H., Juto, J-E, Stridh, G. and Lofstedt, H., **2003**. Glucan spiking of office dust increases nasal inflammation in volunteers. 5th International Conference on Bioaerosols, fungi, bacteria, mycotoxins and human health. Saratoga Springs, pp.62-63.
- Staib, F., Folkens, U., Tompak, B., Abel, Th. and Thiel, D. **1978**. A Comparative Study of Antigens of *Aspergillus fumigatus* Isolates from Patients and Soil of Ornamental Plants in the Immunodiffusion Test. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene, Erste Naturwissenschaftliche Abteilung Orig.* **A 242**, 93-99.

Thorn J., Beijer L & Rylander R., **2001**. Effects after inhalation of (1→3)-β-D-glucans in healthy humans. *Mediators of Inflammation* 10:173-178.

Yocum M. W., Saltzman A.R., Strong D.M., Donaldson J, Ward G Jr, Walsh F, Cobb O Jr, Elliott R., **1976**. Extrinsic Allergic alveolitis after *Aspergillus fumigatus* inhalation. *Am. J Med* 61: 939-945.

Bilag 1

Aspergillus fumigatus								
25°C					37°C			
Sample	t=2	t=3	t=4	t=5	t=2	t=3	t=4	t=5
1	27,5	246.5 (26.8)	82.9 (28.3)	12.6 (7.8)	-	282.8 (50.2)	79.4 (22.7)	13.5 (1.5)
2	13,8	139.1 (68.2)	7.7 (1.2)	1.8 (<0.1)	-	134.3 (33.3)	37.3 (3.9)	6.0 (1.6)
3	3,4	3.5 (1.2)	20.2 (8.3)	147.2 (49.6)	-	8.0 (0.6)	27.3 (7.8)	128.5 (34.0)
4	0	0.5 (0.9)	0	0.4 (0.3)	-	0	0.1 (0.2)	0.1 (<0.1)
5	456,9	2.7 (0.7)	0.3 (0.2)	1.5 (0.3)	-	4.8 (0.8)	0.3 (<0.1)	2.8 (0.4)
6	27,8	0.2 (0.2)	42.9 (5.0)	0.4 (0.1)	-	0.2 (<0.1)	69.6 (17.5)	1.5 (0.2)
7	19,6	0	0	2.0 (0.3)	-	0.3 (0.2)	94.1 (45.3)	3.0 (0.3)
8	0	0	0	0	-	0	<0.1 (<0.1)	0
KUPA-688			0					0
KUPA-191			0					0
KUPA-173			0					0
KUPA-220			0				<0.1 (<0.1)	
Filamentous fungi (others than A. fumigatus)								
25°C					37°C			
Sample	t=2	t=3	t=4	t=5	t=2	t=3	t=4	t=5
1	24,2	35.7 (15.6)	81.1 (38.5)	54.5 (14.0)	-	0	7.3 (5.3)	0.8 (0.2)
2	17,3	29.8 (6.7)	171.8 (14.7)	51.7 (7.1)	-	1.0 (1.0)	2.1 (2.1)	1.3 (0.4)
3	40,4	94.9 (8.9)	52.8 (7.2)	61.0 (24.7)	-	0.6 (0.1)	3.4 (1.4)	16.7 (7.2)
4	67,2	75.6 (11.1)	77.4 (2.1)	112.5 (23.5)	-	1.6 (0.5)	0.8 (0.3)	0.7 (0.2)
5	56,7	1.5 (0.1)	0.2 (0.3)	2.3 (0.2)	-	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	0.6 (0.1)
6	8,4	1.4 (0.1)	14.2 (4.0)	4.1 (0.5)	-	<0.1 (0.1)	4.2 (1.1)	0.2 (<0.1)
7	13,6	2.4 (0.7)	8.2 (6.1)	2.9 (0.2)	-	<0.1 (<0.1)	3.0 (4.4)	0.9 (0.1)
8	25,3	6.9 (0.5)	19.5 (5.7)	5.6 (0.5)	-	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)	0.1 (<0.1)
KUPA-688			570.4 (128.8)				3.4 (1.6)	
KUPA-191			7.3 (1.3)				0	
KUPA-173			154.2 (42.2)				1.8 (0.8)	
KUPA-220			8.7 (1.2)				<0.1 (<0.1)	
Yeast fungi								
25°C					37°C			
Sample	t=2	t=3	t=4	t=5	t=2	t=3	t=4	t=5
1	-	12.9 (10.3)	25.7 (12.2)	13.9 (4.1)	-	0	0	0
2	-	13.8 (3.1)	115.5 (29.9)	13.0 (2.6)	-	0	0.7 (0.6)	0
3	-	3.4 (0.8)	20.6 (5.8)	14.9 (7.7)	-	0	0	0
4	-	11.5 (1.4)	20.0 (8.8)	11.4 (2.7)	-	<0.1 (<0.1)	<0.1 (<0.1)	0
5	-	0.2 (0.1)	0.2 (0.1)	1.9 (0.7)	-	0	0	0
6	-	0.5 (0.1)	4.0 (1.2)	2.5 (0.4)	-	0	0	0
7	-	0.2 (0.1)	0.4 (0.3)	4.5 (0.9)	-	0	0	0
8	-	2.8 (0.3)	1.9 (0.2)	2.9 (1.9)	-	0	0	0
KUPA-688			46.0 (0.5)				0	
KUPA-191			0.6 (0.1)				0	
KUPA-173			71.3 (12.5)				0	
KUPA-220			1.1 (0.2)				0	
KUPA-688 is taken at Højstrup (depth approx. 5 cm)								
KUPA-191 is taken at Højstrup (depth approx. 50 cm)								
KUPA-173 is taken at Grundfør (depth approx. 5 cm)								
KUPA-220 is taken at Grundfør (depth approx. 42 cm)								