



**DTU Fødevareinstituttet**

**Notat fra DTU Fødevareinstituttet:  
Fareprofil for substrater til insektopdræt (hazard identification)**

**Notat fra DTU Fødevareinstituttet:  
Fareprofil for substrater til insektopdræt (hazard identification).**

**Opdrag som angivet i DTU Fødevareinstituttets arbejdsprogram for 2017:**

*"Formålet er at oparbejde viden og foretage risikovurderinger omkring foder- og fødevarer sikkerhed af insekter, særligt mht. anvendelse af substrater til insekter, herunder biprodukter fra den animalske produktion. Fødevarestyrelsen oplever p.t. stor interesse for markedsføring af insekter som fødevarer og foder, inklusiv opdræt af insekter til disse formål. Insekter eller andre opdrættede dyr må ikke fodres med eller opdrættes på animalske produkter, f.eks. rester af kød eller fisk, køkkenaffald, husdyrgødning, affald fra rensningsanlæg eller lignende. Der er derfor brug for risikovurderinger i relation til fødevarer sikkerheden af det foder, der anvendes til insektproduktionen, således at denne viden kan bruges til at ændre EU regler på området."*

**Specifikation af opgaven:**

På baggrund af efterfølgende dialog mellem Fødevarestyrelsen (FVST) og DTU Fødevareinstituttet præciseres, at det ikke er muligt inden for de givne rammer og på det eksisterende datagrundlag at udarbejde en fuldstændig risikovurdering af forskellige substrater til insekter og efterfølgende anvendelse af insekterne som enten foder eller fødevarer. Nærværende opgave vil omfatte en analyse af mulige farer i forskellige typer af substrater, både lovlige og ulovlige substrater. De ulovlige substraters farer kortlægges med henblik på dokumentation for evt. ændring af foderlovgivningen på sigt. Analysen udarbejdes for en række insektarter. Foder til insekterne benævnes substrater i denne opgave.

**Indhold:**

Opgaven indeholder indledningsvist et baggrundsafsnit med en beskrivelse af nuværende muligheder for fodring af insekter og anvendelse. Herunder regler der vedrører substratanvendelse til opdræt af insekter samt anvendelse af insekter som foder og fødevarer. Dernæst følger en kort beskrivelse af datagrundlag og usikkerhed vedr. besvarelsen samt resumé. Selve besvarelsen består af fareprofil for substrater til insektopdræt grupperet i dels godkendte substrater; 1) tørfoder rettet mod insekter, 2) 'tidligere fødevarer' – f.eks. bageri og kagerester, 3) vegetabiliske bi- og restprodukter, 4) mask, 5) animalske biprodukter - kategori 3 materiale og dels i ikke-godkendte substrater; 6) køkken og madaffald, 7) animalske biprodukter - kategori 3 materiale fra slagterier, 8) 'tidligere fødevarer' med animalsk indhold, 9) husdyrgødning og indhold fra fordøjelseskanalen og 10) slam. Dernæst beskrives indhold af farer i insekter opdrættet på kontamineret substrat. Herunder ses på effekt af behandling i form af nedfrysning, tørring og varmebehandling. Endelig ses kort på fareindhold i resterne fra insektproduktion.

DTU Fødevareinstituttet  
Afdelingen for Mikrobiologi og Produktion & Afdelingen for Risikovurdering og Ernæring  
Juli 2018

Annette Nygaard Jensen  
Karin Kristiane Nørby

FAREPROFIL FOR SUBSTRATER TIL INSEKTOPDRÆT (HAZARD IDENTIFICATION): .....	5
BAGGRUND: .....	5
Nuværende muligheder for fodring af insekter og anvendelse. ....	5
Regler der vedr. substratanvendelse til opdræt at insekter:.....	5
Animalske biprodukter (kategori 3) som MÅ anvendes som fodermiddel til insekter:.....	6
Animalske biprodukter (kategori 3) som IKKE må anvendes som fodermiddel til insekter:.....	7
Materialer der er tilladt at anvende som fodermiddel til insekter:.....	7
Materialer der er forbudt at anvende eller markedsføre som foder:.....	8
Uønskede stoffer i foder: .....	8
Regler der vedr. anvendelse af insekter som foder og fødevarer: .....	8
Insekter som foder .....	8
Insekter som fødevarer .....	9
BESVARELSE: .....	10
Indhold, datagrundlag og usikkerhed vedr. besvarelsen.....	10
Resumé: .....	10
Fareprofil for substrater til insektopdræt:.....	13
Godkendte substrater .....	13
Gruppe 1 (tørfoder rettet mod insekter).....	13
Gruppe 2 ('tidligere fødevarer' – f.eks. bageri og kagerester).....	16
Gruppe 3 (vegetabiliske bi- og restprodukter – f.eks. grøntsagsskræller og bladgrønt).....	17
Gruppe 4 (mask).....	18
Gruppe 5 (animalske biprodukter - kategori 3 materiale – f.eks. blodprodukter af ikke-drøvtyggere) .....	20
Ikke-godkendte substrater .....	21
Gruppe 6 (køkken og madaffald).....	21
Gruppe 7 (animalske biprodukter - kategori 3 materiale fra slagterier).....	23
Gruppe 8 ('tidligere fødevarer' med animalsk indhold) .....	24
Gruppe 9 (f.eks. husdyrgødning og indhold fra fordøjelseskanalen) .....	25
Gruppe 10 (f.eks. slam) .....	29
Indhold af farer i insekter opdrættet på kontamineret substrat:.....	31
Biologiske farer .....	32
Kemiske farer .....	36
Insekter høstet i larvestadiet.....	36
Insekter høstet i voksenstadiet .....	39
Effekt af behandling: .....	39

Nedfrysning (aflivning):.....	39
Biologiske farer .....	39
Kemiske farer.....	40
Tørring: .....	40
Biologiske farer .....	40
Kemiske farer.....	41
Varmebehandling: .....	41
Biologiske farer .....	41
Kemiske farer.....	43
Restproduktet fra insektproduktion:.....	43

## **FAREPROFIL FOR SUBSTRATER TIL INSEKTOPDRÆT (HAZARD IDENTIFICATION):**

### **BAGGRUND:**

#### **NUVÆRENDE MULIGHEDER FOR FODRING AF INSEKTER OG ANVENDELSE.**

#### **Regler der vedr. substratanvendelse til opdræt af insekter:**

Opdræt af insekter og deres anvendelse som foder og fødevarer er underlagt foder- og fødevarerlovgivningen. Insektopdræt skal følge reglerne for fødevarerproducerende dyr, hvis insekterne skal indgå i foder- og fødevarerækken. Når insekter i stedet bruges som foder til ikke-fødevarerproducerende dyr, som pelsdyr og selskabsdyr, følges foderreglerne for foder til dyr, der ikke anvendes i fødevarerproduktionen.

Foderlovgivningen skal sikre, at foderet ikke udgør en sundhedsrisiko og udgøres af en række forordninger og et direktiv. Overordnet er kommerciel produktion, handel, oplagring og transport samt primærbedrifter med opdrættede dyr underlagt regler for kvalitetsstyring baseret på HACCP principperne i foderhygiejneforordningen (183/2001).

Dertil kommer en række af de substansregler, der er for f.eks. anvendelse af råvarer som foder. Nogle hovedforordninger er bl.a.:

- EU-godkendte fodermidler, jf. fodermiddelfortegnelsen (forordning 68/2013, som ændret ved forordning 2017/1017) samt fodermiddelregistret,
- Regler om hvilket foder af animalsk oprindelse, der kan fodres til forskellige dyrearter jf. TSE forordningen (forordning 999/2001),
- Markedsføringsforordningen, forordningen om markedsføring og anvendelse af foder (forordning 767/2009),
- Direktivet om uønskede stoffer, direktiv 2002/32/EF, jf. (foderbekendtgørelsen 850 af 27/06/2017),
- Fremstilling og omsætning af foder af animalsk oprindelse jf. forordningerne om animalske biprodukter (forordningen om animalske biprodukter 1069/2009 & gennemførelsesforordningen 142/2011).

Foderlovgivningen indeholder således både lister over materialer som er godkendte som fodermidler (2017/1017), og materialer som det er forbudt at markedsføre eller anvende som foder, bl.a. afføring, urin og spildevandsslam (767/2009).

Animalske produkter vurderes at udgøre en væsentlig risiko for overførsel af smitsomme husdyrsygdomme, hvilket medfører, at der er en række restriktioner mht. hvilke fodermidler, der er tilladte som foder til opdrættede dyr, inkl. insekter.

Animalske produkter, som ikke er bestemt til konsum, betegnes animalske biprodukter, jf. forordningen om animalske biprodukter (1069/2009). Det gælder f.eks. tidligere fødevarer med animalsk indhold. Animalske biprodukter inddeles i 3 kategorier afhængig af risiko. Kategori 1 materiale udgør den største risiko, primært mht. overførsel af såkaldte transmissible spongiforme encephalopatiser (TSE) såsom kogalskab (BSE). Kategori 3 materiale udgør den laveste risiko.

Det er kun kategori 3 materiale, der må anvendes til fremstilling af fodermidler, og fodermidlerne skal fremstilles i overensstemmelse med de specifikke krav for de enkelte typer fodermidler, jf. artikel 21 og

bilag X i gennemførselsforordningen (142/2011). Det strengeste krav til behandling, dvs. tryksterilisering (metode 1), gælder for fremstilling af forarbejdet animalsk protein (forkortes "PAP") af animalske biprodukter fra pattedyr. Hvad angår fremstilling af insekt-PAP, er der mulighed for at anvende andre forarbejdningsmetoder (metode 1-5 og 7, jf. kap. III i bilag IV i gennemførselsforordningen 142/2011). Behandlingskravene følges bl.a. med mikrobiologiske krav til slutproduktet med hensyn til indholdet af salmonella og enterobakterier, hvor der er nultolerance for salmonella i 25 g og niveauet af enterobakterier er uacceptabelt hvis der er  $\geq 300$  per 1 g i 1 ud af 5 prøver eller hvis mere end 2 af 5 prøver har et niveau mellem 10 og 299 per g.

TSE forordningens bilag IV (999/2001, seneste ændret ved 2017/893), også refereret til som "foderforbuddet", angiver yderligere skærpede regler mht. hvilke dyr, som bestemte fodermidler må anvendes til fodring af, med henblik på at forebygge kogalskab og lign. sygdomme hos andre dyrearter. Foderforbuddet har regler for, hvilke fodermidler af animalsk oprindelse, der kan anvendes til opdræt af drøvtyggere, svin, insekter mv. Eksempelvis er det forbudt at anvende alle typer PAP fra drøvtyggere til fødevareproducerende dyr, mens det er tilladt at anvende fiskemel (én type PAP) og blodprodukter fra ikke-drøvtyggere til alle fødevareproducerende dyr (herunder insekter) undtagen drøvtyggere. Fra drøvtyggere kan der kun anvendes huder og skind behandlet ved hydrolyse samt afsmeltet fedt til fødevareproducerende dyr inkl. drøvtyggere.

Derudover er det ifølge artikel 11 i forordningen om animalske biprodukter (1069/2009) også forbudt at fodre landdyr og opdrættede fisk af en given art med forarbejdet animalsk protein afledt af samme art, det såkaldte "kannibalismeforbud". Det gælder også for insekter

### **Animalske biprodukter (kategori 3) som MÅ anvendes som fodermiddel til insekter:**

#### Visse tidligere fødevarer

Visse "tidligere fødevarer" med animalsk indhold er tilladte at anvende som fodermidler til opdrættede dyr jf. bilag X kap. II, sektion 10, i gennemførselsforordningen (142/2011). Det er tidligere fødevarer, der indeholder mælk, mælkebaserede produkter, produkter afledt af mælk, æg, ægprodukter, honning, afsmeltet fedt, kollagen eller gelatine. Produkterne skal være forarbejdede som fødevarer i overensstemmelse med fødevarelovgivningen, og de skal hele tiden holdes adskilt fra andet animalsk materiale som kød og fisk.

Virksomhedens egenkontrol skal sikre total adskillelse mellem de fødevarer, der må leveres til foderbrug, og de fødevarer, der ikke må leveres til foderbrug. Når en fødevarevirksomhed ønsker at levere tidligere fødevarer til foderbrug, skal den registreres til denne aktivitet

#### Andre animalske biprodukter

En række materialer af animalsk oprindelse må anvendes som substrat til insekter, når de forarbejdes som fodermidler efter foderreglerne og ikke som fødevarer efter fødevarereglerne jf. afsnittet om "tidligere fødevarer".

Disse materialer af animalsk oprindelse skal forarbejdes til fodermidler i overensstemmelse med kravene i forordningerne om animalske biprodukter (1069/2009 artikel 10 samt 142/2011 bilag IV og X) og følge reglerne i TSE-forordningen (999/2001, artikel 7 samt bilag IV) før det kan anvendes til foder. Hvilke dyrearter disse fodermidler vil kunne anvendes til, vil afhænge af udgangsmaterialet. Det gælder for følgende fodermidler:

- Afsmeltet fedt og fiskeolie
- Æg og ægprodukter
- Mælk, mejeriprodukter, råmælk (colostrum)
- Kollagen og gelatine af ikke-drøvtyggere
- Hydrolyseret protein af ikke-drøvtyggere samt af huder og skind af drøvtyggere
- Dicalciumfosfat og tricalciumfosfat
- Blodprodukter af ikke-drøvtyggere og
- Fiskemel (PAP)

### **Animalske biprodukter (kategori 3) som IKKE må anvendes som fodermiddel til insekter:**

#### Tidligere fødevarer

"Tidligere fødevarer" der indeholder nedenstående animalske produkter regnes for at udgøre en smitterisiko hvis de anvendes som fodermidler til opdrættede dyr.

Det drejer sig om indhold af:

- Honning, æg, mælk og afledte produkter heraf, afsmeltet fedt, kollagen og gelatine i *uforarbejdet stand*, f.eks. dej der indeholder rå æg
- Kød og
- Fisk

#### Køkken- og madaffald

Alle typer affaldsfødevarer fra køkkener og restauranter eller fodermidler, der indeholder eller er afledt af køkken- og madaffald, må ikke anvendes til fodring af fødevarerproducerende dyr inkl. insekter, jf. artikel 11 i forordningen om animalske biprodukter (1069/2009). Årsagen er at kontakt til animalske produkter som kød og fisk ikke kan udelukkes, selvom affaldet umiddelbart kun indeholder vegetabiliske dele.

#### Animalske biprodukter fra slagterier

Det er ikke tilladt at anvende rå materiale fra dyr som substrat til insekter. Fodermidler der er fremstillet af animalske biprodukter efter kravene herfor (biproduktforordningen 1069/2009 artikel 10 samt 142/2011 bilag IV og X; TSE-forordningen 999/2001, artikel 7 samt bilag IV) må ikke anvendes med mindre der er tale om de fodermidler, der er nævnt i underafsnittet "Andre animalske biprodukter" under afsnittet "*Animalske biprodukter (kategori 3) som MÅ anvendes som fodermiddel til insekter:*".

### **Materialer der er tilladt at anvende som fodermiddel til insekter:**

Generelt er det kun tilladt at anvende EU-godkendte fodermidler, jf. fodermiddelfortegnelsen (forordning 68/2013, som ændret ved forordning 2017/1017) som substrat til opdrættede dyr, herunder insekter. Ved markedsføring af nye fodermidler som ikke er anført på listen, skal disse først anmeldes til fodermiddelregistret (link: <http://www.feedmaterialsregister.eu/index.php?page=Register>). Bemærk, at fodermidler, der er anmeldt til registret, ikke er vurderede. Dette fremgår af ansvarsfraskrivelsen, der står i forbindelse med præsentationen af registret.

Vegetabiliske bi- og restprodukter må anvendes som fodermiddel, når det sikres, at de har været helt adskilte fra animalske produkter pga. smitterisikoen herfra. Generelt gælder at en fødevarer virksomhed, der leverer rester til foderbrug, skal registreres til denne aktivitet.

**Materialer der er forbudt at anvende eller markedsføre som foder:**

Markedsføringsforordningens bilag III, kapitel I (767/2009), indeholder en liste over materialer, der er forbudt at anvende eller markedsføre som foder.

Blandt disse materialer er "emballage og dele af emballage fra fødevareindustrien". Dette udgangspunkt, som er en nultolerance for emballagerester, kan vanskeliggøre genanvendelse af fødevarerester. I fodermiddelfortegnelsen, bilaget, del B (2017/1017), er der en ordliste over processer, som kan bruges til behandling af fodermidler. I ordlisten er netop optaget proces nr. 69, "Mekanisk fjernelse af fødevareremballage".

Der er imidlertid ikke taget stilling til, om minimale mængder af emballage, hhv. hvilke former for emballage, der vil kunne tillades i foder og på hvilke betingelser, f.eks. til insekter. Vil det f.eks. være acceptabelt, at foder, der er produkter fra kageindustrien eller fra bagere, indeholder rester af papir, der hænger fast i glasuren på kagerne? Ved en FVO-mission i 2009 (nu Sante F) på foderområdet blev påpeget, at lagkagepapir og muffinsforme var uønskede emballagerester i foder.

Fæces, urin og separeret indhold fra fordøjelseskanalen hhv. spildevandsslam er ligeledes forbudt at anvende til foder jf. markedsføringsforordningen (767/2009), bilag III, kapitel I, punkt 1 hhv. 5.

Husdyrgødning er kategori 2 materiale jf. biproduktforordningen (1069/2009) og må derfor ikke anvendes til fremstilling af foder, hvilket også følger af markedsføringsforordningens bilag III, kapitel I, punkt 1.

**Uønskede stoffer i foder:**

Foderlovgivningen indeholder regler om, hvor stort indholdet af uønskede stoffer må være i foder. Reglerne står i direktivet om uønskede stoffer, direktiv 2002/32/EF, f.eks. tungmetaller, plantetoksiner, organiske klorforbindelser og dioxiner/PCB'er. Grænseværdierne for indholdet af uønskede stoffer står i direktivets bilag I, som er offentliggjort i forordningsform.

Der er ikke fastsat grænseværdier for indholdet af uønskede stoffer i insekter. I stedet skal anvendes grænseværdierne for fodermidler, og – i de tilfælde hvor der er fastsat grænseværdier for fodermidler af animalsk oprindelse – skal grænseværdierne herfor anvendes.

**Regler der vedr. anvendelse af insekter som foder og fødevarer:****Insekter som foder**

Restriktionerne i foderforbuddet (bilag IV i forordning 999/2001) og i forordningerne om animalske biprodukter (1069/2009 og 142/2011) sætter begrænsninger for anvendelsen af insekter som foder. Døde insekter kategoriseres som kategori 3-materiale, jf. artikel 10, litra l), i forordningen om animalske biprodukter (1069/2009). Det er derfor ikke tilladt at anvende insekter som f.eks. kun er frosne til fodring af opdrættede dyr. Insekter skal forarbejdes til insekt-PAP og opfylde kravene herfor (dvs. forarbejdningsmetode 1-5 og 7, jf. kap. III i bilag IV i gennemførselsforordningen 142/2011). Anvendelsesmulighederne for insekt-PAP er dernæst begrænset af reglerne i foderforbuddet i TSE forordningen (999/2001). Insekt-PAP fra syv forskellige insektarter (stueflue, sort soldaterflue, melskrubbe, hønseribille, sribet fårekilling, hus- og steppefårekilling) må fra 1. juli 2017 anvendes som foder til akvakulturdyr. Tidligere har insekter ikke kunnet opfylde kravet for 'PAP fra ikke-drøvtyggere'.



Afsmeltet fedt fra insekter er ikke omfattet af foderforbuddet og kan anvendes som fodermiddel, hvis det er fremstillet efter reglerne i bilag X i gennemførselsforordningen for animalske biprodukter (142/2009).

Dermed er det i øjeblikket tilladt at fodre med følgende produkter fremstillet af døde insekter behandlet efter reglerne i forordningerne om animalske biprodukter (1069/2009 og 142/2011):

- insekt-PAP (fra 7 arter) må anvendes til fodring af akvakulturdyr (og til pelsdyr og selskabsdyr)
- afsmeltet fedt fra insekter må anvendes til fodring af alle dyrearter, inkl. insekterne selv.

I forhold til at få lempet lovgivningen således at insekt-PAP udover akvakulturer også vil kunne anvendes til ikke-drøvtyggere, dvs. f.eks. svin og fjerkræ, er en af forhindringerne at få etableret analyseteknikker, der sikkert kan fastslå hvilken dyreart PAP stammer fra, bl.a. ad hensyn til kannibalismeforbuddet jf. ifølge EU's strategi for insekter "Strategic Safety Concept for Insects as Feed" fra november 2016.

Levende insekter, der ikke er patogene for mennesker og dyr, fremgår af EU's fortegnelse over godkendte fodermidler som fodermiddel 9.16.1 (68/2013 ændret ved forordning 2017/1017), og er ikke umiddelbart omfattet af foderforbuddet i forhold til fodring til ikke-drøvtyggere dvs. grise og fjerkræ. I forhold til fodring af insekter til drøvtyggere, rammes anvendelsen af insekter inkl. de levende dog af det generelle forbud mod fodring af drøvtyggere med proteiner fra dyr (artikel 7, 999/2001).

### **Insekter som fødevarer**

Insekter som fødevarer i EU har kun haft begrænset omfang før 15. maj 1997 og insekter regnes derfor som 'novel food', hvor der kræves en godkendelse baseret på en risikovurdering før produktet kan markedsføres jf. Novel Food forordningen (258/1997). Forordningsteksten inkluderer imidlertid kun formuleringen 'isoleret fra dyr', hvorved hele dyr (ingen dele af dyret er fjernet) kan tolkes som værende udenfor kravene om risikovurdering. Dette smuthul vil blive lukket i forbindelse med en opdatering af Novel Food forordningen gældende fra 1. januar 2018. Efter denne dato vil der være krav om indsendelse af en ansøgning om godkendelse – også for de hele insekter.

## BESVARELSE:

### INDHOLD, DATAGRUNDLAG OG USIKKERHED VEDR. BESVARELSEN

Opdrættede insekter vil via deres fodersubstrat eksponeres til forskellige mikrobiologiske, kemiske og fysiske farer. Notatet forsøger at afdække disse farer, for forskellige typer af substrater som vurderes relevante ift. insektproduktion, og beskrive det forventede indholds niveau i substratet. Substraterne er således inddelt i forskellige grupper, der dækker dels lovlige (gruppe 1-5) og dels ulovlige substrater (gruppe 6-10) jf. baggrund.

I forhold til at vurdere foder- og fødevarer sikkerheden af insektprodukter afhængig af substratvalg, er det væsentligt at kende det potentielle indholds niveau af fare i insektet efter eksponering til den pågældende fare. Beskrivelsen omfatter derfor ikke indhold af evt. allergener, insekttoksiner eller insektpatogener, som er naturligt forekommende i insekter, hvor der henvises til EFSA opinion ("Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed") fra 2015. Desuden fokuseres primært på de syv insektarter som er godkendt til fiskefoder (se Tabel 6) og det udviklingstrin insekterne normalt anvendes i, dvs. larvestadie (melorme og fluer) og voksenstadie (fårekylinger og græshopper). I det omfang det er muligt adresseres evt. effekt af forskellige behandlingstrin som nedfrysning, tørring og varmebehandling mht. fareindhold.

Grundet den eksisterende EFSA opinion fra 2015 som dækker emnet, er der for brug til dette notat foretaget søgning i den åbne litteratur fra 2014 til maj 2018, begge inkl. (Scopus<sup>1</sup>), samt gjort brug af data fra de danske styrelses overvågningsprogrammer.

De biologiske farer undersøgt i henholdsvis substrater og insekter i dette notat er baseret på EFSA opinion 2015 samt anmeldeligt smitsomme husdyrsygdomme (Bek 1332/2016). Ligeledes er de kemiske farer baseret på EFSA opinion 2015 samt Uønskede stoffer i foderstoffer (Parlamentets og Rådets direktiv 2002/32/EF).

Besvarelsen er begrænset ved, at der særligt i forbindelse med beskrivelse af mulige farer i de ulovlige substrater, ofte mangler data som vedrører farer i forhold til foderanvendelse. Fordi der netop er tale om pt. ulovligt foder, vil fokus typisk være på anden anvendelse af materialet, hvorfor vurderinger og data vil være i relation dertil. Derudover er der stadig kun i begrænset omfang data som viser fareindhold i opdrættede insekter efter eksponering til mulige farer og i hvilket omfang forskellige farer kan kontrolleres i forbindelse med et forarbejdningsstrin. Dette skyldes bl.a. at insektområdet stadig er nyt og til dels at den eksisterende insektproduktion er baseret på fodergodkendte substrater, hvor farerne er begrænsede. Dette samtidig med at der også er en række restriktioner ift. hvilke substrater der må anvendes i forsøgsøjemed, som dermed begrænser generering af nye data.

## RESUMÉ:

Notatet forsøger at afdække indholdet af mikrobiologisk, kemiske og fysiske farer i hhv. lovlige og ulovlige substrater som vurderes relevante ift. insektproduktion. Dernæst ses i det omfang det er muligt, på indholdet af disse farer i insekterne efter eksponering til farerne fra fodersubstratet, samt evt. effekt af forskellige forarbejdningsstrin.

---

<sup>1</sup> Baseret på komparativ søgning i databaserne Scopus, PubMed og Web of Science er det vurderet at litteraturen til dette notat er dækket af søgningen i Scopus alene

#### Lovlige substrater:

Ved anvendelse af konventionelle tørfoderblandinger (gruppe 1) overholdes den gældende foderlovgivning, der bl.a. har en lang række restriktioner for at undgå spredning af transmissible spongiforme encephalopatiser (TSE). Derudover er der særlig fokus på forekomst af salmonella og det potentielle indhold af mykotoksiner i korn. 'Tidligere fødevarer' (gruppe 2) burde umiddelbart være i orden rent fødevareressikkerhedsmæssigt, men ændrede opbevaringsforhold og brudt emballage kan evt. begunstige vækstbetingelserne for mikrobielle forureninger. For bageri- og kagerester vil det typisk være ingredienserne, som evt. har indhold af *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. og mykotoksiner, mens polyaromatiske hydrocarboner (PAH) evt. fremkommer ved bagning. Derudover er det fysisk frasortering af emballage (plast, papir og aluminiumsfolie) som kan være problematisk. Vegetabilsk bi- og restprodukter, f.eks. grønsagsskræller og bladgrønt (gruppe 3) har evt. en lidt øget risiko for smitstoffer fra miljøet, hvis der er tale om skræller og yderblade, som normalt ikke spises, mens testede grønsager typisk har en meget lav forekomst af *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter jejuni* og *Escherichia coli*. Norovirus kan også forekomme i grønt og frugt men vil være af human oprindelse og indikerer generelt dårlig hygiejne. Ellers er der fokus på niveauet af pesticidrester, som overskrider grænseværdierne i få procent af testede prøver og som sandsynligvis også her vil være højere i skræller og yderblade. Mask (gruppe 4) er de faste rester af korn som er tilbage fra ølproduktion, hvor opvarmningen vil inaktivere bakterierne med undtagelse af varmetolerante sporer som f.eks. clostridier og *Bacillus* spp., mens evt. pesticider og mykotoksiner ser ud til at forblive i masken. Af lovlig animalske biprodukter (kategori 3 materiale) fra slagterier (gruppe 5) er der sandsynligvis kun få som er af relevans ift. insektopdræt. Hvis man ser på blod (af ikke-drøvtyggere) vil der kunne forekomme antistoffer og evt. selve smitstoffet hvis dyret ikke umiddelbart kan erkendes sygt ved kontrol. Disse burde imidlertid inaktiveres ved den påkrævede varmbehandling. Kemiske forureninger burde ikke give anledning til problemer.

#### Ikke-godkendte substrater:

Køkken- og madaffald (gruppe 6) vil indeholde rester af animalsk oprindelse med mulig forekomst af zoonoser (f.eks. campylobacter og salmonella) især hvis resterne er rå. Ellers er det særligt risikoen for spredning af smitsomme husdyrsygdomme, som f.eks. afrikansk svinepest og mund-og klovesyge, der gør fodring af fødevarerproducerende dyr med madaffald forbudt. Selvom mange af disse husdyrsygdomme er fraværende i Danmark, kan smittestatus evt. være anderledes for udenlandske produkter. Så selvom sandsynligheden for smitte i madaffald muligvis er ekstrem lav, vil konsekvenserne ved evt. smitteudbrud være enorme, kombineret med usikkerhed mht. om total eliminering af smitstoffer garanteres ved varmebehandling. I forhold til kemiske forureninger, er der kun fundet data for kildesorteret organisk dagrenovation (KOD), der også indeholder andet organisk materiale end deciderede madrester og hvor grænseværdierne er i relation til jordbrugsformål og ikke foder. Her blev der ikke fundet overskridelse af grænseværdier for syv metaller og fire organiske stoffer. Ellers vil madaffaldet kunne indeholde pesticidrester fra vegetabilier og rester af emballage. Slagteriaffald fra svin og fjerkræ (gruppe 7) hører under animalske biprodukter kategori 3, og skal stamme fra raske dyr og burde dermed ikke udgøre en risiko mht. de særligt smitsomme husdyrsygdomme, hvis erkendt ved slagtning. Varmebehandling vil være med til at inaktivere evt. smitstoffer og ved adskillelse fra drøvtyggermateriale undgås risikoen for prioner der er ekstremt varmetolerante. "Tidligere fødevarer" med animalsk indhold som kød og fisk og uforarbejdede æg (f.eks. rå dej) (gruppe 8) udgør en potentiel smitterisiko for smitsomme husdyrsygdomme ligesom køkken- og madaffald. Ellers burde disse produkter som tidligere fødevarer, generelt overholde

mikrobielle fødevarer sikkerhedskriterier og grænseværdier for f.eks. tungmetaller, dog vil evt. brud på kølekæden kunne fremme vækstbetingelserne for bakterier. Husdyrgødning (gruppe 9) indhold af mikrobielle farer vil i høj grad afhænge af dyreart og sygdomsbilledet i besætningen hvorfra gødningen stammer. Der vil bl.a. være zoonotiske bakterier i gødningen, hvoraf nogle vil være resistente overfor antibiotika, men også resistens blandt indikatorbakterierne kan bidrage til spredning af resistensgener. Frisk husdyrgødning udgør den største smitterisiko, da der typisk vil ske et henfald af smitstofferne over tid ved lagring. Det er dog meget svært at angive præcise overlevelsestider for smitstoffer, da det afhænger af gødningstype og opbevaringsforhold mht. fysiske/kemiske faktorer som temperatur, ilt, pH og UV eksponering. Indhold af kemiske farer vurderes ofte kun via rester i jord efter gødning men vil bl.a. inkludere evt. medicinrester fra behandlede dyr. Slam fra rensningsanlæg (gruppe 10) vil afhængig af sygdomsbillede i befolkningen og anlægstype have forskellige niveauer af humanpatogene smitstoffer (bakterier, virus og parasitter). Kemiske forureninger i spildevandsslam kan bl.a. inkludere tungmetaller som cadmium, kviksølv og nikkel; bromerede flammehæmmere, PCB'er, lægemidler og polyflouerede stoffer.

#### Indhold af farer i insekter opdrættet på kontamineret substrat:

Insekterne som er medtaget i denne undersøgelse er primært de syv arter som pt. er tilladt at anvende til fiskefoder. Disse arter har generelt et højt indhold af mikroorganismer ( $10^{7-8}$  CFU/g), hvoraf nogle er insektspecifikke mens andre kan optages gennem føden. Disse inkluderer både patogener og opportunistiske patogener samt toksindannende organismer og tilhører bl.a. slægterne enterokokker, streptokokker, stafylokokker, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* og under Enterobacteriaceae bl.a. *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Shigella* og *Yersinia*. I insekter opdrættet på substrater af foderkvalitet er der typisk fravær af *Salmonella* spp. og *Listeria monocytogenes*, mens der fortsat kun er begrænset viden om i hvilket omfang smitstoffer optages og persisterer i insekter efter eksponering fra substratet. Insekters mikrobielle indhold ser delvist ud til at afspejle substratet, mens en vis del synes upåvirket af substratet, og samtidig ses ofte store variationer fra batch til batch. Forsøg med dyrkning af stuefluellarver på spiket gødning, viste at larverne havde højt indhold af salmonella og campylobacter efter 1 dag, men at bakterierne ikke kunne påvises dag 4 med enkelte undtagelser (campylobacter). Mange studier har vist, at fluer kan fungere som passiv vektor for smitstoffer, men ift. opdræt, er det larverne som anvendes og om vertikal transmission fra voksne fluer til æggene er mulig er ikke fuldt afklaret. Med hensyn til kemiske farer ser det særligt ud til at tungmetaller som cadmium og bly akkumulerer i larver, mens f.eks. mykotoksiner og pesticider udskilles af insekterne igen eventuelt efter metabolisering.

#### Effekt af behandling:

Insekter kan aflives ved frysning, opvarmning eller hakning og forinden er larverne ofte sultet for at tømme tarmen. Dette ser ikke ud til at have nogen effekt mht. at reducere det mikrobielle indhold i larver, mens det muligvis har en effekt mht. udskilles af f.eks. pesticidrester og mykotoksiner. Insekter tørres ofte, hvilket reducerer vandaktiviteten til et niveau der hindrer mikrobiel vækst og dermed stabiliserer produktet. Men mikroorganismene vil ofte persistere, og der ses ofte høje mikrobielle niveauer i tørrede insektprodukter. Varmebehandling af insekter vil afhængig af temperatur og tid have en reducerende effekt på det mikrobielle indhold. Afrapporterede resultater indikerer dog, at det kan være nødvendigt at teste effekt for de enkelte insektarter, og at gængse metoder ofte har begrænset effekt ift. bakteriesporer, da disse er forholdsvis varmeresistente. Lave niveauer af bakteriesporer i sig selv er ikke et problem, så længe der ikke opstår gunstige vækstbetingelser, hvor de vil kunne vokse

op til de niveauer hvor der er risiko for toksindannelse. Med hensyn til opbevaring af ikke-tørrede insekter, så så blancherede melormelarver ud til at kunne opbevares på køl i 6 dage uden vækst. For tilberedte melormelarver gjaldt at de kunne opbevares i længere tid inden stigning i mikrobiel vækst når de var pakket i beskyttende atmosfære sammenlignet med almindelig atmosfærisk luft. Der er ikke fundet data ift. effekt af behandling mht. eventuelle kemiske forureninger.

#### Restprodukter fra insektproduktion:

Restproduktet efter insektkonvertering (frass) vil bl.a. afhænge af insektart og naturligvis det substrat insekterne er dyrket på, men består typisk af en blanding af gennemtygget substrat, ekskrementer og skeletrester af varierende fugtighed. Analyser af frass fra alm. melorm indikerer at det mikrobielle niveau ligner det der findes i larverne. I forsøg med dyrkning af fluer på kontamineret husdyrgødning så larverne ud til at have en biosanerende effekt mht. forekomst af salmonella, campylobacter og *E. coli*, mens et andet forsøg indikerer at det vil afhænge af smitstoffet.

I forhold til kemiske forureninger, må man må formode at frassen stort set indeholder de samme forureninger som substratet indeholdt, idet insekterne udskiller dem for størstedelens vedkommende.

## **FAREPROFIL FOR SUBSTRATER TIL INSEKTOPDRÆT:**

### **Godkendte substrater**

#### **Gruppe 1 (tørfoder rettet mod insekter)**

Foder til fødevareproducerende dyr som også er relevant som substrat til insektproduktion er foderblandinger til svin og fjerkræ. Disse består for størstedelens vedkommende af kornprodukter (30-90 %), primært hvede, majs, byg og havre suppleret med mere proteinrige kilder som soja eller raps, samt diverse næringsstoffer, enzymer, vitaminer og mineraler (Guerre, 2016). Foder med fund af salmonella må ikke markedsføres. Fjerkræfoder skal være varmebehandlet med en opnået temperatur på 81° C i procesforløbet (undtaget er hele kerner af korn og frø hvis de beskyttes mod krydskontamination) jf. BEK 850 27/06/2017. Andet foder skal også varmebehandles ved mistanke om salmonella.

#### Biologiske farer

Udover foranstaltningerne for at undgå spredning af transmissible spongiforme encephalopatii (TSE) så som kogalskab (BSE) via drøvtygger materiale i foder (TSE forordningen; EF 999/2001), er der særlig fokus på mulig forekomst af salmonella. Resultater fra Zoonoserapporten (Anon. 2017) viser, at i testede færdige foderblandinger var der én salmonella positiv prøve (0,9 %) i 2015, mens ingen var positive i 2014 og 2016 (egenkontrol data) mens tallet var 2,1 % - 5,3 % i kontrolprøver. I Sojamel, raps- og solsikkekager blev der fundet salmonella i 1,7 % af prøverne i 2014 og 0,9 % i 2016. Test af miljøprøver fra fodervirksomheder (urene zone) viste 13,8 % salmonella positive prøver i 2014, hvilket var faldet til 0,3 % i 2016. At fokus på hygiejne og kontrol ved foderfremstilling er vigtigt understreges af et norsk studie, hvor salmonella blev fundet i hver tredje skibsladning med sojabønner over en 19 årig periode (Wierup og Kristoffersen 2014). Selvom der i foder typisk påvises eksotiske salmonella serotyper, findes også de serotyper som hyppigst ses i humane salmonellainfektioner. Selvom salmonella er en vigtig zoonose, så har en lang række virus husdyrsygdomme, som eksempelvis afrikansk svinepest, enorme konsekvenser for landbruget hvis de spredes over grænser f.eks. via

foder. Et amerikansk studie har simuleret overlevelse af 11 globalt alvorlige virus smitstoffer under fodertransport (30-37 dage) med påvisning og test af infektionsevne (Dee et al. 2018). Seks af de testede virus i foder, herunder Senecavirus A repræsenterende mund- og klovesyge, afrikansk svinepest, porcint reproduktions og respiratorisk syndrom og porcint circovirus type 2 (PCV2) var stadig infektionsdygtige efter transport, dog afhængende af fodertype. Dette indikerer risikoen for spredning af alvorlige husdyrsygdomme via forurenede foder.

#### Kemiske farer

En kendt risikofaktor ved kornprodukter er deres potentielle indhold af mykotoksiner. Mykotoksiner produceres af skimmelsvampe på afgrøderne, både i vækstfasen men også under transport og lagring og mængden som dannes er afhængig af omgivelsernes fugtighed og temperatur og er derfor et større problem for afgrøder dyrket i f.eks. middelhavsområdet frem for Danmark.

<b>Table 1:</b> European Union regulatory levels <sup>a</sup> and established guidelines <sup>b</sup> on mycotoxins in raw materials and in pig and poultry diets		
Mycotoxin	Feed materials	Maximum levels µg/kg
<sup>a</sup> Aflatoxin B1	All feed materials	20
	Complete feedstuffs for pigs and poultry (except young animals)	20
	Other complete feedstuffs	10
	Complementary feedstuffs for pigs and poultry (except young animals)	20
	Other complementary feedstuffs	5
<sup>b</sup> Deoxynivalenol	Feed materials	-
	Cereals and cereal products with the exception of maize by-products	8 000
	Maize by-products	12 000
	Complementary and complete feedstuffs with the exception of:	5 000
	Complementary and complete feedstuffs for pigs	900
<sup>b</sup> Zearalenone	Feed materials	-
	Cereals and cereal products with the exception of maize by-products	2 000
	Maize by-products	3 000
	Complementary and complete feedstuffs	-
	Complementary and complete feedstuffs for piglets and gilts (young sows)	100
	Complementary and complete feedstuffs for sows and fattening pigs	250
<sup>b</sup> Ochratoxin A	Feed materials	-
	Cereals and cereal products	250
	Complementary and complete feedstuffs	-
	Complementary and complete feedstuffs for pigs	50
	Complementary and complete feedstuffs for poultry	100

<b>Tabel 1:</b> European Union regulatory levels <sup>a</sup> and established guidelines <sup>b</sup> on mycotoxins in raw materials and in pig and poultry diets		
<sup>b</sup> Fumonisin B1 + B2	Feed materials	-
	Maize and maize products	60 000
	Complementary and complete feedstuffs for:	-
	Pigs	5 000
	Poultry	20 000
<sup>b</sup> Sum T-2 and HT-2 toxin	Cereal products for feed and compound feed	-
	Oat milling products (husks)	2 000
	Other cereal products	500
	Compound feed	250

Tabel fra Guerre, 2016

De vigtigste mykotoksindannende svampe i forhold til foderafgrøder findes i slægterne *Aspergillus* (f.eks. aflatoxiner), *Penicillium* (f.eks. ochratoxiner) og *Fusarium* (f.eks. fumonisiner, zearalenone, T-2+HT-2, deoxynivalenol (DON)). Tilsammen producerer skimmelsvampe 380 (eller flere) identificerbare mykotoksiner eller metabolitter heraf og der er fundet mere end 50 i en enkelt foderprøve (Kovalsky et al. 2016). I EU har man indført grænseværdi for indhold i foder af aflatoxin B1 samt vejledende grænseværdi for fumonisin B1 og B2, ochratoxin, zearalenone, T-2 & HT-2, deoxynivalenol samt Meldrøje (*Claviceps purpurea*) Tabel 1. Da arten og mængden af dannede mykotoksiner i afgrøder afhænger af dyrkningsstedets klimatiske forhold har lande uden for EU eventuelt reguleret for en anden serie af mykotoksiner og med andre grænser (Romer Labs., 2016; Guerre, 2016).

Analyser af indhold af de fem mykotoksiner aflatoxin, zearalenone, deoxynivalenol, fumonisin og ochratoxin i foder<sup>2</sup> over en 3-årig periode (2009-2011) for henholdsvis Nord-, Central- og Sydeuropa gav følgende gennemsnitlige resultat: aflatoxin (0, 1, 6 µg/kg), zearalenone (87, 118, 72 µg/kg), deoxynivalenol (641, 792, 431 µg/kg), fumonisin (0, 327, 2007 µg/kg) og ochratoxin (0, 4, 2 µg/kg). Det tilsvarende resultat for henholdsvis Nord- og Sydamerika er: aflatoxin (29, 6 µg/kg), zearalenone (299, 201 µg/kg), deoxynivalenol (1718, 250 µg/kg), fumonisin (2369, 1665 µg/kg) og ochratoxin (0, 26 µg/kg). Maximum koncentrationer for de fem mykotoksiner var: aflatoxin (2454 µg/kg), zearalenone (5791 µg/kg), deoxynivalenol (25759 µg/kg), fumonisin (77502 µg/kg) og ochratoxin (1582 µg/kg) fundet i foder i henholdsvis Sydasien<sup>3</sup>, Nordasien<sup>4</sup>, central Europa<sup>5</sup>, Nordasien og Sydasien (Rodrigues & Naehrer, 2012). De tilsvarende maksimale fund for foder indsamlet 2015 i det nordlige Egypten var: aflatoxin (11 µg/kg), zearalenone (791 µg/kg), deoxynivalenol (1516 µg/kg), fumonisin B1 (2409 µg/kg) (Abdallah et al. 2017). Som det ses af den store spredning i resultaterne er de klimatiske forhold af afgørende betydning for indholdet af mykotoksiner og de Nordeuropæiske analyseresultater er alle under de anbefalede grænseværdier. Flere kilder peger dog på at de ovenfor listede mykotoksiner kun er toppen af isbjerget, der findes mange hundrede mykotoksiner og oftest

<sup>2</sup> Det er oplyst at foderet undersøgt er enten svine-, kyllinge- eller kreaturfoder hvor der i Europa anvendes kornprodukter i foderet hvorimod der i Nord- og Sydamerika anvendes majs.

<sup>3</sup> Sri Lanka, Pakistan, Bangladesh og Indien

<sup>4</sup> Kina (83 %), Japan, Korea og Taiwan

<sup>5</sup> Bælte strækkende sig fra Frankrig i vest til Rusland i øst

forekommer de samtidig i foder (Abdallah et al. 2017; Rodrigues & Naehrer, 2012; Kovalsky et al. 2016).

Ifølge fødevestyrelsens overvågningsrapport for pesticidrester i fødevarer for 2016 fremgår det at der ikke er fundet overskridelser i forhold til MRL (maximum residue limit) grænser i hverken danske eller udenlandske kornprodukter (som kunne anvendes i foderprodukter) bortset fra udenlandske ris (FVST, 2017). Ligeledes er konklusionen på FVST kontrollen med pesticidrester i foder i 2017, hvor der blev analyseret for 237 forskellige pesticider herunder ikke EU godkendte, at der ikke blev fundet foderprodukter med et uacceptabelt restindhold af pesticider (FVST, 2018).

I et polsk studie blev indholdet af 19 polycykliske aromatiske hydrocarboner (PAH) i forskellige kornsorter og typer af melprodukter undersøgt. Benzo(a)pyrene blev identificeret i 5 ud af 8 produkter (0,05-0,08 µg/kg) og summen af de 19 PAHer lå mellem 1,07 op til 3,65 µg/kg (Ciecierska & Obiedzinski, 2013).

PAHer kan som sagt være til stede allerede i kornprodukter men produceres også når kornet forarbejdes til f.eks. brød (se gruppe 2, kemiske farer).

I et kinesisk studie fra 2004 blev foder til fødevarerproducerende dyr analyseret for en lang række metaller. De gennemsnitlige værdier var for: bly (7,21 – 10,68 – 5,76 mg/kg), cadmium (0,64 – 0,57 – 0,22 mg/kg), Arsen (134 – 90 - 22 µg/kg) og kviksølv (5,3 – 5,8 – 1,1 µg/kg) for henholdsvis kyllinge-, svine- og kvægfoder (Cang et al. 2004).

### Gruppe 2 ('tidligere fødevarer' – f.eks. bageri og kagerester)

"Tidligere fødevarer" er produkter med animalsk indhold der ikke længere skal anvendes til konsum f.eks. pga. emballagefejl eller fremstillingsvanskeligheder (ufarlige) der kategoriseres som animalske biprodukter kategori 3 jf. Biproduktforordningen (EF 1069/2009). Når de eneste animalske ingredienser er mælk, mælkebaserede produkter, produkter afledt af mælk, æg, ægprodukter, honning, fedt, kollagen eller gelatine, og disse er forarbejdede som fødevarer, kan de anvendes som substrat til insekter forudsat at de har været holdt helt adskilt fra andet animalsk materiale som kød og fisk. Disse fødevarer kan anvendes uden yderligere behandling jf. Gennemførselsforordningen bilag X, kap 2, del III, sektion 10 (EF 142/2011).

#### Biologiske farer

Fødevarerens sikkerheden i fødevarer skulle gerne være generelt høj, og for tidligere fødevarer bestående af bageri- og kagerester vil det typisk være ingredienserne, som kan være forurenede med eksempelvis, *Bacillus cereus* og *Salmonella* spp. Varmen under bagningen vil typisk inaktivere salmonella, men evt. ikke fuldstændigt afhængig af bagetid, smitteniveau og øvrige fysiske/kemiske forhold i dejen (Shrestha et al. 2016; Channaiah et al. 2017). *Bacillus* sporer derimod er varmeresistente og vil oftere modstå bagning afhængig af bakteriestammen. Disse sporer vil efterfølgende, bl.a. afhængig af vandaktiviteten i produktet (f.eks. kiks vs. brød), potentielt kunne vokse frem, hvor 10<sup>5</sup> CFU/g menes at være grænsen for mulig toksindannelse (De Bellis et al. 2015). Tidligere fødevarer vil muligvis udsættes for mere gunstige vækstbetingelser for eventuelle smitstoffer, hvis opbevaringsforholdene ændres mht. temperatur og fugt. Der vil bl.a. være øget risiko for vækst af skimmel, som dog kan erkendes ved synlig vækst. Et italiensk studie af den mikrobiologiske kvalitet af tidligere fødevarer (bl.a. croissanter, kiks og chokolade) fra et forarbejdningsanlæg (behandling ikke nærmere specificeret) viste en generel god kvalitet (Tretola et al. 2017). Følgende gennemsnit (log



CFU/g) sås for: Totalkim  $4,92 \pm 0,25$ ; Enterobacteriaceae  $3,61 \pm 0,55$ ; *Bacillus cereus*  $2,84 \pm 0,73$ ; gær  $4,03 \pm 0,56$  og svampe  $3,30 \pm 0,41$ . *E. coli* og stafylokokker var under detektionsgrænsen dvs.  $< 2 \log$  CFU/g undtagen én stafylokok positiv prøve på  $2 \log$  CFU/g, mens clostridia kun var tællelige i 2 af 6 prøver og i lavt antal, hhv. 1,0 og 1,7 log CFU/g.

#### Kemiske farer

Generelt set er der her tale om fødevarer, som har været godkendt til human ernæring og de må nødvendigvis opfylde alle krav til grænseværdier for uønskede stoffer i fødevarer ifølge gældende lovgivning. Der burde derfor ikke forefindes problematiske kemiske stoffer i disse. Alt afhængig af behandlingen og opbevaring af de tidligere fødevarer kan der dog være risiko for kontaminering med svampe og dermed udvikling af mykotoksiner (Eroksuz et al. 2015). For brød og pasta produceret ud fra cerealer, som kan have højt indhold af mykotoksiner, er det vist at niveauet af mykotoksiner mindskes betydeligt under fremstillingsprocessen – mellem 40-70 % i brød og kager – noget mindre i pasta hvor der sås et fald på 10 % for aflatoxin B1 (Bol et al. 2016).

PAH er til stede i brød. Det kan stamme direkte fra cerealiene som brødet er bagt af, det kan dannes under bagningen og endelig kan mængden øges betydelig hvis brødet efterfølgende ristes over åben ild (Rey-Salgueiro et al. 2008; Ciecierska & Obiedziński, 2013). SCF (2002) konkluderede at 15 PAH'er er mutagene/genotoksiske, men der er i EU kun fastsat grænseværdi for benzo(a)pyrene (1 µg/kg fødevarer produceret ud fra cerealer). Niveauer fra 0,045 til 0,290 µg/kg af benzo(a)pyrene i amerikansk brød og 0,09 til 0,3 µg/kg i tyrkisk brød er rapporteret (Pouzou et al. 2018, Kacmaz et al. 2016) mens et studie fra Kuwait rapporterer om niveauer helt op til 10 µg/kg når brødet var bagt i gasovn (Al-Rashdan et al, 2010). Et andet produkt som dannes under bagningen af brød er akrylamid. I et rumænsk studie blev der målt op til 33 µg akrylamid/kg brød, mængden af dannet akrylamid var afhængig af korntype samt bagningstemperatur og længden på bagetiden (Negoita et al. 2014). I biprodukter fra bageriindustrien har plantedirektoratet analyseret for ochratoxin (0,6 µg/kg), dioxin (0,09 ng TEQ/kg) og indikator PCB'er (2,9 µg/kg) (Mortensen et al. 2014).

#### Fysiske farer (f.eks. emballage)

Da emballagen fra tidligere fødevarer som ønskes anvendt som foder fjernes mekanisk, vil der kunne være en rest af emballagen tilbage i foderet. Typiske emballagerester fra tidligere fødevarer som ønskes anvendt til foder er plast, papir og aluminiumsfolie. Dette kunne være en kilde til fare idet der kan ske en migration af problematiske stoffer fra emballagen over i foderet. Det kunne være komponenter af plasten eller tekniske hjælpestoffer, overfladebehandlingsmidler, lim, tryksværte, osv. Analyser af seks "tidligere fødevarer" forarbejdet til foder viste et restemballageindhold på 0,005 til 0,09 % (Tretola et al. 2017). Fødevarestyrelsen kontrolkampagne i 2015 af emballage (plast med og uden tryk, aluminium laminat med og uden tryk, plast uden tryk i papkarton) til tørre fødevarer (f.eks. müsli, nødder, cornflakes og gryn) blev der ikke fundet overskridelser af grænseværdier for de identificerede kemiske stoffer i emballagen (FVST, 2015).

#### **Gruppe 3 (vegetabiliske bi- og restprodukter – f.eks. grøntsagsskræller og bladgrønt)**

Vegetabiliske bi- og restprodukter må anvendes som fodermiddel, når det sikres, at de har været helt adskilte fra animalske produkter pga. smitterisikoen herfra. Generelt gælder at en fødevarer virksomhed, der leverer rester til foderbrug, skal registreres til denne aktivitet

### Biologiske farer

Ved kontrolundersøgelse af forskellige grønsager er forekomsten af salmonella, listeria, *E. coli* og campylobacter typisk meget lav, eksempelvis fandtes kun 3 af 961 prøver positive for campylobacter i 2016 (Anon. 2017). I forbindelse med fødevareråbne udbrud, blev Norovirus kontamineret salat koblet til 425 af 1178 patienter i 2016 (Anon. 2017). Se yderlig information i tidligere vurdering af "Mikrobiologiske risici ved frugt og grønt" (DTU 2012). Sammenlignet med de testede grønsagsprodukter ovenfor vil eksempelvis skræller og ydre lag af bladgrønt måske i højere grad indeholde rester af jord der kan indeholde smitstoffer.

### Kemiske farer

Fødevestyrelsen foretager løbende stikprøvekontrol af niveauet af pesticidrester i frugt og grønt på det danske marked. I 2016 blev der udtaget i alt 705 prøver af konventionelt dyrket frugt (108 fra DK, 314 fra øvrige EU og 283 fra lande uden for EU eller af ukendt oprindelse). Der blev påvist pesticidrester i 69 % af alle prøver af konventionelt dyrket frugt. Der blev fundet overskridelser af MRL i 2,8 %, 1,3 % og 4,6 % af prøverne for frugt produceret i henholdsvis DK, EU og uden for EU. Af konventionelt dyrkede grøntsager blev der udtaget i alt 783 prøver (270 fra DK, 321 fra øvrige EU og 192 fra lande uden for EU). I 2,6 % af prøverne blev der fundet pesticidrester i koncentrationer, som overskred MRL. Andelen af prøver hvor der kunne påvises pesticidrester var 43 %. Generelt findes flere pesticidrester i udenlandsk produceret frugt og grøntsager end i danske produkter (FVST, 2017). Hvis man ser på skræller fra frugt og ydre lag af bladgrønt er det den del af afgrøderne som udsættes for pesticiderne og må i sagens natur også være de dele af frugt og grønt som indeholder størst niveau af pesticider (deriblandt insekticider) og dermed udgøre en potentiel risiko for insekterne som skal leve på substraterne. I EU lovgivningen vedrørende "Products of plant and animal origin referred to in article 2(1) to which MRLs apply" er det angivet hvilken del af frugt og grønt som MRLen refererer til – for f.eks. bananer og æbler er det hele frugten inkl. skræl. The Federal Institute for Risk Assessment (BfR) har undersøgt forholdet mellem indhold af pesticider i f.eks. skræl og frugtkød og lavet en database med "Processing factors"(Pf) som netop giver forhold mellem indhold i f.eks. skræl og frugtkød for forskellige pesticider. Pf for insekticidet imidacloprid blev fundet til følgende gennemsnitlige værdier: kartofler (3,00), fersken (2,75), appelsin (0,86 og 3,52), citroner (5,18) og for amitraz: æbler (4,17 og 3,55), appelsiner (0,81) (www.bfr.de). Pf afhænger af typen af frugt/grøntsag samt af pesticidets fysiske/kemiske egenskaber.

Plantedirektoratet har i årene 1998-2009 analyseret vegetabiliske biprodukter anvendt til dyrefoder. Følgende biprodukter, som kunne være mulige kandidater for insektsubstrat, blev undersøgt: citruskvas, roeaffald, kartoffelpulp, sukkerroemelasse, sojakage og skaller, solsikkekage, rapskage og vegetabilisk olie. Der blev analyseret for mykotoksiner, pesticider, dioxiner, tungmetaller samt naturligt forekommende toksiner i rasp. Der blev fundet overskridelser af grænseværdierne for cadmium i solsikkemel, hydrogencyanid i ikke nærmere specificeret frøekage, samt dioxin i vegetabilisk fedt (Mortensen et al. 2014).

### **Gruppe 4 (mask)**

I fortegnelsen over fodermidler fremstår 'mask fra ølfremstilling' i del C, punkt 1.12.12 (EF1017/2017). Her defineres mask som produkt fra ølbrygning, der består af rester af maltet og umaltet korn og andre stivelsesprodukter, som kan indeholde humle. Markedsføres typisk i våd form, men sælges

også i tørret form. Kan indeholde op til 0,3 % dimethylpolysiloxan, op til 1,5 % enzymer og op til 1,8 % bentonit. Masken er de faste rester der er tilbage efter mæskningen af malt. Mæskningen tager typisk 1-2 timer og vil foregå under 75°C for ikke at inaktivere enzymerne (eksempelvis 15 min ved 54°C og 60 min ved 64°C), men afsluttes med kort opvarmning til 72-78°C inden masken separeres fra urten.

#### Biologiske farer

Opvarmningen af masken under fremstillingen vil være med til at reducere smitstoffer undtagen varmetolerante sporer af bl.a. clostridier og *Bacillus* spp., som vil kunne findes i kornet. Også eventuelle svampesporer af *Fusarium*, *Aspergillus* og *Penicillium* (toksindannende svampe) er forholdsvis varmeresistente og vil evt. ikke fjernes fuldstændigt. I modsætning til korn har mask en høj vandaktivitet, som dermed ikke er en kontrollerende faktor mht. evt. spiring af sporerne. Under lagring af mask, vil mælkesyrebakterier evt. dominere og være med til at holde pH i masken nede, som i øvrigt indikerer en mulig probiotisk effekt af fodring med mask.

#### Kemiske farer

Indhold af cadmium, krom, kobber, nikkel, bly, zink, jern og arsen i mask (spent grain) blev undersøgt for 3 bryggerier. Bly blev ikke fundet og resultatet for cadmium og arsen er vist i Tabel 2 (Passaghe et al. 2015). De fundne værdier er under grænseværdierne for indhold i foder.

Tabel 2: Indhold af cadmium og arsen i mask fra 3 bryggerier		
µg/kg i 3 prøver af spent grains	Cadmium	Arsen
Bryggeri 1	nd	1,56±0,01
	0,50±0,02	1,55±0,02
	nd	1,59±0,02
Bryggeri 2	nd	1,60±0,02
	17,55±0,12	nd
	11,31±0,01	nd
Bryggeri 3	nd	nd
	nd	1,59±0,01
	nd	nd

fra Passaghe et al. 2015

nd: Under detektionsgrænsen

Et Japansk studie hvor man har testet mere end 300 pesticiders skæbne under ølbrygning indikerer at pesticiderne forbliver i masken (Inoue et al. 2011). Samme gruppe undersøgte også mykotoksineres skæbne under ølbrygning og her var konklusionen den samme nemlig at mykotoksinerne forbliver i masken (Inoue et al. 2013; Vaclavikova et al. 2013). Et andet studie hvor man har forurenset udgangsmaterialet til ølbrygningen med forskellige fusarium mykotoksiner (oxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside, 3-acetyldeoxynivalenol og 15-acetyldeoxynivalenol) viste at 2.5 til 13 % af mykotoksinerne forblev i masken afhængig af typen af mykotoksin (Habler et al. 2016).

Kornbærme (distillers grains) som anvendes i bioethanol fremstilling har været analyseret for mykotoksiner (aflatoxin, DON, fumonisin og ZEN) samt et pesticid (chlormequat) i Plantedirektoratets overvågning af uønskede stoffer i biprodukter til foder. Ingen af analyseresultaterne overskred de respektive grænseværdier (Mortensen et al. 2014).

Analyser af indhold af de fem mykotoksiner aflatoxin, zearalenone, deoxynivalenol, fumonisin og ochratoxin i "dried distillers grains with solubles" over en 3-årig periode (2009-2011) for henholdsvis Nordamerika, Nordasien, Sydøstasien og Oceanien<sup>6</sup> gav følgende gennemsnitlige fund: aflatoxin (7, 54, -, - µg/kg), zearalenone (194, 321, 286, 51 µg/kg), deoxynivalenol (2186, 3068, 3618, 1318 µg/kg), fumonisin (1329, 1596, 1481, 2138 µg/kg) og ochratoxin (2, 6, 2, 5 µg/kg) (Rodrigues & Næhrer, 2012). Aflatoxin værdien for Nordasien og zearalenone værdierne for Nordamerika, Nordasien og Sydøstasien overskrider de Europæiske grænseværdier for foder.

### Gruppe 5 (animalske biprodukter - kategori 3 materiale – f.eks. blodprodukter af ikke-drøvtyggere)

Slagteriaffald kategoriseres under animalske biprodukter (ABP) afhængig af potential risikoniveau, og kan kun anvendes som foder til fødevareproducerende dyr hvis det tilhører kategori 3 materiale, der skal stamme fra raske dyr jf. Biproduktforordningen (EF 1069/2009). TSE forordningen (EF 999/2001) angiver desuden en lang række restriktioner ift. anvendelse af ABP som foder til fødevareproducerende dyr. Særligt materiale fra drøvtyggere, undtagen hydrolyserede huder og skind, er omfattet af foderforbuddet. Til insekter er gelatine, kollagen, hydrolyseret protein og, blod fremstillet af ikke-drøvtyggere samt di- og tricalciumphosfat tilladt at anvende som substrat, hvis forarbejdet jf. bilag X, kap. 2, part III i Biproduktforordningens Gennemførelsesforordning (EF 142/2011). Relevansen af disse produkter mht. anvendelse til insekter er formodentlig lav og vurderingen er derfor afgrænset til blod.

Blod til foder skal forarbejdes efter metode 1-5 eller 7, der minimum sikrer 80°C overalt jf. Gennemførelsesforordningen bilag X (EF 142/2011). Metode 1 er tryksterilisering (133°C i 20 min, 3 bar) mens metode 2-5 er behandling med forskellige kombinationer af tider (3-125 min) og temperaturer (80-130°C) med en forudsat maksimum partikel størrelse (20-150 µm). Metode 7 derimod er en valgfri metode, hvor effektkravene er fravær af *Clostridium perfringens* i 1 g, fravær af *Salmonella* i 25 g (5 prøver) og maks. 10-300 Enterobacteriaceae CFU/g i 2 af 5 prøver over en periode på 30 dage. Hvor salmonella og Enterobacteriaceae kravene svarer til de generelle krav for foder af animalske biprodukter.

#### Biologiske farer

Blod vil typisk indeholde antistoffer mod en lang række smitstoffer, mens selve smitstoffet sjældnere vil gå i blodbanen afhængig af smitstof og sygdomsforløb. Hepatitis E (HEV) i svin har fået opmærksomhed som zoonose, hvor et Skotsk studie har påvist HEV RNA i 44 % af serumprøver fra slagtesvin (Crossan et al. 2014). Et andet studie har dog ikke fundet sammenhæng mellem tilstedeværelse af HEV RNA i spray-dried plasma iblandet foder og så serokonvertering hos svin (Pujols et al. 2014). Den frygtede Afrikanske svinepest kan bl.a. overleve længe i blod, og niveauet i blod kan være op til 3,5 log TCID<sub>50</sub>/ml i subkliniske dyr (6-8 log i klinisk syge dyr). Inaktiveringsforsøg har vist, at varme (48°C) og høj pH (10,2) skulle kombineres med brintoverilte (20,6 mM eller 102,9 mM) i 10 min for at opnå hhv. 3,35 og 4,17 logs reduktion (Kalmar et al. 2018). Højere temperatur, som bl.a. de beskrevne forarbejdningsmetoder i afsnittet ovenfor vil dog være med til at eliminere smitstofferne. Eksempelvis vil afrikansk svinepest inaktiveres ved en kombination af 56°C i 70 min eller 60°C i 20 min; klassisk svinepest ved 65,5°C i 30 min eller 71°C i 1 min og fugleinfluenza ved 56-

<sup>6</sup> Australien og New Zealand

60°C i 60 min jf. World Organisation for Animal Health (OIE). Hepatitis E virus er generelt mindre resistent end Hepatitis A, dog vil ikke alle typer inaktiveres fuldstændigt efter 1 time ved 66°C (Pujols et al. 2014).

#### Kemiske farer

Plantedirektoratet har i årene 1998-2009 analyseret animalske biprodukter (kategori 3) som anvendes til dyrefoder. Følgende biprodukter, som kunne være mulige kandidater for insektsubstrat, blev undersøgt: ægprodukter, animalsk fedt/olie og mælkeprodukter (1 prøve). Der blev analyseret for mykotoksiner, pesticider, dioxiner og tungmetaller. Der blev fundet overskridelser af grænseværdierne for dioxin og dioxin lignende polyklorede biphenyler i dyrefedt og olie (Mortensen et al. 2014).

I et ældre svensk studie blev blod fra 279 slagtesvin analyseret for ochratoxin A. 16,8 % af dyrene havde indhold på > 2 ng/ml, 5 % > 10 ng/ml og et maksimum fund på 280 ng/ml af ochratoxin A (Hult et al. 1980). I et polsk studie blev blod fra 195 svin undersøgt for indhold af ochratoxin A. I 80 % af dyrene var niveauet i blod < 1 ng/ml med op til > 50 ng/ml i 5 % af dyrene (Golinski et al. 1984). Niveauet af cadmium i blod fra 200 ungarske slagtesvin blev målt til 1 µg/kg og for bly til 80 µg/kg (Gyori et al. 2005), mens niveauet af cadmium i svenske svin lå mellem < 0,05 og 1,19 µg/l (Lindén et al. 2003). Disse værdier for cadmium og bly ligger under grænseværdierne for foder.

## Ikke-godkendte substrater

### Gruppe 6 (køkken og madaffald)

Indholdet af farer i køkken- og madaffald afhænger af dels af sammensætningen af affaldet og dels den potentielle forekomst i de enkelte bestanddele. Affaldet kan kategoriseres efter om det er vegetabilsk eller animalsk, forarbejdet eller ikke forarbejdet og endelig om det er spiselige dele (madspild) eller madaffald som skræller, æggeskaller og knoglerester (madaffald). I dagrenovation fra husholdninger udgør vegetabiliske dele eksempelvis ca. 33 %, animalske ca. 9 % og andet organisk 8 % (f.eks. køkkenrullepapir, blomster), mens 50 % er ikke-organisk (IFRO 2016). I rapporten "Kortlægning af madaffald i servicesektoren" ses desuden detaljer om affaldsmængder fra restauranter, storkøkkener og detailhandel (MST 2014). Køkken og madaffald alene hører under animalske biprodukter som kategori 3 materiale jf. Biproduktforordningen (EF 1069/2009). Mens kildesorteret organisk dagrenovation (KOD) typisk indeholder andet organisk materiale, hvorved det klassificeres under 'fast byaffald' som ikke er tilladt til foder jf. Markedsføringsforordningens bilag III (EF 767/2009).

### Biologiske farer

Madaffald af animalsk oprindelse, og særligt hvis rå, vil være den primære kilde til zoonoser i madaffaldet. Under gruppe 9 er angivet zoonoseforekomsten i husdyrene, mens forekomsten i fersk kød generelt er lav med undtagelse af campylobacter fra kylling. Campylobacterforekomsten er forskellig mht. produktionsform og kilde, og er således hhv. 21,3 % / 87,2 % (konventionel/økologisk) i slagteriprøver, 12,8 % / 71,0 % i retail dansk og 37,9 % / 78,8 % i retail importeret kød (Anon. 2017). Salmonellaforekomsten i dansk kød er generelt meget lav (<1 %), dog findes 7-12 % af testede partier (svin, kylling og kalkun (kun import)) undtagen dansk kylling dog salmonella positive. I én af FVSTs kontrolrapporter "MRSA i Svinekød 2016" fremgår det at 122 (40 %) af 305 kødprøver var positive mht. methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (husdyrtype) (FVST 2016). Det ser dog ikke

ud til at udgøre en væsentlig fødevarerisikommæssig risiko. I danske konsumæg er der stort set ikke salmonella og særstatus gør at der kan stilles særlige krav til udenlandske æg. Dog pegede smittekileregnskabet på at 2 % af salmonella infektioner i 2016 skyldtes æg mod 0 % i 2015 (Anon. 2017). Mælk og mælkeprodukter er også sjældent salmonella positive og kun i ét af 302 partier (0,3 %) blev der fundet *Listeria monocytogenes*, ifølge kontrolrapport fra FVST fra 2013 (FVST 2013a). Madaffald vil sandsynligvis også indeholde produkter af ikke-dansk oprindelse som evt. har en anden smittestatus end danske produkter og dermed øger smitterisikoen. Jansen et al. (2016) giver f.eks. en oversigt over fund ved importkontroller af kød og kødprodukter i Europa i perioden 2008-2013, hvor 453 ud af 3421 (13,3 %) notifikationer resulterede i afvisning af forskellige grunde, hvoraf 45 % skyldtes patogene bakterier.

Udover forekomst af zoonotiske smitstoffer fra især uforarbejdet madaffald, er det særligt risikoen for tilstedeværelsen af husdyrsygdomme (se under gruppe 9) som er årsag til restriktionerne mht. fodring med madrester. Eksempelvis menes udbruddet med mund-og klovsyge i England forårsaget af fodring af svin med madaffald. Ligeledes vil andre alvorlige virussygdomme som afrikansk og klassisk svinepest, Aujeszky's sygdom og overførbare gastroenteritis kunne overføres via madaffald (Jurado et al. 2018). Selvom disse sygdomme ikke forekommer i danske husdyr (MFVM 2017), vil udefrakommende animalsk materiale kunne introducere smitten. Eksempelvis blev det via modellering beregnet at sandsynligheden for at inficere en gris med porcint reproduktions og respiratorisk syndrom virus (PRRSV) (anmeldepligtig sygdom liste 2, BEK 1332/2016) via introduktion af 500 g inficeret kød til Australien er  $2.21 \times 10^{-6}$ ; og samtidigt at indtag af 10 g inficeret kød ville kunne forårsage infektion (Brookes et al. 2014). Eksperimentelle forsøg har vist at afrikansk svinepest i kødprodukter lavet af en inficeret gris kunne påvises efter 16 dage ved opbevaring ved 22-25°C og efter 60 dage ved 4-5°C (Sindryakova et al. 2016). I mælkeprodukter hvor pH ikke er under 6, vil mund-og klovsyge virus evt. kunne overleve da inaktivering kræver en kerntemperatur på 70°C i mindst 30 min, som ikke opnås ved almindelig pasteurisering af mælk. Den smitstofreducerende effekt af forskellige behandlingsmetoder undersøges ofte mht. bakterielle og virale indikatorer og evt. salmonella. Dermed kan garanteret eliminering af de alvorligste smitstoffer være usikker, så selvom sandsynligheden for smitte i behandlet madaffald muligvis er ekstrem lav, vil konsekvenserne ved evt. smitteudbrud være enorme, og som følge heraf er det forbudt at fodre madaffald til fødevarerproducerende dyr.

#### Kemiske farer

Der har ikke været muligt at identificere analyser og niveauer af kemisk betænkelige stoffer i køkken- og madaffald. Til gengæld er der analyseret på biopulp, produceret af KOD, og som er beregnet på fremstilling af biogas. På trods af at KOD indeholder andet organisk affald end køkken- og madaffald (og derfor ikke kan finde anvendelse som foder) er analyseresultaterne medtaget her, da det giver en retningspil for, hvor vi befinder os med hensyn til kemiske forureninger også i køkken- og madaffald. Indholdet af kemiske forureninger i biopulp skal leve op til grænseværdierne i bekendtgørelsen om anvendelse af affald til jordbrugsformål (slambekendtgørelsen) (BEK1001 26/06/2018) for syv metaller og fire grupper organiske stoffer. Ifølge analyser fra to forarbejdningsanlæg, som producerer biopulp fra KOD fra private husholdninger, blev der ikke fundet overskridelser af grænseværdierne for nogen af de analyserede stoffer. De analyserede stoffer, analysefund og grænseværdier er vist i Tabel 3 (Anon. 2015).

**Tabel 3:** Analysedata for biopulp samt grænseværdier for analyserede stoffer (mg/kg TS)

Tungmetaller og organiske stoffer	KomTek Miljø	Aikan A/S	Grænseværdi jf. slambekendtgørelsen
Bly	4,91	23	120
Kadmium	0,14	0,7	0,8
Kobber	24,1	143	1000
Krom	8,56	14	100
Kviksølv	0,06	0,1	0,8
Nikkel	6,19	13,3	30
Zink	112	270	4000
LAS	143	<50	1300
PAH	0,21	1,0	3
NPE	2,5	2,0	10
DEHP	13	9,0	50

LAS: Lineære alkylbenzensulfonater

PAH: Polycykliske aromatiske hydrocarboner

NPE: Nonylphenol (+ethoxylater)

DEHP: Di(2-ethylhexyl)phthalat

Ligesom for substrat bestående af grøntsagsskræller og bladgrønt kan der også i denne substratgruppe være risiko for pesticidrester/insekticidrester i køkken- og madaffald – se gruppe 3, kemiske farer.

Fysiske urenheder, specielt emballage vil også være til stede i køkken og madaffald – se gruppe 2, kemiske farer fra emballage.

### Gruppe 7 (animalske biprodukter - kategori 3 materiale fra slagterier)

For anvendelse af slagteriaffald som foder til fødevareproducerende dyr, er der en lang række krav og restriktioner som beskrevet under gruppe 5, hvor særligt drøvtyggermateriale er forbudt. Slagteriaffald fra ikke-drøvtyggere skal imidlertid, som de fleste animalske biprodukter, forarbejdes før anvendelse til foder jf. Biproduktforordningen og dens Gennemførselsforordning (EF 142/2011), og omfattes derved af foderforbuddet mod anvendelse af 'forarbejdet animalsk protein' som foder (undtagen blodprodukter, gelatine, kollagen, hydrolyseret protein samt di- og tricalciumphosfat).

I Miljøprojekt Nr. 925 (MST 2004) findes information af opdeling og mængder af forskelligt slagteriaffald, og ser man på ikke-drøvtygger slagteriaffald (svin og fjerkræ) udgøres >50.000 tons af blødt kategori 3 materiale, som evt. kunne være foderrelevant til insekter hvis tilladt. De nuværende krav til forarbejdning af denne type affald er nærmere beskrevet under gruppe 5. Dog er der krav om tryksterilisering (133°C i 20 min, 3 bar) (metode 1) for svineaffald (pattedyr) og ellers metode 1-5 eller 7 jf. Gennemførselsforordningen, bilag X (EF 142/2011).

#### Biologiske farer

Kun raske dyr kan indgå i ABP kategori 3 materiale, men det forudsætter dog at sygdommen umiddelbart kan erkendes i forbindelse med slagterikontrollen. I et studie med infektion af svin med afrikansk svinepest sås eksempelvis ingen kliniske tegn i et dyr, hvor man fandt viralt DNA i blodet

(Olesen et al. 2018b). Alle danske svin testes bl.a. for *Trichinella* spp. og *Echinococcus granulosus/multilocularis* (hunden og rævens dværgbændelorm) med sidste fund af rævens dværgbændelorm i 2015, mens *Trichinella* ikke er fundet siden 1931. Se mere om smitstoffer i dyr under gruppe 9. De ovenfor nævnte forarbejdningsskrav vil være med til at reducere risikoen for forekomst af smitstofferne, se mere under gruppe 5. Ved samtidig adskillelse fra drøvtyggermateriale undgås risikoen for prioner, som kræver omkring 1000°C for sikker destruktion (MST 2004). Resultater fra Zoonoserapporten (Anon. 2017) viste dog, at i biprodukter fra svineslagteri, var der salmonella i 7 af 520 egenkontrol prøver, men i 0 af 1151 produktprøver.

#### Kemiske farer

Se gruppe 5 – kemiske farer.

#### **Gruppe 8 ('tidligere fødevarer' med animalsk indhold)**

Under gruppe 2 er beskrevet hvilke "tidligere fødevarer" der kan anvendes som substrat til insekter. Selvom "tidligere fødevarer" som udgangspunkt har været dømt egnet til humant konsum, så er "tidligere fødevarer" med animalsk indhold som kød og fisk, samt uforarbejdede produkter som f.eks. dej med rå æg ikke tilladte at anvende til fodring af fødevarereproducerende dyr.

#### Biologiske farer

Tilsvarende køkken og madaffald, så vil tidligere fødevarer med animalsk indhold potentielt udgøre en smitterisiko mht. husdyrsygdomme, som ikke gør mennesker syge, men har alvorlige konsekvenser for husdyrproduktionen, se under gruppe 6. Se også dette afsnit mht. zoonoseforekomst i animalske produkter. For rå dejs vedkommende er der set humane udbrud som følge af have spist ubagt dej pga. hvedemel forurenet med verotoxin producerende *E. coli* (VTEC) eller salmonella fra æg (Wu et al. 2017). Selvom en lav vandaktivitet i dejen umiddelbart hindrer vækst af smitstoffer, kan det til gengæld være med til at understøtte overlevelsen og særligt ved høje fedtindhold.

I forhold til fødevarerhygiejne, vil forskellige produktgrupper typisk skulle have opfyldt forskellige mikrobiologiske kriterier enten i form af proceshygiejnekriterier med krav mht. tilladte niveauer af indikatorbakterier eller fødevarerikkerhedskriterier mht. forekomst af f.eks. salmonella og listeria (EF 2073/2005). Eksempelvis viser kontrolrapport fra FVST fra 2013 "Offentlig kontrol af mikrobiologiske kriterier for produkter i en gros leddet – hakket kød", at salmonella kunne påvises i 2 prøver (1,6 %) mens proceshygiejnekriterierne mht. *E. coli* var uacceptable i 6 % af partierne, mens tallet var 18 % for aerobe kim (FVST 2013b). Sidstnævnte kan dog evt. skyldes mælkesyrebakterier fra vakuumpakkede produkter som er mindre alvorligt end fordævelsesbakterier.

For "tidligere fødevarer" vil der evt. være en øget risiko for at produkter ikke opfylder disse kriterier, hvis eksempelvis fejl ved emballagen ændrer vækstbetingelserne for mikroorganismene og hvis der sker brud på kølekæden. I et studie af den mikrobiologiske kvalitet af fødevarer som doneres til godgørende formål fandt man listeria i 3 af 12 animalske produkter, hvoraf kun det ene overskred fødevarerikkerhedskriteriet for spiseklare produkter (2 log CFU/g) (De Boeck et al. 2017). Samtidig var niveauet af Enterobacteriaceae højt i dette produkt (6.7 log CFU/g). Et andet studie indikerer vigtigheden af opbevaringstemperatur mht. listeria niveauet, som ved udløbsdatoen (13 d) var steget hhv. 1, 2 og 4 log CFU/g ved 4, 7 og 10°C (Ceuppens et al. 2016).



### Kemiske farer

Generelt set er der her tale om fødevarer som har været godkendt til human ernæring og disse skal nødvendigvis opfylde alle krav til fødevarer ifølge gældende lovgivning. Der burde derfor ikke forefindes problematiske kemiske stoffer eller forureninger i disse i for høje niveauer. Fødevarestyrelsen fører løbende stikprøvekontrol med indholdet af tungmetaller i animalske produkter. I 2016 blev der udtaget 166 prøver af f.eks. oksekød, svinekød, kylling, får, hest og mælk der blev analyseret for indhold af bly, cadmium, kviksølv samt kobber. Generelt var indholdet af cadmium, kviksølv og bly meget lave – cadmium (op til 0,052 mg/kg i svinelever), kviksølv (op til 0,0013 mg/kg i svinenyre) og bly (op til 0,0034 mg/kg i svinenakkekam) (FVST, 2017). I EFSA's 2015 rapport over analyser for pesticidrester i fødevarer kan det ses at der er fundet pesticidrester i 25,6 % af prøverne og af disse var 1,4 % over MRL for forarbejdede fødevarer bl.a. oliven olie, appelsinjuice og hønseæg (EFSA, 2017).

### **Gruppe 9 (f.eks. husdyrgødning og indhold fra fordøjelseskanalen)**

Husdyrgødning er kategori 2 materiale jf. Biproduktforordningen (EF 1069/2009) og må derfor ikke anvendes til fremstilling af foder, hvilket også følger af Markedsføringsforordningens bilag III, kapitel I, punkt 1 (EF 767/2009).

### Biologiske farer

Indholdet af biologiske farer i husdyrgødning vil i høj grad afhænge af dyreart og sygdomsbilledet i besætningen hvorfra gødningen stammer. Selvom den overordnede prævalens af et bestemt smitstof (bakterie, virus, parasit) evt. er lav i husdyrbesætninger, kan enkelte besætninger have mange inficerede dyr som udskiller smitstoffet via gødningen og evt. i høje niveauer. Desuden kan farerne kategoriseres ift. om de udgør et produktionsmæssigt problem og/eller forårsager sygdom hos mennesker (zoonoser). De alvorligste smitsomme husdyrsygdomme listet i BEK 1332/2016 er anmeldeligt iht. LBK 21/2018 og vil være underlagt en bekæmpelsesplan eller andre kontrolforanstaltninger mhp. at undgå smittespredning f.eks. via gødning. Rapporten Animal Health in Denmark 2016 (MFVM 2017) viser seneste forekomst af disse anmeldeligt sygdomme; f.eks. mund- og klovesyge i 1983, kogalskab (BSE) i 2009, bluetongue i 2008, klassisk svinepest i 1933, Aujeszky's sygdom i 1991; brucellose i svin i 1999, højpatogen fugleinfluenza i 2016 (ellers i 2006) og Newcastle disease i 2005, mens mange andre aldrig er rapporteret i Danmark.

Zoonoseovervågningen i Danmark viser forekomsten af zoonoser i husdyr og dermed det potentielle indhold i de forskellige husdyrgødninger (Anon. 2017). I fjerkræ findes *Salmonella* spp. i 0,7 % af æglæggeflokke og 0,6 % af slagtekyllingeflokke mens ingen kalkunflokke var salmonella positive i 2016. *Campylobacter* blev fundet i 21,8 % af testede slagtekyllingeflokke på slagteriet og udskillelsesniveaue i gødning er typisk højt med 4-8 log CFU/g. I svin blev der på slagteriet i 2016 fundet antistof mod salmonella i 5,3 % af besætningerne, mens 18,2 % af testede dyr havde salmonella positive blindtarmsprøver (ofte subkliniske dyr med lav udskillelsesniveau). *Campylobacter* findes også hyppigt i svin (68 %), men det er typisk *C. coli* og ikke *C. jejuni*, som er den primære årsag til humane campylobacter infektioner (Anon. 2009). *Leptospira Bratislava* antistoffer blev fundet i 90 % af testede besætninger, mens kun 3,5 % af *Leptospira* spp. suspekter svinebesætninger blev testet positive.

I kvægbesætninger findes *Salmonella* Dublin i 2,7 % af ikke-malkekuvæg og 8,1 % af malkekuvægsbesætninger. *C. jejuni* findes i 58 % af kvægbesætninger (Anon. 2009). Antistoffer mod *Coxiella burnetii* (Q-feber) blev påvist i 7,7 % af testede dyr (Anon. 2017), men Q-feber er aldrig blevet konfirmeret i Danmark (MFVM 2017). Kvæg er også reservoir for verotoxin producerende *E. coli* VTEC, hvor bl.a. *E. coli* O:157 er fundet i 1,7 % af besætninger (Anon. 2012).

De humane infektioner med *Clostridium difficile* er steget, men betydningen af *C. difficile* fund i slagtekyllinger og svin (3 %) samt kvæg (15 %) i den sammenhæng er fortsat uafklaret (DANMAP 2010, 2012).

Resistensovervågningen i Danmark (DANMAP 2016) viser desuden forekomsten af antibiotika resistens i de zoonotiske bakterier samt i indikatorbakterier (fækal forurening). Spredning af resistente bakterier er uønsket da generne som koder for resistens evt. kan overføres til andre bakterier og derved bidrage til spredningen af resistens. Af *Salmonella* Typhimurium fra svin er 68-71 % resistente overfor ampicillin, sulfonamid and tetracyclin. For *C. jejuni* er ca. 20 % af isolater fra slagtekyllinger ciprofloxacin (fluoroquinolon) resistente og fra kvæg er det 25 % af isolaterne.

Blandt indikatorbakterierne er ca. halvdelen af *E. coli* fra svin og fjerkræ resistente, mens tallet er under 10 % for kvæg. *E. coli* fra svin er mest resistente overfor ampicilin, sulfonamid, trimethoprim og tetracyclin (30-42 %), mens *E. coli* fra slagtekyllinger udviser den største ciprofloxacin resistens (13 %). Den intensiverede overvågning (EU) af extended spectrum beta-lactamase (ESBL) og AmpC resistens (3. generations cephalosporiner) viste cefotaxime positive isolater i 16 % af slagtekyllinger (DANMAP 2016) og i hhv. 29 % og 8 % af svin og kvæg (DANMAP 2015).

For *Enterococcus faecalis* er 37 % og 50 % fra slagtekyllinger resistente overfor hhv. erythromycin og tetracyclin. Desuden er der fundet ciprofloxacin resistens i *E. faecalis* for første gang (DANMAP 2016).

Forskellige parasitter kan også udskilles i svine- og kvæggødning, ofte i form af forholdsvis hårdføre æg og oocyster. I svin findes særligt spoleorm (SEGES 2016), mens det i kvæg bl.a. er løbe-tarmorm, lungeorm, leverikter og coccidier, herunder *Cryptosporidium parvum*, som er en zoonose (Kvæg 2015).

Af virus udover de meget alvorlige anmeldeligt sjældne virussygdomme nævnt ovenfor, er der f.eks. i svin ofte porcine circovirus type 2 (PCV2) men også zoonotiske virus som rotavirus A (RV-A) og hepatitis E (Krog et al. 2017). Flere detaljer om smitstoffer i gylle kan findes i Miljøprojekt 606 (MST 2001).

#### Overlevelse af smitstoffer:

Hvilke smitstoffer der findes i husdyrgødning afhænger således af dyreart men også type af gødning (fast møg eller gylle) og opbevaringsforholdene, da fysisk/kemiske forhold som temperatur, ilt, pH og UV-lys i kombination med tid påvirker overlevelsen af smitstofferne (Erickson et al. 2015). Frisk husdyrgødning udgør den største smitterisiko, da der typisk vil ske et henfald af smitstofferne over tid ved lagring, men hvor henfaldshastigheden bl.a. afhænger af arten. Ved lagring i 6 mdr. af hhv. svine- og kvæggylle sås f.eks. en reduktion på ca. 2-4 log CFU/g for forskellige indikatorbakterier undtagen clostridier (Costa et al. 2017). Forskellig henfaldshastighed sås også for listeria, salmonella og *E. coli* (faldende) i temperaturintervallet 30-50°C, dog med indikation af lille genopblomstring af listeria og salmonella (Biswass et al. 2016). Højpatogen fugleinfluenza kunne ved forsøg genfindes i længere tid (96 timer) i fjerkrægødning end lavpatogen fugleinfluenza (<24 timer) (Hauck et al. 2017). For porcint parvovirus var inaktiveringstiden over 40 uger ved både 5°C og 20°C og 8 dage ved 55°C, mens den for

mund- og klovsyge er  $\geq 14$  uger ved 5°C, 2 uger ved 20°C og 1 time ved 55°C jf. Tabel 2.2. i rapporten "Occurrence and survival of viruses in composted human faeces" (MST 2003a).

Stigende temperatur vil ofte bidrage til at fremskynde henfaldet af smitstoffer, men pga. de andre mange indvirkende faktorer er det svært at angive præcise estimater på overlevelsestider, som kan variere fra dage til flere mdr. Generelt sker nedbrydning af organisk materiale under tilstedeværelsen af ilt (aerobt) hurtigere end uden ilt (anaerobt) og med en større varmeudvikling, som afhængig af den opnåede temperatur bidrager til hygiejniserende. Eksempelvis kom *E. coli* og salmonella ned under detektionsgrænsen efter hhv. 12 og 4 dage ved aktiv iltning sammenlignet med >60 og 20 dage i en anaerob tank (Pandey et al. 2016). Desuden skete henfaldet af *E. coli* og salmonella meget langsomt (>78 dage) i gødningsstak uden temperaturstigning (36°C) og igen med størst henfald for salmonella. Det viser betydningen af opnåede temperatur for henfald af smitstoffer under kompostering, hvor en *kontrolleret kompostering* vil kræve en temperatur på 55°C i minimum 2 uger jf. bekendtgørelse om anvendelse af affald til jordbrugsformål (slambekendtgørelsen) BEK1001 26/06/2018 bilag 3. Mens sådan en kompostering har en god reducerende effekt mod vegetative celler, vil det ofte være nødvendigt med længere tid for at opnå henfald af bakteriesporer. Eksempelvis viste Stanford et al. (2015) et begrænset henfald af *Bacillus cereus* efter 25 dage men >5 logs reduktion efter 150 dage, mens Xu et al. (2016) viste 1,5-2,2 logs reduktion efter 15 dage.

#### *Reduktion af smitstoffer ved behandling i biogasanlæg:*

Ved behandling af husdyrgødning i biogasanlæg omsættes gødningen anaerobt under mesofile <52°C (typisk 37°C) eller termofile >52°C forhold. Under mesofil omsætning er det bl.a. de fysisk/kemiske forhold som pH og konc. af ammoniak der i forskellig grad medvirker til reduktion af indikatorbakterier (Costa et al. 2017; Orzi et al. 2015). I en rapport fra Det Økologiske Råde (Anon. 2015) er sammenfattet hvor lang tid det tager at opnå en 90 % reduktion (dvs. 1 log) af en række bakterier ved hhv. mesofil og termofil nedbrydning sml. med ubehandlet gylle. Således opnås reduktionen indenfor 1 time ved termofil nedbrydning og 1-7 dage ved mesofil (streptokokker langsomt) nedbrydning sammenlignet med 1-6 uger i et ubehandlet gyllesystem. Ligeledes refereres at æg fra svinets spoleorm (*Ascaris suum*) dør efter 3 timer ved 50°C men først efter 10 dage ved 37°C. Fund af vancomycin resistente enterococci (Glaeser et al. 2016) og ESBL (Schauss et al. 2015) efter biogasbehandling indikerer risiko for spredning af resistensgener. Også virus som PCV2 og RV-A ser ud til umiddelbart at overleve anaerob omsætning, der dog ikke er specificeret nærmere (Fongaro et al. 2014).

Normkravene til nedbrydningsaffaldet fra biogasanlæg er at *E. coli* og *Enterococcaceae* ligger under 1000 CFU/g i 4 af 5 prøver, mens 1 prøve må ligge mellem 1000 og 5000 CFU/g; samt fravær af salmonella i 25 g, jf. bilag V, kap. III, afsnit 3, EU 142/2011.

For at fremme reduktionen af smitstoffer er biogasanlæg ofte forsynet med pasteuriserings/hygiejneenhed, hvor det organiske materiale opvarmes til 70 grader i minimum en time jf. bilag V, EU 142/2011. Jævnfør bekendtgørelse om anvendelse af affald til jordbrugsformål (Slambekendtgørelsen) BEK1001 26/06/2018 bilag 3, defineres 'kontrolleret hygiejniserende' som behandling af affald enten ved a) 70 grader i minimum en time; eller b) i biogasreaktor via kombinationer af forskellige 'mindste garanterede holdetider (timer) i reaktortanken' (MGRT) ved forskellige temperaturer og reaktortanke, se Tabel 4.

Tabel 4: Kombinationer af tid og temperatur som skal overholdes for at opnå kontrolleret hygiejnisering.

Temperatur °C	Separat hygiejniseringsstank <sup>3</sup>		
	Termofil reaktortank <sup>4</sup> (HRT <sup>2</sup> min. 7 døgn) MGRT <sup>1</sup>	Termofil reaktortank <sup>4</sup> (HRT <sup>2</sup> min. 7 døgn)	Mesofil reaktortank <sup>5</sup> (HRT <sup>2</sup> min. 14 døgn)
52,0	10		
53,5	8		
55,0	6	5,5	7,5
60,0		2,5	3,5
65,0		1,0	1,5

<sup>1</sup> MGRT: Mindste garanterede holdetid i reaktortanken - i timer

<sup>2</sup> HRT: hydrauliske opholdstid i reaktortanken

<sup>3</sup> Den kontrollerede hygiejnisering foregår i separat hygiejniseringsstank enten før eller efter udrådning i termofil<sup>4</sup> eller en mesofil<sup>5</sup> biogasreaktor

<sup>4</sup> Udrådning ved  $\geq 52$  °C eller derover.

<sup>5</sup> Udrådning ved 20-52 °C.

Jævnfør Slambekendtgørelsen, BEK1001 26/06/2018 bilag 3, må der i 'kontrolleret hygiejniseret affald' ikke kunne påvises salmonella og niveauer af *E. coli* samt enterokokker skal være under 100 CFU/g vådvægt. At en tilstrækkelig reducerende effekt afhænger af flere faktorer ses bl.a. i studie af Yin et al. (2016), hvor salmonella ved en start konc. på 6-7 log CFU/g ikke elimineres efter behandling ved 70°C i 60 min hvis tørstofindholdet overstiger 2 %. Behandling alene ved 70°C i 60 min vil også kun i begrænset omfang reducere indholdet af *Clostridia* sporer (Sahlström et al. 2008). Eventuelle alternative hygiejniseringsmetoder skal bevise en 5 logs reduktion af *Enterococcus faecalis* eller *Salmonella* Seftenberg og for varmeresistente vira, f.eks. parvovirus, en reduceret infektivitetstiter på mindst 3 log jf. bilag V kap III afsnit 2d & bilag XI, kap. I, afsnit 2c, EU 142/2011. Hygiejneenheden er dog ikke et krav for biogasanlæg som alene modtager husdyrgødning

#### Kemiske farer

I et nyt kinesisk studie blev indholdet af østrogen eller hormonforstyrrende stoffer i frisk afføring fra fødevarereproducerende dyr analyseret med følgende resultat: Estriol (289,8, 334,1, 330,3 og 33,7 µg/kg), 17β-estradiol (38,6, 10,9, 52,9 og 38,8 µg/kg), 17α-ethinyloestradiol (14,3, 11,3, 25,1 og 21,8 µg/kg) og bisphenol A (63,6, 48,7, 51,9 og 11,7 µg/kg) for henholdsvis hønse-, ande-, svine- og kvægafføring (Xu et al. 2018).

I et amerikansk studie blev der målt koncentrationer af frie og konjugerede østrogen (estrone (E1), 17α-estradiol (E2α), 17β-estradiol (E2β), estriol (E3), sulfat- og glucuronid-konjugater op til 7100 ng/L i den flydende fraktion af afføringen mens niveauet af frie østrogen var op til 630 ng/kg i den faste fraktion af afføringen (Noguera-Oviedo & Aga, 2016).

I et kinesisk studie fra 2004 blev afføringsprøver fra fødevarereproducerende dyr analyseret for en lang række metaller. De gennemsnitlige værdier var for: bly (11,8 – 12,80 – 9,74 mg/kg), cadmium (1,84 – 0,8 – 0,7 mg/kg), arsen (47 – 12 – 13 µg/kg) og kviksølv (24,2 – 33 – 39 µg/kg) for henholdsvis kyllinge-, svine- og kvægafføring (Cang et al. 2004). I endnu et kinesisk studie fra 2017 blev indhold af

metaller analyseret i svineafføring med følgende resultat: arsen (1,5 mg/kg), bly (2 mg/kg) og cadmium (2,5 mg/kg) (Wang et al. 2017). I et svensk studie blev der fundet niveauer af cadmium i afføring fra 330 slagtesvin på 130 op til 520 µg/kg tørvægt (Lindén et al. 2003), mens niveauet i et ungarsk studie med 200 svin lå på 30 µg cadmium/kg (våd vægt) (Gyori et al. 2005). I sidstnævnte studie blev indholdet af bly i svineafføring også målt til 570 µg/kg (våd vægt). Analyseresultaterne for de kinesiske afføringsprøver ligger lige på eller over grænseværdierne for metaller i foder for EU mens de svenske og ungarske ligger under.

Langt de fleste studier fundet er baseret på enten indhold i kompost (altså et videreforarbejdet produkt af afføringen som på den ene eller anden måde kan have ændret niveauet af de analyserede stoffer) eller på jordbundsprøver efter anvendelse af den afføringsbaserede kompost mens direkte prøver på afføring er mere sparsom og oftest fra Asien eller Sydamerika.

### Gruppe 10 (f.eks. slam)

Ifølge Markedsføringsforordnings bilag III, Kap. 1: forbudte materialer, pkt. 1 er det til foder forbudt at anvende fæces, urin og separeret indhold af fordøjelseskanalen efter tømning eller fjernelse af denne, uanset eventuel behandling (jf. pkt. 5) eller blanding (EF 767/2009). Spildevandsslam fra kommunale rensningsanlæg udgjorde i 2005 ca. 132.000 tons tørstof (MST 2009) og dets indhold af smitstoffer og kemiske forureninger vil udover udgangspunktet i spildevandet i høj grad afhænge af de fysisk/kemiske påvirkninger som smitstofferne udsættes for undervejs i renseanlægget.

#### Biologiske farer

Indholdet af smitstoffer i indløbsvandet til renseanlæg i Danmark vil bl.a. afhænge af sygdomsbilledet i befolkningen. Den potentielle udledning af forskellige smitstoffer fra humane sygdomstilfælde til rensningsanlæg kan i øvrigt ses via overvågningsdata, bl.a. i Annual Report of Zoonoses med følgende antal tilfælde af: *Campylobacter (jejuni/coli)* 4677, salmonella 1074, *Yersinia enterocolitica* 573, VTEC 269, *Listeria monocytogenes* 39, *Leptospira* spp. 10, *Brucella abortus/melitensis* 3 og endelig 1178 norovirus patienter (udbrud) (Anon. 2017). Disse tal vil dog typisk være underestimerede pga. ikke-diagnosticerede tilfælde. DANMAP rapporten viser forekomst af resistente bakterier, hvor der er set en stigende tendens i resistens overfor nogle af de kritisk vigtige antibiotika. Eksempelvis blev der i 2016 diagnosticeret 3550 nye tilfælde af MRSA, 312 ESBL/pAmpC og/eller carbapenemase producerende *E. coli* (blodinfektioner), 115 carbapenemase producerende bakterier og 434 vancomycin resistente enterokokker (primært *E. faecium*) (DANMAP 2016). Desuden har Statens Serum Institut et online søgeværktøj til visning af antal årlige tilfælde for en række af de øvrige anmeldtepligtige sygdomme jf. BEK nr 277 af 14/04/2000; f.eks. ses 38, 262 og 192 tilfælde af hhv. hepatitis A, B og C i 2017.

I rapporten "Occurrence and survival of viruses in composted human faeces" (MST 2003a) findes mere information om virus og deres overlevelsessevne, mens der i rapporten "Risikovurdering af anvendelse lokalt opsamlet fæces i private havebrug" er information om mulig patogenforekomst i fæces, inkl. modellering af potentiel overlevelse (MST 2005). I rapporten "Smitstoffer i spildevand" (MST 2003b) opgives følgende koncentrationsspænd (antal per 100 ml) for: termotolerante coliforme bakterier  $10^5$ - $10^8$ ; enterokokker  $10^5$ - $10^8$  og *Clostridium perfringens* sporer  $10^5$ ; for patogene bakterier som *Salmonella*  $<1$ - $10^4$  og *Campylobacter (jejuni/coli)* fra ikke påvist til  $10^5$ ; enterovirus fra ikke påvist til  $10^4$ ; protozoerne *Giardia intestinalis*  $1$ - $10^4$  og *Cryptosporidium parvum*  $0,1$ - $10^3$ .

Reduktionen af smitstoffer i spildevandet samt indholdet i det resulterede slam vil variere mellem rensningsanlæggene afhængig af kombinationerne af rensningstrin og hastighed gennem systemet samt eventuelle desinfektionstrin (f.eks. klor, ozon, UV) (Wang et al 2018). Også efterbehandlingen af spildevandsslammene varierer mellem rensningsanlæg. Langt størstedelen af slammene stabiliseres biologisk enten ved anaerob udrådning i rådnetank eller ved aerob langtidsbeluftning og derefter vil knap halvdelen af det stabiliserede slam behandles yderligere inden slutdeponering (MST 2009). Af denne yderligere behandling omfatter hygienisering ca. 7 %. Dog kan disse tal være forbundet med vis usikkerhed pga. mangelfulde indberetninger (MST 2009). Samtidig blev det for 2005 opgjort at ca. 43 % af slammene anvendes i landbruget, hvor kun slam der har undergået kontrolleret hygiejniserings kan anvendes til jordbrugsformål uden restriktioner jf. bilag 3 i slambekendtgørelsen (BEK1001/2018), se under gruppe 9.

Smitstofreduktionen ved behandling af slammene vil bl.a. afhænge af temperaturen og øvrige fysisk/kemiske faktorer, tilsvarende tidligere beskrivelse under gruppe 9. Levantesi et al (2015) viser f.eks. at termofil udrådning af slam har større reducerende effekt af bl.a. *E. coli* (>2,9 vs. 1,2 log) end mesofil udrådning og samtidig at effekten afhænger af smittestoffet. Dog var salmonella startniveauet generelt lavt ( $1,2 \times 10^2$  MPN/gDW) og under detektionsgrænsen for de fleste behandlinger. Reduktion af *Clostridium perfringens* sporer sås kun ved at forbehandle slammene 20 min ved 135°C, og som også øgede reduktionen af somatiske colifager (indikator for fækal udskilt virus). Virus overlever generelt længere ved lave temperaturer end høje temperaturer som øger inaktivering. Hepatitis A som er én af de mest varmestabile enterovirus inaktiveres ikke fuldstændigt efter 30 min ved 60°C eller 10 min ved 70°C, mens 10 timer ved 60°C inaktiverer HAV. I en undersøgelse af forskellige typer stabiliseret slam blev der fundet enten adenovirus eller norovirus GI/GII i 4 af 24 prøver, som også indikerer varierende reduktionseffekt afhængig af stabiliseringsmetode (Tozzoli et al. 2016).

#### Kemiske farer

Indholdet af kemiske forureninger i spildevandsslam fra danske rensningsanlæg og som ønskes anvendt til udspreddning på bl.a. landbrugsjord skal leve op til grænseværdierne i slambekendtgørelsen (afløses af "affald til jord" bekendtgørelsen) for syv metaller og fire grupper af miljøfremmede organiske stoffer (se også gruppe 6, kemiske farer). Man har senere også valgt at inkludere måling af indhold af PCB – men her er endnu ikke etableret en grænseværdi. I Tabel 5 ses analyseresultaterne af analyseret slam i 2005 fra danske rensningsanlæg samt et analyseresultat fra Grindsted rensningsanlæg fra 2017 (MST 2009, Eurofins 2017).

Udover stofferne som der analyseres for i spildevandsslam til udspreddning på jord er der mange udenlandske data på at der findes en bred vifte af organiske og miljøfremmede stoffer i spildevand som dioxiner og furaner, pesticider, medicinrester og hormoner såvel som arsen (Werle & Dudziak, 2014; Demirbas et al. 2017). I en undersøgelse af dansk slam eksporteret til Tyskland blev der undersøgt for niveauer af PCBer, dioxiner og tungmetaller. Der blev ikke fundet overskridelser af grænseværdierne for PCBer og dioxiner (tysk grænseværdi på 100 ng/kg) mens der var en lettere overskridelse for cadmium, kviksølv og nikkel. De tyske grænseværdier er generelt højere end de danske for alle kategorier (MST 2012a). I et omfattende projekt under MST blev slam undersøgt for indhold af bromerede flammehæmmere (en stor gruppe af stoffer med forskellig grad af bromering f.eks. polybrominated diphenyl ethers (PBDE)), musk (polycykliske stoffer brugt i kosmetik), lægemidler, PCBer og perfluorerede stoffer (f.eks. perfluoro-octane-sulfonate (PFOS) og perfluoro-octanoate (PFOA)). Alle ovenfor nævnte stofgrupper er fundet i danske slamprøver men for PCBer,

lægemidler, muskstoffer og bromerede flammehæmmere udgør de ”med stor sandsynlig ikke et miljøproblem for jordbundsorganismer, afgrøder og andre planter i relation til spildevandsslam. Den fundne sikkerhedsmargin for de polyflouerede stoffer ligger derimod på grænsen af, hvad EU anbefaler i deres retningslinjer under REACH-programmet” (MST 2012b). Miljøstyrelsens konklusion er baseret

<b>Tabel 5:</b> Analysedata for slam samt grænseværdier for analyserede stoffer (mg/kg TS)			
Tungmetaller og orgniske stoffer	Analyseret slam*	Grænseværdi jf. slambekendtgørelsen	Afvandet slam – Grindsted Renseanlæg
Bly	59,1	120	63
Cadmium	1,3	0,8	1,6
Kobber	291	1000	110
Krom	25,2	100	24
Kviksølv	1,6	0,8	0,32
Nikkel	26,7	30	18
Zink	816	4000	620
LAS	462	1300	240
PAH	1,5	3	Sum af 9 PAH: 1,1
NPE	7,8	10	Sum af 3 NPE: 3,5
DEHP	15,2	50	17
PCB	-	**	Sum af 7 PCB: < 0,1

\* Vægtet gennemsnitskoncentration

\*\* MST vejledende grænseværdi på 0,08 mg/kg TS for summen af 7 stoffer. Tysk grænseværdi på 0,2 mg/kg TS for enkeltstoffer

LAS: Lineære alkylbenzensulfonater

PAH: Polycykliske aromatiske hydrocarboner

NPE: Nonylphenol (+ethoxylater)

DEHP: Di(2-ethylhexyl)phthalat

PCB: Polyklørede biphenyler

på at slammet anvendes til udspreddning på jord – hvis slammen derimod skal bruges som f.eks. substrat til insekter må risikoen for bioakkumulering i insekterne og forgiftning af disse undersøges.

### INDHOLD AF FARER I INSEKTER OPDRÆTTET PÅ KONTAMINERET SUBSTRAT:

Insekterne som er medtaget i denne undersøgelse er primært de syv arter som er tilladt at anvende til fiskefoder jf. EU Forordning 2017/893 som nævnt i Tabel 6, hvor også udviklingsstadiet hvor de typisk anvendes som foder eller fødevarer er givet.

<b>Table 6:</b> Insekt	Udviklingsstadiet hvor de anvendes
<i>Musca domestica</i> : Common housefly, stueflue	Larve
<i>Hermetia illucens</i> : Black soldier fly, sort soldaterflue (BSF)	Larve
<i>Tenebrio molitor</i> : Yellow mealworm, melskrubbe, alm. melorm	Larve
<i>Alphitobius diaperinus</i> : Lesser mealworm, hønseribille, lille melorm	Larve
<i>Acheta domesticus</i> : House cricket, husfårekilling	Voksen
<i>Gryllodes sigillatus</i> : Banded cricket, sribet fårekilling	Voksen
<i>Gryllus assimilis</i> : Field cricket, steppefårekilling	Voksen

## Biologiske farer

Insekter har generelt et højt indhold af mikroorganismer, hvoraf nogle er insektspecifikke mens andre optages gennem føden. Disse inkluderer både patogener og opportunistiske patogener samt toksindannende organismer og tilhører bl.a. slægterne enterokokker, streptokokker, stafylokokker, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* og under Enterobacteriaceae bl.a. *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Shigella* og *Yersinia* (Schlüter et al. 2017). De generelle mikrobielle niveauer af totalkim, Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria (LAB), bakteriesporer og svampe der er fundet i forskellige opdrættede insekter er vist i Tabel 7.

I en kvalitativ risikovurdering af mel af fårekylinger til underernærende børn, vurderedes *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Cronobacter sakazakii* samt toksin dannerne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* og *Clostridium perfringens* at være de mest relevante bakterier trods begrænsede data mht. forekomst i fårekylinger (Walia et al. 2018).

Risikovurderingen blev derfor baseret på en kombination af sandsynlighed for forekomst af bakterien og i tilstrækkelig infektiv dosis, samt alvorlighed af infektionen. Risikoen for sygdom vurderes moderat for *B. cereus*, *C. perfringens* Type A, *Salmonella* spp., og *S. aureus* mens den er alvorlig for *C. perfringens* Type C, *C. sakazakii*, *Enterohemorrhagic E. coli* and *L. monocytogenes*. De vegetative bakterier forventedes at kunne reduceres ved at koge melet til grød (5 min), mens sporerne vil kunne overleve, og evt. udgøre risiko hvis temperatur understøtter vækst til et niveau hvor toksindannelse kan indtræffe, dvs. omkring  $10^5$  CFU/g for *B. cereus* og  $10^8$  CFU/g for *C. Perfringens*.

Risikorangeeringen efter kogning vurderes således til at være lav for *S. aureus*, lav til moderat for *B. cereus*, *C. perfringens* Type A, *C. sakazakii*, *enterohemorrhagic E. coli*, *L. monocytogenes* og *Salmonella* spp. og moderat til alvorlig for *C. perfringens* Type C (Walia et al. 2018).

### Effekt af substrat

Forskellige fluer er efterhånden fundet positive for en lang række af human- eller veterinærpatogene mikroorganismer opsamlet fra omgivende miljø, der indikerer deres potentielle rolle som vektor for transmission af smitstoffer, men samtidig er der også fundet forskellige stoffer med antibakteriel virkning som en del af fluernes immunrespons (De Smet et al. 2018). Når forskellige opdrættede insekter testes kvalitativt for tilstedeværelse af *Salmonella* spp., er det oftest med negativt resultat, se Tabel 7, Dette er sandsynligvis et resultat af god hygiejne og fokus på anvendelse af salmonellafrigt substrat i insektproduktion, og afspejler dermed ikke hvad der sker hvis insektet eksponeres til salmonella.

Substratets betydning for indholdet af mikroorganismer indikereres af, at der i larver af sort soldaterflue (*Hermetica illucens*) blev fundet langt flere bakteriearter efter dyrkning på madaffald sammenlignet med bl.a. kogt ris, men også at en del bakterier var til stede uafhængigt af substrattypen, som refereret af De Smet et al. (2018). Ligeledes ændrede bakteriesammensætningen sig gennem udviklingsstadierne, selvom de fik samme type substrat. Dermed har andre faktorer end substratet alene betydning for bakterieindholdet i fluelarverne.

Wynants et al. (2018) testede den lille melorm (*Alphitobius diaperinus*) gennem en produktionsperiode på 35 dage, hvor de mikrobielle niveauer ikke ændrede sig signifikant over tid (se Tabel 7).

Sekvensanalyse af mikrobiota sammensætningen indikerede til gengæld ændringer over tid gående mod mindre diversitet, sandsynligvis med arter med en konkurrencemæssig fordel. Selvom der var overlap i mikrobiota mellem substratet og larver, som indikerer at substratet var kilden, var der også bakterier, som kun blev fundet i larverne. I dette studie blev der fundet forholdsvis høje niveauer af



endosporer (5-5,8 log CFU/g), men der blev ikke fundet *Bacillus cereus* over detektionsgrænsen (100 CFU/g). Ligeledes var koagulase-positive stafylokokker under detektionsgrænsen (100 CFU/g) og hverken *Listeria monocytogenes* eller *Salmonella* spp. blev påvist.

**Tabel 7:** Mikrobielt indhold i opdrættede insekter ved høst.

Insekt:	Log CFU/g ( $\pm$ standardafvigelse)					Reference
	Total kim	Entero-bacteriaceae	Lactic acid bacteria (LAB)	Endo-sporer	Svampe	
<b>Larver:</b>						
Lille melorm <sup>1,2</sup> <i>Alphitobius diaperinus</i>	7,8 - 8,3	5,9 - 7,6	5,2 - 6,5	5,0 - 5,8	4,7 - 5,4	Wynants et al. 2018
Alm. melorm <sup>1,4</sup> <i>Tenebrio molitor</i>	8,5 $\pm$ 0,1 8,2 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,2 6,1 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,3 7,7 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,1 3,7 $\pm$ 0,1	ND	Osimani et al. 2018a
Alm. melorm <sup>1,6</sup> <i>Tenebrio molitor</i>	8,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 0,3	Vandeweyer et al. 2017a
Alm. melorm <sup>9</sup> <i>Tenebrio molitor</i>	7,9 - 8,4	6,9 - 7,6	ND	1,5 - 2,0	5,6 - 6,5	Wynants et al. 2017
Alm. melorm <sup>8</sup> <i>Tenebrio molitor</i>	7,7 - 8,3	6,8 - 7,6	7,0 - 7,6	<1,0 - 3,5	5,2 - 5,7	Stoops et al. 2016
Sort soldaterflue <sup>5</sup> <i>Hermetica illucens</i>	7,2 $\pm$ 6,3	6,1 $\pm$ 5,4	ND	ND	6,8 $\pm$ 6,2	Kashiri et al. 2018
<b>Voksne:</b>						
Stribet fårekyling <sup>1,3</sup> ( <i>Grylodes sigillatus</i> )	8,5 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,4	3,7 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 0,3	Vandeweyer et al. 2018
Fårekyling <sup>1,6</sup> <i>G. sigillatus</i> / <i>A. domesticus</i>	8,4 $\pm$ 0,1	7,7 $\pm$ 0,1	7,9 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2	Vandeweyer et al. 2017a
Vandregørshopper <sup>7</sup> <i>Locusta migratoria</i>	7,8 $\pm$ 0,1 8,6 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 0,2 7,6 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,3 8,5 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,1 3,8 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,3 5,0 $\pm$ 0,2	Stoops et al. 2016

<sup>1</sup> Fravær af *Salmonella* spp. og *Listeria monocytogenes* i 25 g.

<sup>2</sup> Prøver taget på dag 14, 21, 28 og 35; tallene viser laveste og højeste gennemsnit (n=3) i perioden (ingen signifikant forskel over tid).

<sup>3</sup> Prøver taget på dag 40 (n=3).

<sup>4</sup> Resultat for to forskellige batch prøvetaget ved høst (120-180 dage jf. fig.) (n=2).

<sup>5</sup> Før-puppe larver frosset ved -20°C 1 time og tørret ved 80°C i 2 timer før analyse. *Listeria* ikke påvist. *Salmonella* spp. 6,1 $\pm$ 5,7 log CFU/g. Antal replikater ikke oplyst.

<sup>6</sup> Gennemsnit af prøver (triplikater) fra 3 forskellige opdrættere med 3 batch fra hver.

<sup>7</sup> Resultat for to forskellige batch (n=3); signifikant forskellige undtagen for svampe.

<sup>8</sup> Spænd af gennemsnit fra 3 forskellige batch (n=3).

<sup>9</sup> Spænd af gennemsnit fra 4 forskellige forsøg (hver et gennemsnit af 2-3 replikater fra 3 forskellige batches).

I to batch af alm. melorm (*Tenebrio molitor*) testet ved høst (120-180 dage) var de bakterielle niveauer i larverne (Tabel 7) alle højere end i fodersubstratet, undtagen for bakteriesporer der lå på samme niveau (Osimani et al. 2018a). Sekvensanalyser viste dominans af *Enterococcus*, *Lactococcus* og *Enterobacteriaceae* (87 %) i både larver og frass. Af *Enterobacteriaceae* blev der i larver fundet

tættest slægtskab til *Enterobacter*. Real-time PCR viste specifikt fravær af *Coxiella burnetii* (Q-feber), VTEC og *P. aeruginosa*.

Vandeweyer et al. (2017a) viste, at det mikrobielle indhold i såvel melorm (*Tenebrio molitor*) som fårekylinger (*Grylloides sigillatus* el. *Acheta domesticus*) varierede mellem opdrættere men også mellem batches fra hver opdrætter (Tabel 7). Eksempelvis varierede særligt endospore indholdet i melorm fra 1,7 til 5,0 log CFU/g. Der var også forskelle mellem arterne med overordnet flere gær og svampe i fårekylingerne, muligvis som følge af forskelligt foder og opdrætsforhold som vil kunne indvirke på smitstoffernes vækstmuligheder f.eks. ift. fugt.

Vandeweyer et al. (2018) testede den stribede fårekyling (*Grylloides sigillatus*) gennem produktionsperioden på 40 dage (Tabel 7), hvor det kun var LAB som steg gennem perioden. Sekvensanalyse af mikrobiota sammensætning indikerede en sammenhæng mellem den der er i substratet, og den fårekylingerne får, mens der ikke så ud til at være overførsel af mikrobiota fra substratet som æggene klækkes i til æggene. I øvrigt blev der påvist *Acinetobacter* spp. (opportunistisk nosokomial patogen) i fårekylingerne, og som evt. skyldes fodring med gulerødder, hvor *Acinetobacter* spp. tidligere er påvist.

#### Vertikal transmission:

De voksne fluer kan som nævnt fungere som vektor for smitstoffer, men i forbindelse med opdræt af fluelarver, vil det mest være relevant at se på, om der i reproduktionscyklussen kan ske en vertikal spredning fra inficerede fluer til æg og nye larver og dermed til selve larveproduktionen. Pava-Ripoll et al. (2015) fodrede voksne stuefluer med lav, medium og høj koncentration af hhv. *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii*, *E. coli* O157:H7 og *Listeria monocytogenes*, hvorefter fluerne lagde æg som fik lov til at udvikle sig til nye voksne. Mens alle fire bakteriestammer blev fundet i æggene sås kun *S. enterica* og *C. sakazakii* i de nye fluer, men forsøgets design tillod dog ikke fuldstændigt at konkludere, at der var tale om sand overførsel via æggene og ikke blot via overfladekontaminering af æggene under lægningen. I et andet forsøg sås overførsel af *C. jejuni* fra kontamineret stuefluelarver til deres pupper (5,3±0,1 log CFU/g) men ikke videre til det voksne stadie (Bahrdorff et al. 2014).

#### Salmonella:

Et studie fulgte forekomst af hhv. *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* og *C. jejuni* i fluelarver (*Musca domestica*) videre til puppe og voksne fluer efter dyrkning af larverne i kontamineret hønsegødning (ca. 10<sup>9</sup> CFU/g) (Nordentoft et al. 2017). Efter én dag indeholdt larverne høje niveauer af testbakterierne (>10<sup>6</sup> CFU/g larve), mens der efter 4 dage kun blev fundet *C. jejuni* efter et opformeringstrin. Larverne forpuppede undervejs i forsøget og *S. Enteritidis* blev fundet i pupper på dag 3 efter et opformeringstrin, mens alle senere pupper samt voksne fluer resulterede i negativt testresultat.

Et andet studie undersøgte sammenhængen mellem *Salmonella* Typhimurium niveauer i kyllingegødning (0, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup> og 10<sup>7</sup> CFU/ml) og så fund i den lille melormebille (*Alphitobius diaperinus*) efter 4 eller 24 timers eksponering (Crippen et al. 2018). Meget få salmonella blev fundet i billen efter eksponering til 10<sup>3</sup> CFU/ml, mens op til 3,5×10<sup>4</sup> CFU/bille blev fundet efter eksponering til de højere niveauer. Fokus i denne artikel var imidlertid vektor potentialet af billen mht. mulig smitte af kyllingeflokke, mens det ved opdræt af den lille melorm er larven og ikke billen som anvendes til foder el. fødevarer, og resultaterne vil måske ikke afspejle larvens respons til salmonella.

*Listeria* er en miljøbakterie som evt. kan gemme sig i produktionsmiljøer, men der er i de gennemgåede artikler ikke påvist *L. monocytogenes* i den lille melorm (*Alphitobius diaperinus*) (Wynants et al. 2018) eller i sribet fårekylning (*Gryllodes sigillatus*) (Vandeweyer et al. 2018). I kogte og tørrede melorm (*Tenebrio molitor*) og i formalede husfårekylninger (*Acheta domesticus*) blev der heller ikke påvist *L. monocytogenes* mens sekvensanalyser dog viste indhold af *Listeria* spp. (Garofalo et al. 2017).

#### Resistens:

Tilstedeværelsen af udvalgte overførbare resistens gener i alm. melorm (Ready-To-Eat (RTE); kogt, tørret og saltet) indkøbt fra hhv. Belgien, Frankrig, Holland og Thailand (n=40) blev undersøgt vha. PCR påvisning (Osimani et al. 2017a). Genet *tet(K)* (tetracycline resistens) blev fundet i 80 til 100 % af prøverne; *erm(B)* (erythromycin resistens) i 57,7 %; *vanA* (vancomycin resistens) blev fundet i 90 % og 10 % i hhv. Frankrig og Belgien; *aac-*acp** (aminoglykosid resistens) varierede mellem lande, hhv. 0 % i Frankrig, 40 % i Belgien og Holland, og 20 % i Thailand. Generne *blaZ* (beta-lactamase fra *S. aureus*) og *mecA* (methicillin resistens) blev påvist i hhv. 10 % og 5 % af prøverne. I et andet studie af samme forfattere, blev der i andre insekter forarbejdet tilsvarende, fundet resistensgener (*tet*) i 27 %, 9 % og 27 % af hhv. husfårekylning (*Acheta domesticus*), vandreggræshoppe (*Locusta migratoria*) og melorm (*T. molitor*) (Milanovic et al. 2016). Derimod blev der af uvis grund ikke fundet resistensgener i formalet husfårekylningemmel, til trods fra at det stammede fra samme producent som de hele insekter. Derudover kunne produkterne stort set grupperes efter om de kom fra Thailand eller Holland, og selvom produktionsforholdene ikke er kendt, afspejler det evt. forskellig anvendelse af biocider, hvor bl.a. uhensigtsmæssig brug af triclosan, kvartære ammoniumforbindelse, klorhexidin og trinatriumfosfat korreleres til udvikling af resistens. Fund af gener vha. PCR siger imidlertid ikke noget om hvilken organisme de er fundet i, eller om genet er udtrykt, ligesom nogle bakterier er naturligt resistente og derfor ikke nødvendigvis afspejler brug af antibiotika. Ifølge EFSA Opinion (EFSA 2015) er brugen af antibiotika begrænset til opdrættede insekter bl.a. undtaget silkeorm hvor chloramphenicol evt. anvendes.

#### Afrikansk svinepest virus (ASV):

Der er ikke fundet data mht. optag og overlevelse af veterinærpatogene virus for de syv insekter som er tilladt til fiskefoder. Men i et eksperimentelt studie blev larver af to forskellige spyfluer (*Lucilia sericata* og *Calliphora vicina*) overført til miltvæv inficeret med afrikansk svinepest virus, hvor larverne fik lov til at udvikle sig indtil puppestadiet (dag 10) (Forth et al. 2017). ASV DNA blev fundet i alle larver i moderate mængder og i pupper i lav mængde. Der blev dog ikke fundet infektiøst virus i hverken larver eller pupper og ikke engang i det inficerede materiale som larverne var fodret på. Sidstnævnte var overraskende, men kan evt. forklares ved sekretion af spyt med patogeninaktiverende effekt, som også kendes fra sårbehandling.

En undersøgelse af staldfluers (*Stomoxys calcitrans*) vektorpotentiale mht. overførsel af ASV viste, at for fluer som var fodret på virusinficeret blod (5,2 log TCID<sub>50</sub>/ml) i én time, var hhv. 20-30 % af munddele og 50-90 % af hoveder positive for ASV DNA 0-12 timer efter fodring, mens 80-100 % af kroppe var positive op til 36 timer efter fodring (Olesen et al. 2018a). Efter 72 timer var kun få kroppe ASV DNA positive, mens infektiøst virus blev fundet i fluekroppe indtil 12 timer efter fodring. Et andet studie af samme forfattere viste, at 8-9 uger gamle grise kunne inficeres med ASV ved at spise 20 fluer der var blevet fodret med inficeret blod (Olesen et al. 2018b).

#### Prioner:

I EFSA opinion (EFSA, 2015) er der en gennemgang af risici vedrørende insekter og prioner, hvor insekters rolle som mekanisk vektor ikke kan udelukkes, men der ikke fundet yderligere data.

#### Svampe:

I Wynants et al. (2018) blev svampe isoleret fra lille melorm (*Alphitobius diaperinus*) og deres fodersubstrat, hvor der i det tørre substrat bl.a. blev fundet *Fusarium* sp. og *Penicillium* sp.; i det fugtige bl.a. *Fusarium* sp. og *Candida* sp., mens der i larverne bl.a. blev fundet *Aspergillus flavus*. Ligeledes blev der i sribet fårekylning (*Grylloides sigillatus*) og dens fodersubstrat fundet forskellige svampe hvoraf nogle overlappede (Vandeweyer et al. 2018). I fårekylningerne blev der bl.a. fundet *Aspergillus*, samt *Candida*, *Kodamaea*, *Lichtheimia*, *Tetrapisispora*, *Trichoderma*, og *Trichosporon*. Trods fundet af potentielle mykotoksindannere, siger det ikke om der er mykotoksin til stede. Et eksperimentelt studie med sort soldaterflue (*Hermetica illucens*) viste, at supplerings af kyllingefoder med grønsagsrester (varmebehandlet, bl.a. kartoffel, gulerod og tomat) øgede diversiteten af svampe i tarmen af fluelarverne (Boccazzi et al. 2017). Sekvensanalyser viste bl.a., at gærsvampene *Pichia Kazachastania* og *Kluyveromyces* kun forekom i grønsagsfodrede larver, og tilsvarende *Candida* og *Geotrichum* kun i larver fodret med kyllingefoder. Larver fodret med grønsager 7 dage i stedet for 4 dage udviste lavere svampediversitet, sandsynligvis fordi nogle arter vil kunne udkonkurrere andre bl.a. via dannelse af toksiner. Disse gærsvampe toksiner vil typisk inaktiveres ved temperaturer >50°C mens mykotoksiner er langt mere varmeresistente. Det bør i øvrigt bemærkes, at der var tilsat bredspektret antibiotika til substraterne, og ved således at undertrykke bakterievæksten har man formodentligt forbedret vækstmulighederne for svampene.

## Kemiske farer

### Insekter høstet i larvestadiet

I Biancarosa et al. (2017) blev laver af sort soldaterflue (*Hermetica illucens*) (BSFL) dyrket i 8 dage på et substrat af tang (*A. nodosum*), høstet i Norge, undersøgt for indhold af tungmetaller. Forsøget viste, at BSFL optager cadmium, bly, kviksølv og arsen fra tang. Ved et substrat bestående af 50 % hvede og 50 % tang blev følgende koncentrationer målt i larverne: cadmium (1,6 mg/kg), bly (0,16 mg/kg), kviksølv (0,012 mg/kg), arsen (9,2 mg/kg) – alle tørvægt. Studiet viste at BSFL akkumulerer tungmetallerne fra tangen, jo højere procentdel af substratet som var tang jo højere koncentrationer i larverne. Ifølge forfatteren er akkumuleringen af cadmium 5-6 gange højere end for bly og kviksølv og 11-12 gange højere end for arsen. Koncentrationen af bly og kviksølv overskred ikke EU grænseværdi i foder, mens cadmium og arsen var over grænseværdierne (0,5 og 2 mg/kg).

I Van der Fels-Klerx et al. (2016) blev BSFL og melorme (*T. molitor*) dyrket på substrat tilsat henholdsvis cadmium, bly og arsen i koncentrationer på ½, 1 eller 2 gange grænseværdien for de respektive stoffer i foder i EU. Dødelighed og vækst af larverne var ikke påvirket af forureningen af substraterne med metallerne. Bioakkumulering af cadmium og bly sås i BSFL og for arsen i melorme. Niveauet af cadmium var over grænseværdien for foder (1 mg/kg fuldfoderblanding) i larver dyrket selv på substrat med et niveau af cadmium på halvdelen af grænseværdien. Ligeledes sås en akkumulering af arsen i melorme som også var over grænseværdien for foder (2 mg/kg

fuldfoderblanding) selv om de var dyrket på substrat som overholdt grænseværdien.

Bioakkumuleringen i BSFL af cadmium (op til 3 gange) men ikke af bly blev fundet i et studie af Diener et al. 2015.

I Purschke et al. (2017) blev BSFL dyrket i 10 dage på korn-baserede substrater kunstig forurenede med: tungmetaller (arsen, cadmium, krom, kviksølv, nikkel og bly), mykotoksiner (aflatoxin, deoxynivalenol, ochratoxin A, zearalenone) og pesticider (chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl). De kemiske forureningers indvirkning på larvernes vækst og evt. akkumulering af stofferne i larverne blev undersøgt. Larver dyrket på substrater forurenede med tungmetaller udviste forringet vækst i forhold til kontrolgruppe. Cadmium og bly akkumuleredes i larverne med henholdsvis en faktor 9 og 2, mens indhold af de andre metaller var under niveauet i substratet. For mykotoksiner og pesticiders vedkommende påvirkede disse ikke larvernes vækst og de blev ikke akkumuleret i larverne.

I van Broekhoven et al. (2017) blev melorme (*T. molitor*) dyrket på hvedemel, enten naturlig kontamineret med deoxynivalenol (DON) (4,9 mg/kg), tilsat DON (8 mg/kg) eller rent hvedemel. Overlevelse (>98 %) og vækst af melormene var ikke forskellig for nogen af substraterne. Der blev analyseret på høstede larver og fæces. Der blev ikke fundet værdier af DON i melormene over detektionsgrænsen, mens der blev udskilt henholdsvis 14 % og 41 % af indtaget af DON fra melorm dyrket på naturlig kontamineret og kunstig kontamineret hvedemel. Hvordan melormene metaboliserer DON og til hvilke evt. toksiske metabolitter vides ikke.

I Bosch et al. (2017) blev BSFL og melorme (*T. molitor*) dyrket på hønsefoder forurenede med aflatoxin B1 i koncentrationer af 0,01 til 0,5 mg/kg. Dødelighed og vækst blev ikke påvirket af foder med indhold op til 0,5 mg/kg aflatoxin. Aflatoxin blev ikke akkumuleret og kunne ikke detekteres i BSFL (detektionsgrænse 0,1 µg/kg) mens melorme dyrket på substrater med mere end 0,02 mg/kg havde et indhold af aflatoxin på op til 0,0018 mg/kg (EU grænseværdi 0,02 mg/kg foder). Hvis larverne blev overført til og dyrket på aflatoxinfri foder i 2 dage kunne man ikke længere detektere aflatoxin i dem. Endvidere blev der analyseret for én metabolit af aflatoxin AFM1. Denne blev ikke fundet i detekterbar mængde i hverken BSFL eller melorme men det blev påvist at melormene udskilte det til frassen.

Camenzuli et al. (2018) undersøgte i et omfattende studie BSFL og den lille melorm (*Alphitobius diaperinus*, LMW) dyrket på substrater forurenede med aflatoxin B1, deoxynivalenol (DON), ochratoxin A eller zearalenone, samt med en blanding af disse i koncentrationer på 1, 10 eller 25 gange EU's grænseværdi for de respektive mykotoksiner i foder. Der blev analyseret på selve mykotoksinerne og på flere af deres metabolitter i høstede larver og frassen. Der blev ikke observeret forskelle på insekternes udvikling afhængig af dyrkningssubstraternes indhold af enkelte mykotoksiner eller blandinger af disse. Der fandt ingen akkumulering af mykotoksiner sted i hverken BSFL eller LMW og der blev kun detekteret meget lave koncentrationer i BSFL, ligesom det blev vist, at begge insektarter metaboliserede eller/og udskilte dem.

Poma et al. 2017 undersøgte indhold af organiske forureninger (f.eks. bromerede flammehæmmere, PCB'er, dioxiner, pesticider) og metaller (arsen, cadmium, kobolt, krom, kobber, nikkel, bly, tin og zink) i kommercielle produkter af bl.a. græshopper og melorme. En opsummering af resultatet er vist i Tabel 8.

**Table 8:** Koncentrationer af visse organiske miljøfremmede stoffer og metaller i græshopper og melorme

	Græshoppe	Melorm ( <i>T. molitor</i> )	Melorm ( <i>A. diaperinus</i> )	Grænseværdi i foder EU/2002/32
PCB total	2065 (pg/g ww)	26,5 (pg/g ww)	33,8 (pg/g ww)	-
OCP total	260 (pg/g ww)	156 (pg/g ww)	46,3 (pg/g ww)	-
PBDE total	13,9 (pg/g ww)	< LOQ	< LOQ	-
HFR total	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-
PFR total	1542 (pg/g ww)	11562 (pg/g ww)	23786 (pg/g ww)	-
Krom	0,12 (mg/kg)	0,18 (mg/kg)	0,15 (mg/kg)	-
Kobolt	< 0,03 (mg/kg)	0,05 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	-
Nikkel	0,2 (mg/kg)	0,28 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	-
Kobber	9,12 (mg/kg)	5,81 (mg/kg)	7,72 (mg/kg)	-
Zink	37,1 (mg/kg)	58,6 (mg/kg)	54,1 (mg/kg)	-
Arsen	< 0,03 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	2 mg/kg
Cadmium	0,03 (mg/kg)	0,06 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	1 mg/kg
Tin	< 0,03 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	-
bly	< 0,03 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	< 0,03 (mg/kg)	5 mg/kg

LOQ: Limit of quantification

PCB: Polyklorede biphenyler

OCP: Klorede pesticider

PBDE: Bromerede biphenyler

HFR: Halogenerede flammehæmmere

PFR: Fosforylerede flammehæmmere

Det er ikke opgivet hvilket substrat græshopperne og melormene er dyrket på, men i kraft af at de er lovligt indkøbt som egnede til menneskeføde, må de nødvendigvis have vokset på et lovligt substrat hvis de er fra EU. Niveauerne af tungmetaller og organiske stoffer blev i studiet sammenlignet med niveauer i andre animalske proteinkilder – f.eks. kød og fisk – og blev fundet til generelt at være lavere i insekterne.

Houbraken et al. (2016) undersøgte optagelse, eventuel akkumulering og udskillelse af 12 pesticider i larver af *Tenebrio molitor*. Hvedeklid og hvedemel blev anvendt som basis substrat for larverne og de blev eksponeret for pesticiderne via en gulerod (larvernes væskkilde) som var dyppet i en cocktail af de 12 pesticider i 48 timer. To grupper af eksponerede larver blev analyseret – den ene straks efter fjernelsen fra pesticidsubstratet den anden efter at have været fastede i 24 timer. En kontrolgruppe var inkluderet i forsøget hvor substratet var det samme bortset fra at guleroden var en konventionelt dyrket gulerod (altså udsat for pesticider under dyrkningen). Resultatet er vist i Tabel 9.

Der var ingen øget dødelighed for de pesticidbehandlede melorme i forhold til kontrolgruppen. To pesticider blev genfundet i melormene som var fodret med den konventionelle gulerod, mens otte af de tolv pesticider blev fundet i melormene, som var dyrket på de pesticidbehandlede gulerødder, i de i tabellen (Tabel 9) viste koncentrationer. De 24 timers faste viste at indholdet af pesticid i insekterne udskilles ved faste men med forskellig hastighed. Diflufenican var stabil i melormene fodret med den konventionelle gulerod. Forfatteren konkluderer at fasteprocessen nedbringer niveauet af pesticider

**Table 9:** Pesticid rester fundet i ikke-sultede og sultede *T. molitor* larver (ng/g) Houbraken et al. 2016

	Fodret på ubehandlet gulerod i 48 timer		Fodret på pesticid behandlet gulerod i 48 timer	
	Ikke-sultede	Sultede	Ikke-sultede	Sultede
2,4-D	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Bentazone	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Bifenthrin	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
Clopyralid	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ
Diflufenican	0,667	0,774	7,92	3,81
Fenpropimorph	<LOD	<LOD	47,2	9,21
Isoproturon	<LOD	<LOD	1,65	0,552
Linuron	0,208	0,149	23,1	17,4
Mefenoxam	<LOD	<LOD	1,42	<LOD
Pendimethalin	<LOD	<LOQ	6	4,47
Pyrimethanil	<LOQ	<LOQ	72,2	42,9
Tebuconazole	<LOD	<LOD	3,45	0,813

LOD: Limit of detection

LOQ: Limit of quantification

betydeligt i melormene, men at yderligere studier er nødvendige – f.eks. ved man ikke om pesticiderne metaboliseres af melormene og dermed giver et falsk billede af koncentrationen af moderstoffet i de fastede insekter.

### Insekter høstet i voksenstadiet

Der er indikationer på at indholdet af kemiske forureninger generelt er lavere i voksne insekter end i larverne (Purschke et al. 2017, Tschirner et al. 2015) men udover dette er der ikke fundet yderligere information for insekter høstet i voksenstadiet.

### EFFEKT AF BEHANDLING:

Insekterne kan aflives ved frysning, opvarmning eller hakning. For de fleste insekter vil det ikke være praktisk muligt at fjerne tarmen og vil derfor have et højt mikrobielt indhold som udgangspunkt. Sultning af melorm før høst benyttes typisk for at rense melormelarver, men Wynants et al. (2017) viste at sultning af melorm (*T. molitor*) 24 el. 48 timer før høst, med eller uden frasing af faeces undervejs, samt skyning med vand ikke reducerede niveauet af hverken totalkim, Enterobacteriaceae, endosporer eller svampe. Tilsvarende var der for lille melorm (*Alphitobius diaperinus*) ikke nogen reducerende effekt af sultning 24 timer ved 16°C (Wynants et al. 2018).

### Nedfrysning (aflivning):

#### Biologiske farer

Frysetørring anvendes ofte i forbindelse med tørring af insekter. Megido et al. (2017) testede indkøbte frysetørrede (metode ikke specificeret) hhv. melorm (*Tenebrio molitor*) og husfårekylinger (*Acheta*

*domesticus*), hvor totalkim var hhv. ca. 4,5 og 4 log CFU/g mens gær/skimmel var <1 log CFU/g. I friske insekter som blev aflivet ved frysning blev der til sammenligning fundet totalkim på ca. 8 log CFU/g mens gær/skimmel var ca. 4,5 log CFU/g.

#### **Kemiske farer**

Ingen data fundet

#### **Tørring:**

##### **Biologiske farer**

Mens flere studier beskriver det mikrobielle indhold i tørrede insektprodukter er selve tørringsmetoden sjældent beskrevet og dermed f.eks. heller ikke hvilken varmepåvirkning produkterne har været udsat for under tørringen, som er af betydning mikroorganismernes overlevelse. Selvom tørring kan reducere vandaktivitet ( $a_w$ ) til niveauer der hindrer mikrobiel vækst, dvs.  $a_w < 0,6$ , og dermed stabilisere produktet, vil mikroorganismene evt. persistere i det tørrede produkt.

Grabowski og Klein (2017a) testede det mikrobielle indhold i forskellige insektprodukter på markedet ift. proceshygiejnekriterier benyttet i Belgien og Holland; bl.a. totalkim <6,0 og Enterobacteriaceae <3,0 log CFU/g i retail, samt *E. coli* <1,0 og koagulase-positive stafylokokker <3,0 log CFU/g. Flere af de tørrede produkter kunne ikke overholde kriterierne for totalkim og Enterobacteriaceae, hvorimod de dybstegte/tilberedte produkter gjorde. Disse tilberedte produkter så også ud til at have et lavere indhold af bacillus, selvom bakteriesporer ellers typisk er meget varmeresistente. Lave niveauer af bakteriesporer i sig selv er ikke et problem, så længe der ikke opstår gunstige vækstbetingelser, hvor de vil kunne vokse op til de niveauer, som normalt forudsættes for toksindannelse. I produkterne blev der i øvrigt ikke fundet hverken *Salmonella* spp. eller *L. monocytogenes* (fødevarsikkerhedskriterier).

Osimani et al. (2017b) testede mikrobiologisk indhold i færdigkøbte produkter af hhv. græshopper (*Locusta migratoria*), husfårekylinger (*Acheta domesticus*) og melorm (*Tenebrio molitor*) i hele tørrede insekter undtagen to formalede produkter af fårekylinger. Der var ingen oplysning om forudgående opdræt eller forarbejdning udover at produkterne var kogt og tørret. Der blev ikke fundet hverken *Salmonella* spp. eller *L. monocytogenes*, men ellers var niveauet af bakterier generelt højere i de to formalede fårekylingeprodukter sml. med de hele insekter, bl.a. var disse to produkter de eneste med Enterobacteriaceae (3,1 log CFU/g) over detektionsgrænsen på 1 log CFU/g. Ingen produkter var *S. aureus* positive. *Bacillus cereus* blev ved dyrkning kun påvist i fårekylinger/græshopper (<1-5,1 log CFU/g), mens sulfit-reducerende clostridier primært sås i melormene (1,5 - 4,0 log CFU/g) med undtagelse af de formalede fårekylinger (2,8 log CFU/g). Sekvensanalyser viste dog *B. cereus* i både melorm og fårekylinger (formalet).

I et andet lignende studie fra samme gruppe (Garofalo et al. 2017) sås ikke samme tendens med større bakterielt niveau i formalede fårekylinger sml. med hele tørrede produkter. Desuden var det bakterielle niveau i melorm inkl. *C. perfringens* sporer generelt under detektionsgrænsen (2 log CFU/g) med undtagelse af skimmel (2,2-2,3 log CFU). Sekvensanalyser indikerede dog lav forekomst af både stafylokokker, clostridier, bacillus og listeria.

Grabowski og Klein (2017a) viste også nogenlunde ens mikrobielt niveau i hhv. tørrede hele og formalede insektprodukter, undtagen for gær og skimmel, som var størst i de formalede produkter.



For produkter som var kogt, tørret og saltet (ikke præciseret nærmere) viste undersøgelse af mikrobiota i jordkrebs (fårekylningefamilien, *Gryllotalpidae*) fra Thailand, at *Bacillus* og særligt *B. cytotoxicus* (tilhører *B. cereus* senso lato gruppen) dominerede (Osimani et al. 2018b). Metagenom analyserne påviste også *Clostridium* spp., mens real-time PCR analyser viste specifikt fravær af *Coxiella burnetii* (Q-feber), VTEC og *P. aeruginosa*. I modsætning til andre studier blev der i jordkrebsene overraskende ikke fundet DNA sekvenser fra Enterobacteriaceae familien. I alm. melorm (*Tenebrio molitor*) (n=40) fra tre EU lande og Thailand, var der også kun 3 prøver med Enterobacteriaceae og i meget lavt niveau (Osimani et al 2017a). Ellers var LAB under detektionsgrænsen (<1 log CFU/g) i en tredjedel af disse melormprøver, mens sporeformende bakterier varierede fra <1 til 4,2 og totalkim fra <1 til 6,7 log CFU/g.

I Kashiri et al. (2018) testedes effekten af behandling af sort soldaterfluelarver (*Hermetica illucens*) med høj hydrostatisk tryk, hvor 400 MPa i 2,5 min fjernede naturligt forekommende gær og svampe, mens totalkim kun blev reduceret 0,35 log efter 7 min. For larver inokuleret med *E. coli* O:157:H7 sås en 6,6 logs reduktion efter 7 min ved 400 MPa.

#### Kemiske farer

Ingen data fundet

### Varmebehandling:

#### Biologiske farer

Varmebehandling af insekter vil afhængig af temperatur og tid have en reducerende effekt på deres mikrobielle indhold. Varierende afrapporterede resultater indikerer, at det er nødvendigt at teste effekt for de enkelte insektarter og at gængse metoder ofte har begrænset effekt ift. bakteriesporer.

I Wynants et al. (2018) blev den lille melorm (*Alphitobius diaperinus*) blancheret ved nedsænkning i 90°C vand indtil temperaturen igen nåede 88°C, hvilket resulterede i signifikant mikrobiel reduktion. Mens Enterobacteriaceae, LAB og svampe alle var tæt på eller under detektionsgrænsen (log CFU/g 1,0 for bakterier og 2,0 for svampe), lå totalkim og endosporer stadigvæk på hhv. var 4,1 og 4,0 log CFU/g (bakterieindholdet i ubehandlede melorm ses i Tabel 7).

Grabowski og Klein (2017b) testede effekt af forskellige kombinationer af kogning/tørring for sort markfårekylning (*Gryllus bimaculatus*) og kæmpe melorm (*Zophobas atratus*); hhv. 10 min kogning kombineret med tørring ved 60°C (T1) eller 80°C i 24 t (T2), samt kogning 30 min efterfulgt af 80°C i 12 timer og 100°C i 12 timer (T3). Generelt havde 10 min kogning med tørring ved 60°C begrænset reducerende effekt mht. totalkim, Enterobacteriaceae, stafylokokker, bacillus samt gær/skimmel, mens en øgning til 80°C havde en reducerende effekt særligt for Enterobacteriaceae og svampe. Insekterne blev første stafylokok-negative ved T3 behandling og først efter yderlige kogning i 30 min af T3 prøver blev alle prøver testnegative. Kombinationen af flere varmetrin initierer sandsynligvis spiring af endosporerne, som derefter lettere kan fjernes ved varmebehandling end sporerne.

I Vandeweyer et al. (2018) blev den sribede fårekylning (*Gryllodes sigillatus*) aflivet ved 60°C og derefter nedsunket i kogende vand og bragt til kogning (tog 5-10 min) hvilket resulterede i signifikant fald til følgende niveauer (log CFU/g): total kim 2,6±0,5, Enterobacteriaceae <1,5±0,9, LAB <1±0, endosporer 2,4±0,4 og svampe 2±0 (bakterieindholdet i ubehandlede fårekylninger ses i Tabel 7). I

fårekylninger som var røget og tørret ved 80°C, sås i øvrigt en betydelig ændring i mikrobiota sammensætning med dominans af *Bacillus* arter (40,9 %) til trods for at *B. cereus* ved høst af fårekylningerne ikke blev påvist ved dyrkningsmetoden. Eventuelt har ryge/tørre processen aktiveret spiring/sporedannelse af *Bacillus* (endosporer lå på 3,4±0,6 log CFU/g). Desuden var totalkim væsentlig større i tørrede og røget/tørrede fårekylninger end varmebehandlede, hvilket forklares ved krydskontaminering under processeringen.

Vandeweyer et al. (2017b) testede effekt af forskellige blancheringstider i kombination med tørring i industriel mikrobølgeovn mht. mikrobielle niveau i alm. melorm (*Tenebrio molitor*). Der blev generelt fundet en god reduktion af vegetative celler både alene ved blanchering i 10 sek. og ved tørring i 10 min med totalkim på maks. 3,5±0,3 log CFU/g (start niveau ca. 8 log CFU/g). Bakteriesporeniveauet lå generelt lavere og forfatterne angiver at der kun var begrænset effekt af behandlingerne, eksempelvis fra 2,3 til 1,4 log CFU/g efter 40 s blanchering og 20 min tørring. I forhold til tørringen, faldt vandaktiviteten ( $a_w$ ) fra 0,96 i ubehandlede larver til 0,85, 0,67, 0,16 og 0,23 efter hhv. 10, 13, 16 og 20 min tørring (efter 40 sek. blanchering), der temperaturmæssigt resulterede i hhv. 55, 47, 71 og 72°C i de tørrede larver. Studiet viste desuden, at melormelarver der alene var blancheret 10-40 sek. og som havde en høj vandaktivitet ( $a_w$  0,96) kunne opbevares 6 dage på køl (3,7±1,7°C) uden væsentlig mikrobiel vækst (kuldetolerante bakterier steg fra <1,0 til 2,8 log CFU/g i én af 3 batch).

Megido et al. (2017) testede autoklavering af melorm (*Tenebrio molitor*) og fårekylning (*Acheta domesticus*) på dåse i 16 min ved 120°C. Dette reducerede umiddelbart totalkim fra ca. 8 til hhv. 3,3 og 3,7 log CFU/g, hvilket var en reduktion på yderlig ca. 1 log ift. blanchering i hhv. 1 min (melorm) og 4 min (fårekylning).

#### Tilberedning:

Effekt af tilberedning af insekter mht. reduktionen af mikroorganismer blev undersøgt for hhv. lille melorm (*Alphitobius diaperinus*) først lynstegt i 2 min og alm. melorm (*Tenebrio molitor*) først dampet i 5 min inden blanding med krydderier og pandestegning i 2 min (Stoops et al. 2017). Generelt var der en reducerende effekt efter hvert behandlingstrin for totalkim, Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria og svampe. For alm. melorm var det kun totalkim der ikke var under detektionsgrænsen i de færdigtillberedte larver (reduktion 6,2 log CFU/g), mens det varierede lidt mere mellem de to batch for den lille melorm. Effekten mht. reduktion af bakterielle sporer var svær at vurdere, da der i denne undersøgelse generelt var et lavt udgangsniveau, dog sås en reduktion fra 4,3±0,1 til 2,3±0,1 log CFU/g i den ene batch af alm. melorm efter sluttillberedningen. Til gengæld sås en stigning (1 - 1,5 log CFU/g) inden sluttillberedningen i én af de to batch for hver larveart (signifikant for alm. melorm). De tilberedte melormelarver blev efterfølgende pakket under alm. eller modificeret atmosfære og opbevaret på køl i 35 dage. Sporeniveauet forblev generelt lavt, mens totalkim på dag 21 var steget til >7 log CFU/g i pakker med alm. atmosfære. I pakker med modificeret atmosfære steg totalkim i larverne af lille melorm fra dag 14 til 21 mens den først steg mellem dag 28 og 35 i alm. melorm.

Et andet mindre studie testede effekten på totalkim i melorm (*Tenebrio molitor*) efter forskellige tilberedninger hhv.: nedsænket i 100°C vand i 1 min, pandestegt i olie 1 min, vakuumpakket i vandbad 74°C i 60 min, ovnbagt 70°C i 30 min eller ovnbagt 70°C i 15 min (triplikater) (Megido et al. 2018). Disse tilberedninger reducerede kimtallet fra 8,5 log CFU/g til hhv. 1,6±0,8, 3,3±0,1, 3,9±0,7, 6,1±0,1 og 6,7±0,1, hvor 15 min ovnbagning ikke var signifikant forskellig fra de rå melorm, og hvor 1 min kogning var signifikant forskellig fra 1 minuts pandestegning.

### Kemiske farer

Ingen data fundet, men man må formode at der f.eks. kan dannes akrylamider under opvarmningen i forbindelse med tilberedning af insekterne via friturestegning, grilning, bagning eller andet, da insekterne indeholder bestanddelene for potentiel dannelse af akrylamid.

### RESTPRODUKTET FRA INSEKTPRODUKTION:

Restproduktet efter insektkonvertering (frass) vil bl.a. afhænge af insektart og naturligvis det substrat insekterne er dyrket på, men består typisk af en blanding af gennemtygget substrat, ekskrementer og skeletrester af varierende fugtighed.

Frass fra alm. melorm (*Tenebrio molitor*) havde generelt samme niveauer af bakterier, som der blev fundet i larverne (Tabel 7) (Osimani et al. 2018a). Sekvensanalyser afslørede dominans af *Enterococcus*, *Lactococcus* og *Enterobacteriaceae* i både larver og frass. Af *Enterobacteriaceae* blev der i larver fundet tættest slægtskab til *Enterobacter*, mens der i frass også var *Xenorhabdus* spp. og *Pantoea* spp. Real-time PCR viste specifikt fravær af *Coxiella burnetii* (Q-feber), VTEC og *P. aeruginosa*, undtagen én frass prøve positiv for *P. aeruginosa*.

Substrat fra den sribede fårekylning (*Grylloides sigillatus*) prøvetaget 3 dage før høst (dvs. tæt på at være endeligt frass), indeholdt følgende bakterielle niveauer (log CFU/g): totalkim  $6,7 \pm 0,3$ , *Enterobacteriaceae*  $3,6 \pm 0,2$ , lactic acid bacteria (LAB)  $3,6 \pm 0,5$ , endosporer  $4,8 \pm 0,5$  og svampe  $4,0 \pm 0,3$  med fald ift. dag 12 for *Enterobacteriaceae* og LAB, hhv. 0,8 og 1,4 log CFU/g (Vandeweyer et al. 2018). Det blev spekuleret om dette fald hang sammen med 'fortynding' med nyt foder undervejs. Det bakterielle indhold i fårekylningerne er vist i Tabel 7

I et eksperimentelt studie hvor fluelarver (*Musca domestica*) udviklede sig i hønsegødning tilsat hhv. *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* og *C. jejuni*, sås et hurtigere henfald af testbakterierne i gødningen når der var larver til stede, sammenholdt med ingen larver til stede, hvilket indikerer en biosanerende effekt af stuefluelarver (Nordentoft et al. 2017).

Sort soldaterflue (*Hermetica illucens*) blev dyrket på en blanding af svinsegødning, hundefoder og human afføring (4:4:2) over en kontinuer periode på 9 uger med henblik på at undersøge den hygiejniserende effekt på det omsatte substrat (Lalander et al. 2015). *Salmonella enterica* Typhimurium og *Enterococcus faecalis* blev tilsat tre gange ugentligt (ca. 7 log CFU/g), hvor *Salmonella* hurtigt forsvandt under detektionsgrænsen, mens der ikke sås et fald af *E. faecalis*. Dette hænger muligvis sammen med forskellen mellem Gram-negative (*salmonella*) og Gram-positive bakterier. Stammer af hhv. Adenovirus, Reovirus og Enterovirus blev tilsat i en konc. på 5-6 log TCID50 og var på dag 2 reduceret med 2,5-4 log enheder og røg under detektionsgrænsen (<2,3 log TCID5) på hhv. dag 14, 11 og 4. Tilsatte *Ascaris suum* æg overlevede fint, men udviklingen til larver så ud til at være blevet bremset ift. almindelig hastighed, evt. pga. øget ammoniumkoncentration i substratet.

Med hensyn til kemiske farer ved frass må det formodes at de kemiske stoffer for en stor dels vedkommende kan genfindes i frassen. Det er vist at tungmetaller til en vis grad akkumulerer (graden afhængig af metallet – cadmium har en høj grad af akkumulering) i insekterne, mens f.eks. mykotoksiner og pesticider udskilles til substratet igen. For nogle af stofferne er det vist, at de

metaboliseres af insekterne (mykotoksinerne), men i hvor høj grad og til hvad er uvist (se kemiske farer, insekter høstet i larvestadiet).

## REFERENCER:

- Abdallah, M.F., Girgin, G., Baydar, T., Krska, R., Sulyok, M. 2017. Occurrence of multiple mycotoxins and other fungal metabolites in animal feed and maize samples from Egypt using LC-MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 4419–4428. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8293>
- Anon. 2017. Annual Report on Zoonoses in Denmark 2016
- Anon. 2015. Anvendelse af organisk affald i biogasanlæg Vurdering af stoffer. Det Økologiske Råd
- Anon. 2012. Annual Report on Zoonoses in Denmark 2011
- Anon. 2009. Annual Report on Zoonoses in Denmark 2008
- Al-Rashdan, A., Murad I. H. Helaleh, A. Nisar, A. Ibtisam, and Z.A.-B. 2010. Determination of the Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Toasted Bread Using Gas Chromatography Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry* 2010. <https://doi.org/doi:10.1155/2010/821216>
- Bahrdorff, S., Gill, C., Lowenberger, C., Skovgard, H., Hald, B. 2014. The effects of temperature and innate immunity on transmission of *Campylobacter jejuni* (Campylobacterales: Campylobacteraceae) between life stages of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 51, 670–677. <https://doi.org/10.1603/ME13220>
- Biancarosa, I., Liland, N.S., Biemans, D., Araujo, P., Bruckner, C.G., Waagbø, R., Torstensen, B.E., Lock, E.-J., Amlund, H. 2018. Uptake of heavy metals and arsenic in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae grown on seaweed-enriched media. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 2176–2183. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8702>
- Biswas, S., Pandey, P.K., Farver, T.B. 2016. Assessing the impacts of temperature and storage on *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *L. monocytogenes* decay in dairy manure. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39, 901–913. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1569-x>
- Boccazzi, I.V., Ottoboni, M., Martin, E., Comandatore, F., Vallone, L., Spranghers, T., Eeckhout, M., Mereghetti, V., Pinotti, L., Epis, S. 2017. A survey of the microbiota associated with larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) reared for feed production. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182533>
- Bol, E.K., Araujo, L., Veras, F.F., Welke, J.E. 2016. Estimated exposure to zearalenone, ochratoxin A and aflatoxin B1 through the consume of bakery products and pasta considering effects of food processing. *Food and Chemical Toxicology* 89, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.01.013>
- Bosch, G., van der Fels-Klerx, H.J., de Rijk, T.C., Oonincx, D.G.A.B. 2017. Aflatoxin B1 Tolerance and Accumulation in Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and Yellow Mealworms (*Tenebrio molitor*). *Toxins* 2017, 9, 185; <http://dx.doi:10.3390/toxins9060185>
- Brookes, V.J., Hernández-Jover, M., Holyoake, P., Ward, M.P. 2014. Import risk assessment incorporating a dose–response model: Introduction of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome into Australia via illegally imported raw pork. *Preventive Veterinary Medicine* 113, 565–579. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.016>
- Camenzuli, L., Van Dam, R., de Rijk, T., Andriessen, R., Van Schelt, J., Van der Fels-Klerx, H.J. 2018. Tolerance and Excretion of the Mycotoxins Aflatoxin B1, Zearalenone, Deoxynivalenol, and Ochratoxin A by *Alphitobius diaperinus* and *Hermetia illucens* from Contaminated Substrates. *Toxins* 2018, 10, 91; <http://dx.doi:10.3390/toxins10020091>
- Cang, L., Wang, Y.-J., Zhou, D.-M., Dong, Y.-H. 2004. Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province, China. *Journal of Environmental Sciences* 16, 371–374
- Ceuppens, S., Van Boxstael, S., Westyn, A., Devlieghere, F., Uyttendaele, M. 2016. The heterogeneity in the type of shelf life label and storage instructions on refrigerated foods in supermarkets in Belgium and illustration of its impact on assessing the *Listeria monocytogenes* threshold level of 100 CFU/g. *Food Control* 59, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.009>

- Channaiah, L.H., Michael, M., Acuff, J.C., Phebus, R.K., Thippareddi, H., Olewnik, M., Milliken, G. 2017. Validation of the baking process as a kill-step for controlling Salmonella in muffins. *International Journal of Food Microbiology* 250, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.007>
- Ciecierska, M., Obiedziński, M.W. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bakery chain. *Food Chemistry* 141, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.006>
- Costa, A., Gusmara, C., Gardoni, D., Zaninelli, M., Tambone, F., Sala, V., Guarino, M. 2017. The effect of anaerobic digestion and storage on indicator microorganisms in swine and dairy manure. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 24135–24146. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0011-5>
- Crippen, T.L., Sheffield, C.L., Beier, R.C., Nisbet, D.J. 2018. The horizontal transfer of Salmonella between the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and poultry manure. *Zoonoses and Public Health* 65, e23–e33. <https://doi.org/10.1111/zph.12404>
- Crossan, C., Grierson, S., Thomson, J., Ward, A., Nunez-Garcia, J., Banks, M., Scobie, L. 2014. Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiology and Infection* 31. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003100>
- DANMAP 2016. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark
- DANMAP 2015. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark
- DANMAP 2010. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark
- DANMAP 2012. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark
- De Bellis, P., Minervini, F., Di Biase, M., Valerio, F., Lavermicocca, P., Sisto, A. 2015. Toxigenic potential and heat survival of spore-forming bacteria isolated from bread and ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 197, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.017>
- De Boeck, E., Jacxsens, L., Goubert, H., Uyttendaele, M. 2017. Ensuring food safety in food donations: Case study of the Belgian donation/acceptation chain. *Food Research International* 100, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.046>
- De Smet, J., Wynants, E., Cos, P., Van Campenhout, L. 2018. Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. *Applied and Environmental Microbiology* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.02722-17>
- Dee, S.A., Bauermann, F.V., Niederwerder, M.C., Singrey, A., Clement, T., De Lima, M., Long, C., Patterson, G., Sheahan, M.A., Stoian, A.M.M., Petrovan, V., Jones, C.K., De Jong, J., Ji, J., Spronk, G.D., Minion, L., Christopher-Hennings, J., Zimmerman, J.J., Rowland, R.R.R., Nelson, E., Sundberg, P., Diel, D.G. 2018. Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models. *PLoS ONE* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194509>
- Demirbas, A., Edris, G., Alalayah, W.M. 2017. Sludge production from municipal wastewater treatment in sewage treatment plant, *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 39, 999-1006, <http://dx.DOI:10.1080/15567036.2017.1283551>
- Diener, S., Zurbrügg, C., Tockner, K. 2015. Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *Journal of Insects as Food and Feed* 1, 261-270. ISSN 2352-4588 online, <http://dx.DOI 10.3920/JIFF2015.0030>
- DTU 2012. Mikrobiologiske risici ved frugt og grønt. Vurdering fra DTU Fødevareinstituttet.
- EFSA, 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 2017 15, 4791. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4791>
- EFSA 2015. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal* 13, 4257. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4257>
- Erickson, M.C., Smith, C., Jiang, X., Flitcroft, I.D., Doyle, M.P. 2015. Manure source and age affect survival of zoonotic pathogens during aerobic composting at sublethal temperatures. *Journal of Food Protection* 78, 302–310. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-288>
- Eroksuz, Y., Kaya, E., Issi, M., Baydar, E., Cevik, A., Eroksuz, H., Asci, Z., Timurkan, O. 2015. Subacute aflatoxicosis due to moldy bread consumption in a dog. *Revue de Medecine Veterinaire* 166, 259–265.
- Eurofins 2017. Analyserapport på afvandet slam fra Grindsted renseanlæg. Rapport nr. AR-17-CA-00557017-01. Eurofins Miljø A/S, Vejle, Danmark

- Fongaro, G., Viancelli, A., Magri, M.E., Elmahdy, E.M., Biesus, L.L., Kich, J.D., Kunz, A., Barardi, C.R.M. 2014. Utility of specific biomarkers to assess safety of swine manure for biofertilizing purposes. *Science of The Total Environment* 479–480, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.004>
- Forth, J.H., Amendt, J., Blome, S., Depner, K., Kampen, H. 2018. Evaluation of blowfly larvae (Diptera: *Calliphoridae*) as possible reservoirs and mechanical vectors of African swine fever virus. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, e210–e213. <https://doi.org/10.1111/tbed.12688>
- FVST 2018. Kontrol med pesticidrester i foder I 2017. Fødevarestyrelsen. Prøveprojekt – Slutrapport. J.nr.: 2014-28-61-00126/2014-28-61-00127
- FVST 2017. Pesticidrester i fødevarer 2016. Resultater fra den danske pesticidkontrol. Rapport udarbejdet af DTU Fødevareinstituttet og Fødevarestyrelsen i 2017
- FVST 2016. MRSA i Svinekød 2016 Fødevarestyrelsen. Projekter – Slutrapport. J. nr.: 2015-28-61-00450
- FVST 2015. Afsmitning fra plastemballage til tørre fødevarer. Kampagner og Projekter – Slutrapport. J.nr.: 2013-29-64-00544
- FVST 2013a. Delprojekt 4: Mælk og mælkeprodukter 2012-2013. Kampagner og projekter – Slutrapport. J. nr.: 2011-20-64-00330 (under hovedprojekt 2011-20-64-00326, Offentlig kontrol af mikrobiologiske kriterier for produkter i en gros leddet)
- FVST 2013b. Delprojekt 1: Hakket kød 2012-2013. Kampagner og projekter – Slutrapport. J. nr.: 2011-20-64-00327 (under hovedprojekt 2011-20-64-00326, Offentlig kontrol af mikrobiologiske kriterier for produkter i en gros leddet)
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Cardinali, F., Aquilanti, L., Riolo, P., Ruschioni, S., Isidoro, N., Clementi, F. 2017. The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiology* 62, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.012>
- Glaeser, S.P., Sowinsky, O., Brunner, J.S., Dott, W., Kämpfer, P. 2016. Cultivation of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant staphylococci from input and output samples of German biogas plants. *FEMS Microbiology Ecology* 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw010>
- Golinski, P., Hult, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Chelkowski, J., Kneblewski, P., Szebiotko, K., 1984. Mycotoxic Porcine Nephropathy and Spontaneous Occurrence of Ochratoxin A Residues in Kidneys and Blood of Polish Swine. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 1210-1212
- Grabowski, N.T., Klein, G. 2017a. Microbiology of processed edible insect products – Results of a preliminary survey. *International Journal of Food Microbiology* 243, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.005>
- Grabowski, N.T., Klein, G. 2017b. Microbiology of cooked and dried edible Mediterranean field crickets (*Gryllus bimaculatus*) and superworms (*Zophobas atratus*) submitted to four different heating treatments. *Food Science and Technology International* 23, 17–23. <https://doi.org/10.1177/1082013216652994>
- Guerre, P. 2016. Worldwide Mycotoxins Exposure in Pig and Poultry Feed Formulations. *Toxins* 2016, 8, 350; doi:10.3390/toxins8120350
- Gyori, Z., Kovács, B., Daniels, P., Szabo, P., Phillips, C. 2005. Cadmium and lead in Hungarian porcine products and tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1049–1054. DOI: 10.1002/jsfa.2069
- Habler, K., Geissinger, C., Hofer, K., Schüller, J., Moghari, S., Hess, M., Gastl, M., Rychlik, M. 2017. Fate of fusarium toxins during brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 190–198. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04182>
- Hauck, R., Crossley, B., Rejmanek, D., Zhou, H., Gallardo, R.A. 2017. Persistence of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza viruses in footbaths and poultry Manure. *Avian Diseases* 61, 64–69. <https://doi.org/10.1637/11495-091916-Reg>
- Houbraken, M., Spranghers, T., De Clercq, P., Cooreman-Algoed, M., Couchement, T., De Clercq, G., Verbeke, S., Spanoghe, P. 2016. Pesticide contamination of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) for human consumption. *Food Chemistry* 201, 264-269.
- Hult, K., Hökby, E., Gatenbeck, S., Rutqvist, L., 1980. Ochratoxin A in Blood from Slaughter Pigs in Sweden: Use in Evaluation of Toxin Content of Consumed Feed. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 828-830
- IFRO 2016. Organisk affald - Fra husholdninger og servicesektoren samt effekter af nuværende anvendelse Institut for Fødevare- og Ressourceøkonomi (IFRO), Københavns Universitet
- Inoue, T., Nagatomi, Y., Suga, K., Uyama, A., Mochizuki, N. 2011. Fate of pesticides during beer brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3857–3868. <https://doi.org/10.1021/jf104421q>

- Inoue, T., Nagatomi, Y., Uyama, A., Mochizuki, N. 2013. Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 77, 1410–1415. <https://doi.org/10.1271/bbb.130027>
- Jansen, W., Grabowski, N., Gerulat, B., Klein, G. 2016. Food Safety Hazards and Microbiological Zoonoses in European Meat Imports Detected in Border Inspection in the Period 2008-2013. *Zoonoses and Public Health* 63, 53–61. <https://doi.org/10.1111/zph.12204>
- Jurado, C., Martínez-Avilés, M., Torre, A.L., Štukelj, M., Ferreira, H.C.C., Cerioli, M., Sánchez-Vizcaino, J.M., Bellini, S. 2018. Relevant measures to prevent the spread of African Swine Fever in the European Union Domestic Pig Sector. *Frontiers in Veterinary Science* 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00077>
- Kacmaz, S., Zelinkova, Z., Wenzl, T. 2016. Rapid and sensitive method for the determination of four EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in cereal-based foods using isotope-dilution GC/MS. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 33, 631–638. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1162032>
- Kalmar, I.D., Cay, A.B., Tignon, M. 2018. Sensitivity of African swine fever virus (ASFV) to heat, alkalinity and peroxide treatment in presence or absence of porcine plasma. *Veterinary Microbiology* 219, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.025>
- Kashiri, M., Marin, C., Garzón, R., Rosell, C.M., Rodrigo, D., Martínez, A. 2018. Use of high hydrostatic pressure to inactivate natural contaminating microorganisms and inoculated *E. coli* O157:H7 on *Hermetia illucens* larvae. *PLoS ONE* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194477>
- Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., Krska, R. 2016. Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. *Toxins* 8. <https://doi.org/10.3390/toxins8120363>
- Krog, J.S., Forslund, A., Larsen, L.E., Dalsgaard, A., Kjaer, J., Olsen, P., Schultz, A.C. 2017. Leaching of viruses and other microorganisms naturally occurring in pig slurry to tile drains on a well-structured loamy field in Denmark. *Hydrogeology Journal* 25, 1045–1062. <https://doi.org/10.1007/s10040-016-1530-8>
- Kvæg 2005. Tema, græsmarksparasitter, Kvæg (Juni), 16-21. Landbrug og Fødevarer.
- Lalander, C.H., Fidjeland, J., Diener, S., Eriksson, S., Vinnerås, B. 2014. High waste-to-biomass conversion and efficient *Salmonella* spp. reduction using black soldier fly for waste recycling. *Agronomy for Sustainable Development* 35, 261–271. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0235-4>
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Blanch, A.R., Carducci, A., Gianico, A., Lucena, F., Tomei, M.C., Mininni, G. 2015. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 7237–7247. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3572-6>
- Lindén, A., Olsson, I., Bensryd, I., Lundh, T., Skerfving, S., Oskarsson, A. 2003. Monitoring of cadmium in the chain from soil via crops and feed to pig blood and kidney. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 213–222. doi:10.1016/S0147-6513(02)00079-9
- Megido, C. R., Desmedt, S., Blecker, C., Béra, F., Haubruge, É., Alabi, T., Francis, F. 2017. Microbiological Load of Edible Insects Found in Belgium. *Insects* 8, 12. <https://doi.org/10.3390/insects8010012>
- Megido, C. R., Poelaert, C., Ernens, M., Liotta, M., Blecker, C., Danthine, S., Tyteca, E., Haubruge, É., Alabi, T., Bindelle, J., Francis, F. 2018. Effect of household cooking techniques on the microbiological load and the nutritional quality of mealworms (*Tenebrio molitor* L. 1758). *Food Research International* 106, 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.002>
- Milanović, V., Osimani, A., Pasquini, M., Aquilanti, L., Garofalo, C., Taccari, M., Cardinali, F., Riolo, P., Clementi, F. 2016. Getting insight into the prevalence of antibiotic resistance genes in specimens of marketed edible insects. *International Journal of Food Microbiology* 227, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.018>
- Mortensen, A., Granby, K., Eriksen, F.D., Cederberg, T.L., Friis-Wandall, S., Simonsen, Y., Broesbøl-Jensen, B., Bonnichsen, R. 2014. Levels and risk assessment of chemical contaminants in byproducts for animal feed in Denmark. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 49, 797–810. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.938546>
- MFVM 2017. Animal health in Denmark 2016. Miljø og Fødevareministeriet
- MST 2014. Kortlægning af madaffald i servicesektoren. Detailhandel, restauranter og storkøkkener. Undgå affald, stop spild nr. 05. Miljøstyrelsen
- MST 2012a. Undersøgelse af PCB, dioxin og tungmetaller i eksporteret slam til Tyskland. Miljøprojekt nr. 1433, 2012

- MST 2012b. Risk evaluation of five groups of persistent organic contaminants in sewage sludge. Environmental Project No. 1406, 2012
- MST 2009. Spildevandsslam fra kommunale og private renselanlæg i 2005. Orientering fra Miljøstyrelsen nr. 3. Miljøstyrelsen
- MST 2005. Risikovurdering af anvendelse af lokalt opsamlet fæces i private havebrug. Økologisk byfornyelse og spildevandsrensning. Rapport Nr. 54. Miljøstyrelsen
- MST 2004. Udvikling af metoder til udnyttelse af animalsk affald i biogas og udvinding af fosfor fra kød- og benmelsforbrænding. Miljøprojekt Nr. 925. Miljøstyrelsen
- MST 2003a. Occurrence and survival of viruses in composted human faeces. Sustainable Urban Renewal and Wastewater Treatment. No. 32. Miljøstyrelsen
- MST 2003b. Smitsoffer i spildevand. Miljøprojekt Nr. 800. Miljøstyrelsen
- MST 2001. Risikovurdering ved anvendelse af vandingskanoner til udspreddning af gylle fortyndet med vand. Miljøprojekt Nr. 606. Miljøstyrelsen
- Negoita, M., Iorga, E., Adascslului, A., Catana, M. Belc, N., Stan, A. 2014. Influence of some factors on the acrylamide content in bread. Romanian Biotechnological Letters 19, 9932-9939.
- Noguera-Oviedo, K., Aga, D.S. 2016. Chemical and biological assessment of endocrine disrupting chemicals in a full scale dairy manure anaerobic digester with thermal pretreatment. Science of the Total Environment 550, 827–834. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.084>
- Nordentoft, S., Fischer, C., Bjerrum, L., Heckmann, L.H., Hald, B. 2017. Reduction of *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in poultry manure by rearing of *Musca domestica* fly larvae. Journal of Insects as Food and Feed 3, 145–153. <https://doi.org/10.3920/JIFF2016.0058>
- Olesen, A.S., Hansen, M.F., Rasmussen, T.B., Belsham, G.J., Bødker, R., Bøtner, A. 2018a. Survival and localization of African swine fever virus in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) after feeding on viremic blood using a membrane feeder. Veterinary Microbiology 222, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.010>
- Olesen, A.S., Lohse, L., Hansen, M.F., Boklund, A., Halasa, T., Belsham, G.J., Rasmussen, T.B., Bøtner, A., Bødker, R. 2018b. Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*). Transboundary and Emerging Diseases. <https://doi.org/10.1111/tbed.12918>
- Orzi, V., Scaglia, B., Lonati, S., Riva, C., Boccasile, G., Alborali, G.L., Adani, F. 2015. The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion. Science of the Total Environment 526, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.038>
- Osimani, A., Cardinali, F., Aquilanti, L., Garofalo, C., Roncolini, A., Milanović, V., Pasquini, M., Tavoletti, S., Clementi, F. 2017a. Occurrence of transferable antibiotic resistances in commercialized ready-to-eat mealworms (*Tenebrio molitor* L.). International Journal of Food Microbiology 263, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.009>
- Osimani, A., Garofalo, C., Milanović, V., Taccari, M., Cardinali, F., Aquilanti, L., Pasquini, M., Mozzon, M., Raffaelli, N., Ruschioni, S., Riolo, P., Isidoro, N., Clementi, F. 2017b. Insight into the proximate composition and microbial diversity of edible insects marketed in the European Union. European Food Research and Technology 243, 1157–1171. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2828-4>
- Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., Garofalo, C., Clementi, F., Pasquini, M., Riolo, P., Ruschioni, S., Isidoro, N., Loreto, N., Franciosi, E., Tuohy, K., Petruzzelli, A., Fogliani, M., Gabucci, C., Tonucci, F., Aquilanti, L. 2018a. The bacterial biota of laboratory-reared edible mealworms (*Tenebrio molitor* L.): From feed to frass. International Journal of Food Microbiology 272, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.001>
- Osimani, A., Milanović, V., Garofalo, C., Cardinali, F., Roncolini, A., Sabbatini, R., De Filippis, F., Ercolini, D., Gabucci, C., Petruzzelli, A., Tonucci, F., Clementi, F., Aquilanti, L. 2018b. Revealing the microbiota of marketed edible insects through PCR-DGGE, metagenomic sequencing and real-time PCR. International Journal of Food Microbiology 276, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.013>
- Pandey, P.K., Cao, W., Wang, Y., Vaddella, V., Castillo, A.R., Souza, A., Rio, N.S.D. 2016. Simulating the effects of mesophilic anaerobic and aerobic digestions, lagoon system, and composting on pathogen inactivation. Ecological Engineering 97, 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.10.047>
- Passaghe, P., Bertoli, S., Tubaro, F., Buiatti, S. 2015. Monitoring of some selected heavy metals throughout the brewing process of craft beers by inductively coupled plasma mass spectrometry. European Food Research and Technology 241, 199–215. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2445-7>
- Pava-Ripoll, M., Pearson, R.E.G., Miller, A.K., Tall, B.D., Keys, C.E., Ziobro, G.C. 2015. Ingested *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*: Transmission



- dynamics from adult house flies to their eggs and first filial generation adults Applied microbiology. BMC Microbiology 15. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0478-5>
- Poma, G., Cuykx, M., Amato, E., Calaprice, C., Focant, J.F., Covaci, A. 2017. Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. Food and Chemical Toxicology 100 (2017) 70e79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.12.006>
- Pouzou, J.G., Costard, S., Zagmutt, F.J. 2018. Probabilistic estimates of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations in meats and breads applicable to exposure assessments. Food and Chemical Toxicology 114, 346–360. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.002>
- Pujols, J., Rodríguez, C., Navarro, N., Pina-Pedrero, S., Campbell, J.M., Crenshaw, J., Polo, J. 2014. No transmission of hepatitis E virus in pigs fed diets containing commercial spray-dried porcine plasma: a retrospective study of samples from several swine trials. Virology Journal 11. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0232-x>
- Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., Jäger, H. 2017. Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on the growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain, Food Additives & Contaminants: Part A, 34:8, 1410-1420, <http://dx.DOI: 10.1080/19440049.2017.1299946>
- Rey-Salgueiro, L., García-Falcón, M.S., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J. 2008. Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. Food Chemistry 108, 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.026>
- Rodrigues, I., Naehrer, K. 2012. A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. Toxins 4, 663–675. <https://doi.org/10.3390/toxins4090663>
- Romer Labs, 2016. Mycotoxin Regulations for Food and Feed in the EU 2016.
- Sahlström, L., Bagge, E., Emmoth, E., Holmqvist, A., Danielsson-Tham, M.-L., Albiñ, A. 2008. A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants. Bioresource Technology 99, 7859–7865. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.071>
- SCF 2002. Scientific Committee on Food (SCF), Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final. 4 December 2002
- Schauss, T., Glaeser, S.P., Gütschow, A., Dott, W., Kämpfer, P. 2015. Improved detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in input and output samples of German biogas plants by a selective pre-enrichment procedure. PLoS ONE 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119791>
- Schlüter, O., Rumpold, B., Holzhauser, T., Roth, A., Vogel, R.F., Quasigroch, W., Vogel, S., Heinz, V., Jäger, H., Bandick, N., Kulling, S., Knorr, D., Steinberg, P., Engel, K.-H. 2017. Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. Molecular Nutrition and Food Research 61. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600520>
- SEGES 2016. Indvoldsorm hos svin. Landbrug og Fødevarer
- Shrestha, S., Birbari, W., Sheehan, T., Glass, K.A. 2016. Thermal inactivation of salmonella on sesame-topped bread during baking using high and low oven humidity. Food Protection Trends 36, 116–124
- Sindryakova, I.P., Morgunov, Y.P., Chichikin, A.Y., Gazaev, I.K., Kudryashov, D.A., Tsybanov, S.Z. 2016. The influence of temperature on the Russian isolate of African swine fever virus in pork products and feed with extrapolation to natural conditions. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya 51, 467–474. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.4.467eng>
- Stanford, K., Reuter, T., Gilroyed, B.H., Mcallister, T.A. 2015. Impacts of sporulation temperature, exposure to compost matrix and temperature on survival of *Bacillus cereus* spores during livestock mortality composting. Journal of Applied Microbiology 118, 989–997. <https://doi.org/10.1111/jam.12749>
- Stoops, J., Crauwels, S., Waud, M., Claes, J., Lievens, B., Van Campenhout, L. 2016. Microbial community assessment of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and grasshoppers (*Locusta migratoria migratorioides*) sold for human consumption. Food Microbiology 53, 122–127. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.010>
- Stoops, J., Vandeweyer, D., Crauwels, S., Verreth, C., Boeckx, H., Van Der Borght, M., Claes, J., Lievens, B., Van Campenhout, L. 2017. Minced meat-like products from mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and *Alphitobius diaperinus*: microbial dynamics during production and storage. Innovative Food Science & Emerging Technologies 41, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.02.001>
- Tozzoli, R., Di Bartolo, I., Gigliucci, F., Brambilla, G., Monini, M., Vignolo, E., Caprioli, A., Morabito, S. 2017. Pathogenic *Escherichia coli* and enteric viruses in biosolids and related top soil improvers in Italy. Journal of Applied Microbiology 122, 239–247. <https://doi.org/10.1111/jam.13308>

- Tretola, M., Di Rosa, A.R., Tirloni, E., Ottoboni, M., Giromini, C., Leone, F., Bernardi, C.E.M., Dell'Orto, V., Chiofalo, V., Pinotti, L. 2017. Former food products safety: microbiological quality and computer vision evaluation of packaging remnants contamination. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 34, 1427–1435. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1325012>
- Tschirner, M., Simon, A. 2015. Influence of different growing substrates and processing on the nutrient composition of black soldier fly larvae destined for animal feed. *Journal of Insects as Food and Feed* 1, 249–259
- Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M., Hajslova, J. 2013. “Emerging” mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food Chemistry* 136, 750–757. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.031>
- Van Broekhoven, S., Mota Gutierrez, J., De Rijk, T.C., De Nijs, W.C.M., Van Loon, J.J.A. 2017. Degradation and excretion of the Fusarium toxin deoxynivalenol by an edible insect, the Yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.). *World Mycotoxin Journal* 10, 163–169
- Van der Fels-Klerx, H.J., Camenzuli, L., Van der Lee, M.K., Oonincx, D.G.A.B. 2016. Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from contaminated substrates. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166186>
- Vandeweyer, D., Crauwels, S., Lievens, B., Van Campenhout, L. 2017a. Microbial counts of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) and crickets (*Acheta domesticus* and *Grylodes sigillatus*) from different rearing companies and different production batches. *International Journal of Food Microbiology* 242, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.007>
- Vandeweyer, D., Lenaerts, S., Callens, A., Van Campenhout, L. 2017b. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control* 71, 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.07.011>
- Vandeweyer, D., Wynants, E., Crauwels, S., Verreth, C., Viaene, N., Claes, J., Lievens, B., Van Campenhout, L. 2018. Microbial dynamics during industrial rearing, processing, and storage of tropical house crickets (*Grylodes sigillatus*) for human consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00255-18>
- Walia, K., Kapoor, A., Farber, J.M. 2018. Qualitative risk assessment of cricket powder to be used to treat undernutrition in infants and children in Cambodia. *Food Control* 92, 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.047>
- Wang, H., Sikora, P., Rutgersson, C., Lindh, M., Brodin, T., Björleinius, B., Larsson, D.G.J., Norder, H. 2018. Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 221, 479–488. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.01.012>
- Wang, W., Zhang, W., Wang, X., Lei, C., Tang, R., Zhang, F., Yang, Q., Zhu, F. 2017. Tracing heavy metals in “swine manure - Maggot - chicken” production chain. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07317-2>
- Werle, S., Dudziak, M. 2014. Analysis of organic and inorganic contaminants in dried sewage sludge and by-products of dried sewage sludge gasification. *Energies* 7, 462–476. <https://doi.org/10.3390/en7010462>
- Wierup, M., Kristoffersen, T. 2014. Prevention of Salmonella contamination of finished soybean meal used for animal feed by a Norwegian production plant despite frequent Salmonella contamination of raw soy beans, 1994–2012. *Acta veterinaria Scandinavica* 56, 41. <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0041-7>
- Wu, S., Ricke, S.C., Schneider, K.R., Ahn, S. 2017. Food safety hazards associated with ready-to-bake cookie dough and its ingredients. *Food Control* 73, 986–993. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.010>
- Wynants, E., Crauwels, S., Lievens, B., Luca, S., Claes, J., Borremans, A., Bruyninckx, L., Van Campenhout, L. 2017. Effect of post-harvest starvation and rinsing on the microbial numbers and the bacterial community composition of mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 42, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.004>
- Wynants, E., Crauwels, S., Verreth, C., Gianotten, N., Lievens, B., Claes, J., Van Campenhout, L. 2018. Microbial dynamics during production of lesser mealworms (*Alphitobius diaperinus*) for human consumption at industrial scale. *Food Microbiology* 70, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.012>
- Xu, P., Zhou, X., Xu, D., Xiang, Y., Ling, W., Chen, M. 2018. Contamination and risk assessment of estrogens in livestock manure: A case study in Jiangsu Province, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010125>

- Xu, S., Harvey, A., Barbieri, R., Reuter, T., Stanford, K., Amoako, K.K., Selinger, L.B., McAllister, T.A. 2016. Inactivation of bacillus anthracis spores during laboratory-scale composting of feedlot cattle manure. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00806>
- Yin, F., Li, Z., Wang, D., Ohlsen, T., Dong, H. 2016. Performance of thermal pretreatment and mesophilic fermentation system on pathogen inactivation and biogas production of faecal sludge: Initial laboratory results. *Biosystems Engineering* 151, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.08.019>