

FLEMMING BOISEN

KORTLÆGNING AF FÆKALE STREPTOCOCCERS

VÆKSTFORHOLD I

BIOGASANLÆG

DEL-RAPPORT TIL

SMITSTOFREDUKTION I BIOMASSE

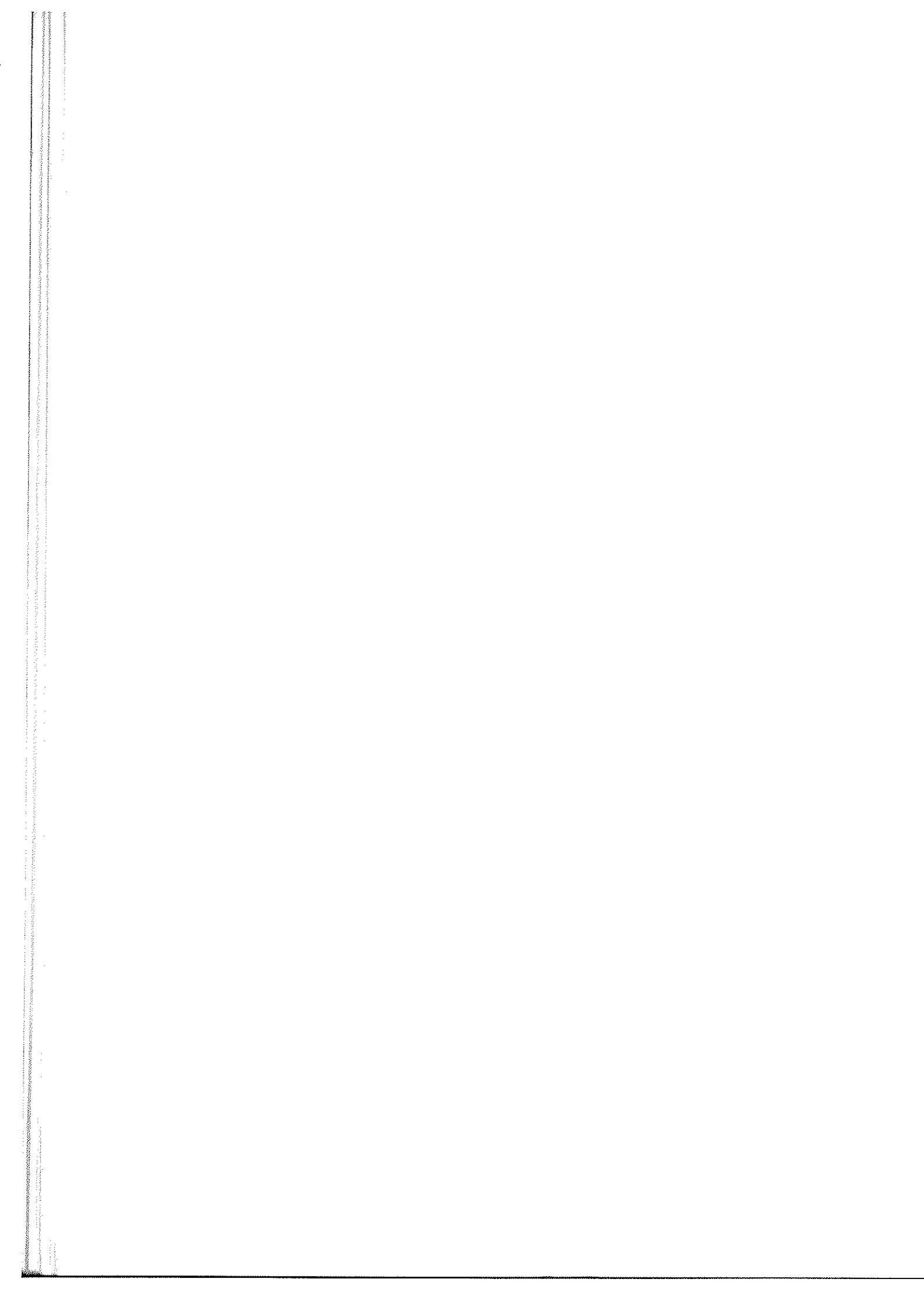
RAPPORT VEDRØRENDE

DET VETERINÆRE FORSØGSPROGRAM

I

BIOGASFÆLLESANLÆG

BIND II: DEL-RAPPORTER OG BILAG 1995



BIOGAS FÆLLESANLÆG REVNINGE

PROJEKT:

KORTLÆGNING AF

FÆKALE STREPTOCOCCER

**MLK FYN I/S
Mikrobiologisk laboratorium
Lille Tornbjerg Vej 24
5220 Odense SØ**

**Flemming Boisen
Afdelingsdyrlæge**

November 1994

BAGGRUND OG FORMÅL

I opfølgingsprogrammet for biogasområdet 1992-1994 gennemføres en række veterinære undersøgelser, som beskrevet i forslag til et veterinært forsøgsprogram fremsendt af Veterinærdirektoratet til Energistyrelsen d. 15. juli 1991. MLK FYN, Mikrobiologisk Laboratorium udfører en del af disse opgaver. Ved styregruppens og laboratorigruppens møder i efteråret 1993 blev det drøftet at gennemføre yderligere undersøgelser af forekomsten af fækale streptococcer (FS) i biogafællesanlæg (BFA) Revninge.

De rutinemæssige FS-analyser siden november 1992 har vist, at antallet af FS i reaktortanke og i lagertanke er betydelig højere end i fortankene. Dette fænomen er tilsyneladende i kontrast til FS antallet i andre BFA, hvor behandlingen i reaktortankene fører til en større eller mindre FS-reduktion.

Formålet med dette projekt er at belyse årsagen til den høje forekomst af FS i BFA Revninge ved:

- * kortlægning af forekomsten af fækale streptococcer
- * identifikation og beskrivelse af den/de dominerende fækale streptococcer

Formålet er endvidere at vurdere de fækale streptococcers termoresistens ved:

- * bestemmelse af den/de dominerende fækale streptococcers termoresistens under laboratorieforhold
- * varmebehandlingsundersøgelse af fækale streptococcer i biomiljøet under forskellige tid- og temperaturlastninger

MATERIALER OG METODER.

Prøver

Fækale streptococcer.

I forbindelse med de rutinemæssige FS-analyser af prøver fra BFA Revninge og BFA Fangel i april og maj 1994 blev udvalgt en række FS suspekter kolonier fra Enterococ Agar dyrkningspladen i følgende forhold:

BFA Revninge (FS kortlægning)

- Gylletank F1,	4 kolonier
- Doseringstank F2,	2 kolonier
- Reaktortank R1,	5 kolonier
- Reaktortank R2,	6 kolonier
- Reaktortank R3,	11 kolonier
- Lagertank L1,	10 kolonier
- Lagertank L2,	7 kolonier
Ialt	45 kolonier

BFA Fangel (FS referenceundersøgelse)

- Hygiejnetank H1,	2 kolonier
- Reaktortank R1,	4 kolonier
- Reaktortank R2,	4 kolonier
- Lagertank L1,	3 kolonier
- Lagertank L2,	3 kolonier
Ialt	16 kolonier

Prøver fra dyrefarme.

Hovedmængden af biomateriale til BFA Revninge leveres fra 3 dyrefarme i Kertemindeområdet:

- Pilegården, Odensevej 252, Ladby: Kogylle, der tilledes direkte gennem kanalnørsystem fra kostalden via pumpe tank til fortank.
- Hyrdgården, Hyrdevej 83, Kerteminde: Sofæces, der transporteres med tankvogn.
- Tårupgården, Tårup Østergade 83, Mesinge: Svinefæces, der transporteres med tankvogn.

På hver dyrefarm blev i april 1994 af laboratoriet udtaget ca. 5 kg gylle/fæces. Kogyllen blev opsamlet ved udløb fra stald. Sofæces og svinefæces blev opsamlet inde i stald. Prøverne blev transporteret i ren plastspand til laboratoriet og undersøgt for indhold af fækale streptococcer.

Suspekte FS-kolonier blev udtaget som følgende:

- Kogylle,	9 kolonier
- Sofæces,	10 kolonier
- Svinefæces	10 kolonier
Ialt,	29 kolonier

Prøver af biomasse.

Fra BFA Revninge blev i august 1994 udtaget 3 prøver af biomasse fra reaktortankene (R1, R2, R3) og 2 prøver af biomasse fra lagertankene (L1, L2). Hver prøve bestod af 1 kg biomasse, der blev overført til plastbeholder med skrue låg og opbevaret på laboratoriet ved +5°C til næste dag, hvor varmebehandlingsundersøgelsen blev indledt.

Fremgangsmåde

Fækale streptococcer.

Prøver fra de 2 BFA, udtaget i april og maj, og fra de 3 dyrefarme, udtaget i april, blev indledningsvis undersøgt i henhold til forslag til Dansk Standard: "Miljøbiologisk undersøgelse. Bestemmelse af fækale streptococcer i biomasser ved pladespredningsmetode, oktober 1993." Suspekter FS blev tilfældigt valgt til videre undersøgelse ved rendyrkning samt efterfølgende mikroskopi og identifikation ved API 20 STREP profilen, version 5.1. Supplerende undersøgelser af visse kolonier omfattede hæmolyseform på Blod Agar, samt vækstforhold i Brain Heart Infusion Broth (BHI) ved 37°C, 10°C, 45°C og BHI med 6,5% NaCl ved 37°C.

Termoresistensundersøgelse ved laboratorieforhold.

Udvalgte fækale streptococcer blev underkastet en termoresistensundersøgelse under laboratoriebetingelser ved 50°C, 60°C og 70°C i 30 min.

Varmebehandling af biomasse.

De 5 prøver af biomasse, udtaget i august, blev undersøgt for indhold af fækale streptococcer efter ovennævnte metodeforslag til Dansk Standard. Derefter blev hver prøve delt i to delprøver á ca. 500 gram, og emballeret i plastbeholder. Delprøverne blev placeret i hvert sit vandbad ved henholdsvis 50°C og 55°C og varmebehandlet i begge vandbade i 2 og 4 timer. Et termometer blev placeret i 2 af prøverne og i vandbadet ved 50°C, tilsvarende ved 55°C. Temperaturen blev aflæst hvert 15. min. og med samme interval blev 10 gange omrøring foretaget i hver af de 10 prøver. Efter varmebehandling ved 50°C i 2 timer og i 4 timer blev prøven analyseret for forekomsten af fækale streptococcer. Tilsvarende blev prøverne ved 55°C analyseret efter 2 timer og 4 timer. Den samlede undersøgelse omfatter således 5 prøver før varmebehandling og 20 prøver efter varmebehandling.

RESULTATER OG DISKUSSION.

Resultatet af undersøgelse og identifikation af 90 FS suspekter kolonier er vist samlet i tabel 1. Det fremgår heraf, at der er påvist 5 forskellige species tilhørende *Enterococcus* med dominans af *E.faecium* og *E.durans*, der er typiske fækale og som forekommer både i de 2 BFA og i prøver fra dyrefarmene. *E.casseliflavus* regnes ifølge Bergey's Manual (1) for en variant af *E.faecium*, men der er lidt usikkerhed om dens fækale oprindelse. *E.faecalis* og *E.avium* er naturligt forekommende i tarmkanalen. *Lactococcus lactis cremoris* må betragtes som en falsk positiv i relation til FS-metoden. *Aerococcus viridans* skal ikke medregnes i FS-antallet, mens *Streptococcus bovis* udskilles med fæces fra kvæg og svin og skal derfor tælles med i FS-antallet.

Valg af FS-kolonier.

Ved tælling af antal suspekter kolonier på Enterococplader med prøver fra BFA Revninge i perioden november 1992 - juni 1994 blev påvist et højt FS-tal. Det drejede sig specielt om prøverne fra reaktortanke og fra lagertanke. Pladerne skulle i henhold til metoden typisk tælles på 10^{-5} og 10^{-6} fortyndinger for at opnå mindre end 150 enkeltliggende kolonier. Ved vurdering af samtlige plader konstateredes typisk 3 kolonistørrelser.

- 1) Store røde kolonier, og røde kolonier med hvid zone, 1,5-2,5 mm.
- 2) Små røde kolonier, og røde kolonier med hvid zone, 0,5-1 mm.
- 3) Små blegrøde eller hvidlige kolonier, <0,5 mm.

Tabel 1. Forekomsten af fækale streptococcer i biomasser fra 2 biogasfællesanlæg og fæcesprøver fra 3 dyrefarme.

Prøvetype Kontrolsted	Enterococcus faecium	Enterococcus durans	Enterococcus casseliflavus	Enterococcus faecalis	Enterococcus avium	Lactococcus lactis crem	Aerococcus viridans	Streptococcus bovis
BFA Fangel								
Hygiejniseringsk. H1	2							
Reaktortank, R1	3	1						
Reaktortank, R2	2	1	1					
Lagertank, L1	3							
Lagertank, L2	3							
Ialt	13	2	1					
BFA Revninge								
Gylletank, F1	3				1			
Doseringsk. F2		1					(1)*	1
Reaktortank, R1		1					(4)*	4
Reaktortank, R2		1	1				(4)*	4
Reaktortank, R3	1	1	5				(4)*	4
Lagertank, L1	1	1	2				(6)*	6
Lagertank, L2	1		2				(4)*	4
Ialt	6	5	10		1		(23)*	23
Dyrefarme								
Kogylle	3						6	
Sofæces	1	3		2		1	3	
Svinefæces	1	9					0	
Ialt	5	12		2		1	9	
Samlet forekomst	24	19	11	2	1	1	9	23

*) de anførte tal for Aerococcus viridans i prøverne fra BFA Revninge angiver den preliminaire gruppering af bakterierne, som efter supplerende mikroskopi og biokemiske reaktion m.v. blev identificeret som Streptococcus bovis (jf. tilsvarende tal i kolonne t.h.).

Kolonier under 1) og 2) medregnedes i FS-antallet fra BFA Revninge, men det var typisk, at de store kolonier kun forekom på dyrkningsplade med fortynding -2, -3 og -4 og var ofte helt fraværende ved -5 og -6. Tilsvarende tælling af plader fra BFA Fangel viste dominans af store kolonier på plader med mindre end 150 kolonier.

Denne systematiske forskel på tællepladerne fra BFA Revninge og BFA Fangel dannede grundlag for udvælgelse af FS-kolonier i dette projekt til nærmere kortlægning. Såvel store røde kolonier som små røde kolonier blev indledningsvis rendyrket på Plate Count Agar (PCA) og Æskulin Agar (ÆA). De store kolonier viste god vækst på PCA og positiv reaktion (sortsværtning) på ÆA inden for 24 timer. De små kolonier udviste dårlig vækst på PCA og sen eller ingen æskulinreaktion i løbet af 48 timer.

I prøverne fra kogylle fandtes dominans af små FS kolonier. Større forekomst af små FS kolonier fandtes også i sofæces, mens svinefæces var domineret af de store FS kolonier. Resultaterne er vist i tabel 2.

Tabel 2. Forekomster af FS i prøver fra dyrefarmene.

Prøvetype	FS-antal/g	Store FS/g
Kogylle	600.000	3.000
Sofæces	100.000	8.100
Svinefæces	1.300.000	600.000

Identifikation.

Samtlige kolonier blev identificeret ved anvendelse af API 20 STREP. Herved fandtes, at de store kolonier udgjordes af *E.faecium* og *E.durans*. Disse forekom i prøver fra BFA Revninge, i referenceprøverne fra BFA Fangel og i prøverne fra dyrefarmene. Ved mikroskopi konstateredes gram-positive coccer lejret i par eller mindre kæder.

Ved identifikation af de små kolonier på 0,5-1 mm fandtes ved API profilen *Aerococcus viridans* i prøverne fra kogylle og sofæces. Ved identifikation af små kolonier fra prøverne fra BFA Revninge viste API profilen *Aerococcus viridans*, men oftest med "lav overensstemmelse" eller "tvivlsom profil". Alle sidstnævnte kolonier var æskulinpositive, mens *Aerococcus viridans* fra gylle- og fæcesprøverne var såvel æskulinpositive som æskulinnegative. Desuden fandtes diskrepans ved flere biokemiske reaktioner, når *Aerococcus viridans* fra fæcesprøverne blev sammenlignet med de "tvivlsomme *Aerococcus*" fra reaktor- og lagertankprøverne.

Laboratoriet har derfor suppleret API profilen med andre test. Disse omfattede vækst i BHI ved 10°C, 37°C, 45°C og BHI med 6,5% NaCl ved 37°C samt hæmolyse og mikroskopi. Vækstundersøgelsesresultater m.m. fremgår af tabel 3.

Tabel 3. Undersøgelse af "tvivlsomme Aerococcus" (= Streptococcus bovis) fra prøver fra BFA Revninge, samt af Aerococcus viridans fra fæcesprøver.

	10°C	37°C	45°C	6,5% Salt	Hæmolyse	Mikroskopi
"Tvivlsomme Aerococcus" = S.bovis fra BFA Revninge	+	+	+	+	Svag grøn farve	Små gr.+coccer par korte kæder
Aerococcus viridans fra fæcesprøverne	+	+	+	+	grønne α	Større gr.+coccer tetramer

Dominerende bakterier.

Reaktionerne vist i tabel 3 gav anledning til en ændring af identifikation af de små kolonier (type 2) i prøver fra BFA Revninge. Vækstbilledet og hæmolyseform samt mikroskopi er typisk for Streptococcus bovis.

Vækstmønstret for kolonierne fra kogylle og sofæces er derimod typisk for Aerococcus viridans, hvilket yderligere bekræftes af α -hæmolysen på Blod Agar samt den typiske dannelse af coccer i tetramer, hvilket tydeligt ses ved mikroskopi. Dette fænomen kan iøvrigt også ses ved direkte mikroskopi af suspekterte kolonier fra FS pladerne, jf. mikroskopiproceduren i henhold til FS-metoden.

Det er således massiv forekomst af Streptococcus bovis, der giver anledning til det høje FS antal i reaktor- og lagertankprøver fra BFA Revninge. Disse udskilles med fæces fra kvæg og svin,

men er ikke påvist ved denne undersøgelse i fæcesprøverne. I disse prøver fandtes derimod, at små kolonier udgjordes af *Aerococcus viridans*. Denne forekommer formentlig i staldluften og i dyrenes luftveje, hvorfra den kan overføres til mave-tarmkanalen og udskilles med fæces. Forklaringen på denne systematiske forskel i identifikationsmønstret fra de to prøvegrupper må formentlig søges i den tilfældige udvælgelse af kolonierne på pladerne, hvor *S. bovis* tilsyneladende er til stede i lavere antal i fæcesprøverne end i prøverne fra BFA Revninge. I sidstnævnte har en selektion og opformering af *S. bovis* tilsyneladende fundet sted, begrundet i de særlige miljø- og driftsforhold. Det bør således fremhæves, at kogyllen føres direkte fra kostalden via en pumpe tank til anlæggets fortank gennem en kanal og rørledning på ca. 20 meter. Denne korte transportvej for og næsten kontinuerlige tilledning af kogylle betyder, at der konstant tilføres et stort antal *S. bovis* fra det fækale miljø. Samtidig synes overlevelses- og opformeringsmuligheden at være betydelig i anlægget på grund af driftstemperaturen. Normalt vil overlevelsen af *S. bovis* aftage i takt med stigende afstand til den oprindelige fækale kilde. Det synes derfor rimeligt at antage, at netop den tætte forbindelse mellem kilde og anlæg er af afgørende betydning for at forklare forekomsten af *S. bovis* i BFA Revninge.

Termoresistensundersøgelse.

I forbindelse med undersøgelse af vækst ved forskellige temperaturer viste *Streptococcus bovis* vækst i BHI ved 45°C i 48 timer.

Der blev derfor udført yderligere termoresistensprøvning af *Streptococcus bovis*, isoleret fra Enterococ Agar, Blod Agar og Plate Count Agar efter undersøgelse af prøve fra reaktortank (R1), reaktortank (R2) og lagertank (L1). *S. bovis* blev podet i BHI, som blev varmebehandlet i

vandbad ved 50°C, 60°C og 70°C i 30 min., hvorefter mulighed for vækst blev fortsat ved inkubering i BHI glasset ved 37°C i 48 timer. Resultatet er vist i tabel 4.

Tabel 4. Termoresistensundersøgelse af *S. bovis*.

Prøvetype	50°C	60°C	70°C
Reaktortank, R1 koloni fra EA	+	+	÷
Reaktortank, R1 koloni fra BA	+	+	+
Reaktortank, R2 koloni fra EA	+	+	+
Reaktortank, R2 koloni fra PCA	+	+	÷
Lagertank, L1 Koloni fra EA	+	+	÷
Lagertank, L1 koloni fra BA	+	+	÷

Det fremgår af undersøgelsen, at *S.bovis* først viser tegn på manglende vækst efter varmebehandling ved 70°C.

Varmebehandlingsundersøgelse i biomiljøet.

Resultaterne af varmebehandlingsundersøgelserne efter belastning ved 50°C i 2 timer og i 4 timer samt ved 55°C i 2 timer og i 4 timer er vist i tabel 5.

Det fremgår heraf, at begyndelsesniveauet for FS før varmebehandling varierer fra 87.000.000 (log 7.94) til 33.000 (log 4.52). Efter varmebehandling ved 50°C ses en mindre effekt kun i prøven fra lagertank L2, hvor FS antallet efter 4 timer er 25.000 (log 4.40), men log-reduktionen er kun 1.21. De øvrige målinger af FS viser ikke større forskel i resultaterne. Efter varmebehandling ved 55°C fandtes FS < 100 både efter 2 timer og efter 4 timer, svarende til log-reduktioner på > 2.52, > 3.56 og > 3.61 i henholdsvis prøve R3, L1 og L2. I prøve R1 er log-reduktionen kun 1.24 efter 2 timer og 2.97 efter 4 timer. I prøve R2 er log-reduktionen 3.31 efter 2 timers varmebehandling og 3.61 efter 4 timer. Varmebehandlingseffekten, kombineret med en evt. toksisk effekt i biomiljøet og samspillet mellem mikroorganismene, er således mest udtalt og markant ved 55°C, dog er FS-reduktionen mindre tydelig i biomassen fra reaktortank R1, muligvis på grund af en beskyttelseseffekt på bakterierne i den endnu ikke fuldt udrådnede biomasse.

Tabel 5. Varmebehandlingsundersøgelse af fækale streptococcer i 5 biomasser (3 reaktortanke og 2 lagertanke) ved 50°C og 55°C.

Lab.nr.	Prøvetype	Ikke-varme-behandlet prøve antal FS/gram	Varmebehandlede delprøver			
			50°C i 2 timer antal FS/gram	50°C i 4 timer antal FS/gram	55°C i 2 timer antal FS/gram	55°C i 4 timer antal FS/gram
VM 2841	Biomasse fra Reaktortank, R1	87.000.000	95.000.000	60.000.000	5.000.000	93.000
VM 2842	Biomasse fra Reaktortank, R2	410.000	300.000	120.000	200	< 100
VM 2843	Biomasse fra Reaktortank, R3	33.000	15.000	18.000	< 100	< 100
VM 2844	Biomasse fra Lagertank, L1	360.000	370.000	100.000	< 100	< 100
VM 2845	Biomasse fra Lagertank, L2	410.000	50.000	25.000	< 100	< 100

KONKLUSION.

- I Ved undersøgelse efter FS metoden af prøver fra BFA Revninge samt af prøver fra kogylle, sofæces og svinefæces findes dominans af to kolonytyper:
 - 1) store suspekter kolonier 1,5-2,5 mm.
 - 2) små suspekter kolonier 0,5-1,0 mm.
- II De store kolonier består hovedsagelig af *E.faecium* og *E.durans*, der skal tælles med i FS-metoden.
- III De små kolonier, der isoleres fra kogylle og sofæces består af *Aerococcus viridans*, der ikke skal tælles med i FS-metoden, hvor de frasorteres ved den mikroskopiske identifikation.
- IV De små kolonier, der isoleres fra reaktor- og lagertankprøverne består af *Streptococcus bovis*, der skal tælles med i FS-metoden, hvor de identificeres ved mikroskopi.
- V *Streptococcus bovis* dominerer i antallet af FS i reaktor- og lagertankprøverne, formentlig som følge af den direkte tilledning af kogylle over kort afstand fra det fækale miljø i stalden til anlæggets fortank suppleret med gunstige overlevelses- og opformerings muligheder bl.a. på grund af temperaturforholdene.
- VI *Streptococcus bovis* kan under laboratoriebetingelser vokse efter varmebehandling ved 60°C i 30 min., men viser tegn på termodrab efter varmebehandling ved 70°C i 30 min.
- VII Ved varmebehandling ved 55°C i 2-4 timer af biomasse fra reaktor- og lagertanke fandtes i 4 (80 %) af 5 prøver en markant FS-reduktion.

REFERENCER.

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2, 1986.
2. The Prokaryotes. Vol. II, 1981.
3. Larsen, H.E. og Aalbæk, B. Veterinær Mikrobiologi. Grampositive bakterier. DSR forlag. Bind 1, 1988.
4. Bendixen, H.J. Det veterinære forsøgsprogram i biogasfællesanlæg. Midtvejsrapport vedrørende 10 biogasfællesanlæg. November 1993.
5. FS resultater. MLK FYN I/S. November 1992-juni 1994.
6. Forslag til Dansk Standard. Miljøbiologisk undersøgelse.
Bestemmelse af fækale streptococcer i biomasser ved pladespredningsmetode. Oktober 1993.