

# Test af mikrobiologiske hurtigmetoder

DANVA Forsknings- og Udredningsprojekt nr. 3



**DANVA**  
Dansk Vand- og  
Spildevandsforening





# Test af Mikrobiologiske hurtigmetoder

Februar 2006

# Test af Mikrobiologiske hurtigmetoder

Ref 5776042

Version

Dato 2005-10-28

Udarbejdet af FRJ

Kontrolleret af TAO, FMO

Godkendt af TAO

Rambøll Danmark A/S

Teknikerbyen 31

DK-2830 Virum

Danmark

Telefon +45 4598 6000

[www.ramboll.dk](http://www.ramboll.dk)

## Indholdsfortegnelse

<b>1.</b>	<b>Indledning</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Formål</b>	<b>1</b>
<b>3.</b>	<b>Etablering af prøvetagningssteder og udtagning af vandprøver</b>	<b>1</b>
<b>4.</b>	<b>Kort beskrivelse af projektet og metoderne</b>	<b>3</b>
4.1	Endotoxinmetoden	3
4.2	BactiQuant™-metoden	4
4.3	Colilert metoden	5
4.4	Kimtalsbestemmelse	5
<b>5.</b>	<b>Forsøgsresultater</b>	<b>5</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion af resultater</b>	<b>7</b>
6.1	Sammenligning af alle test med hensyn til prøvetagningsstedets placering	7
6.2	Sammenligning af alle test med hensyn til reproducerbarhed	7
6.3	Sammenligning af test med hensyn til følsomhed	8
<b>7.</b>	<b>Sammenfatning og evaluering af testene</b>	<b>10</b>
7.1	Endotoxintesten	10
7.2	BactiQuant™	10
7.3	Kim 22	11
7.4	Kim 37	11
7.5	Colilert testen (Coliforme og E. Coli)	12
7.6	Enterokokker	12
<b>8.</b>	<b>Samlet konklusion</b>	<b>12</b>
<b>9.</b>	<b>Referencer</b>	<b>13</b>

## **1. Indledning**

Mikrobiologiske hurtigtestmetoder har længe stået øverst på vandværkernes ønskeliste. Det er imidlertid ingen let opgave at udvikle sådanne procedurer, idet måling af levende organismer er tidskrævende, og diversiteten af mikroorganismer er enorm. Disse besværligheder har dog ikke afholdt kreative forskere fra at udvikle og afprøve nye og hurtigere metoder. Rambøll er derfor inden for de sidste år gået ind i denne udvikling og har i samarbejde med Scandia Lab ApS introduceret Endotoxintesten. Resultatet blev en nedbringelse af responstiden til få timer sammenlignet med de almindelige kimtalsbestemmelser, som har flere dages responstid. Udviklingen er fortsat med uformindsket hastighed, og flere hurtigtest har set dagens lys, f.eks. Mycometers BactiQuant™ og Colilert testen. På denne baggrund foreslog Rambøll, om DANVA ville medfinansiere et projekt, som skulle undersøge validiteten af de nye testmetoder under autentiske forhold, dvs. uden for laboratoriet på et vandværk i drift. Ansøgningen blev imødekommet, og projektet blev startet i samarbejde med Danva og Århus Kommunale Værker (ÅKV), som stillede Østerby Vandværk til rådighed for forsøgene.

## **2. Formål**

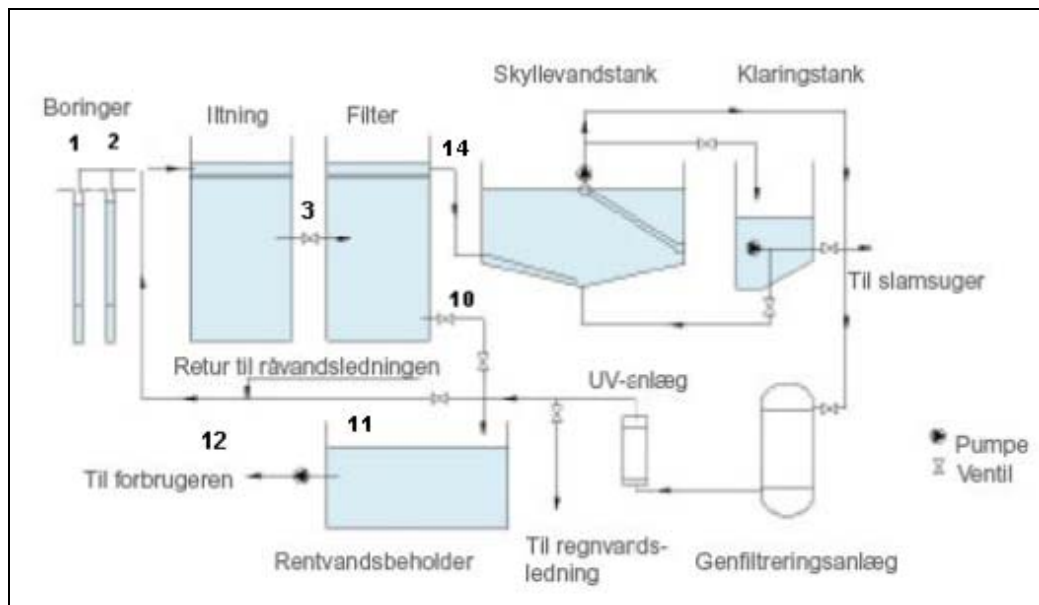
Projektets primære formål er at få et praktisk erfaringsgrundlag for mikrobiologiske hurtigtestmetoder til drikkevandskontrol og på denne baggrund at lave et statistisk grundlag for en sammenligning med de obligatoriske kimtalsbestemmelser. Projektet tjener det overordnede formål at kunne lave en mikrobiologisk screening af et vandværk på én dag. Med de nuværende kommercielt tilgængelige testmetoder kan dette ikke gennemføres.

## **3. Etablering af prøvetagningssteder og udtagning af vandprøver**

Arbejdet på Østerby Vandværk ved Tranbjerg i Jylland blev udført i uge 40 2005. Fra Rambøll deltog Frank Jacobsen, fra ÅKV Else-Marie Østergaard og fra Mycometer Morten Miller. På vandværket var der etableret i alt 14 prøvetagningssteder, hvoraf der blev udtaget vandprøver fra 7 prøvehaner. Der blev udtaget i alt 39 vandprøver. Placering af prøvehanerne var følgende, hvor nummereringen af vandprøverne er angivet i parentes ved de valgte prøvehaner:

1. Råvand fra Tiset (A1, B1, C1, D1, E1x, E1y, E1z, E1v)
2. Råvand fra Østerby (A2, B2, C2, D2)
3. Fælles afgang fra beluftning (A3, B3, C3, D3)
4. Efter filter 1
5. Efter filter 2
6. Efter filter 3
7. Efter filter 4
8. Efter filter 5
9. Efter filter 6
10. Fælles afgang filtre (A10, B10, C10, D10)
11. Rentvandstank før pumper (A11, B11, C11, D11, E11x, E11y, E11z, E11v)
12. Rentvand afgang til zone 105 (A12, B12, C12, D12)
13. Rentvand afgang zone 83
14. Filterskyllevand efter 1 minut markeret med a og 3 minutter markeret med b (A14a, A14b, B14a, C14a, C14b, D14a, D14b)

I figur 1 ses en principskitse af Østerby Vandværk, hvor alle prøvesteder er afmærket.



**Figur 1** Vandbehandling på Østerby Vandværk

Efter etablering af prøvetagningshaner gik arbejdet i gang med udtagning af vandanalyser til mikrobiologiske test. På hvert tappested blev der udført 5 analyserunder. Hver analyserunde bestod af et bredt udvalg af mikrobiologiske test. I alt blev der udført følgende test:

- 39 målinger med Mycometers BactiQuant™
- 16 målinger for endotoxin
- 39 målinger for kim 22 °C

- 39 målinger for kim 37 °C
- 39 målinger for E.coli
- 39 målinger for coliforme bakterier
- 39 målinger for enterokokker

BactiQuant™ blev udført på værket med testudstyr fra Mycometer, mens endotoxintest blev udført af Scandia Laboratorium. Øvrige mikrobiologiske test blev udført af Eurofins, som er et akkrediteret laboratorium.

#### 4. Kort beskrivelse af projektet og metoderne

Hvis en mikrobiologisk hurtigtest viser sig at være pålidelig og har en høj grad af reproducerbarhed, vil den være et meget stærkt alternativ til konventionelle kimtalsbestemmelser.

I modsætning til kimtalsbestemmelser kan hurtigtest laves i tidsintervallet minutter til timer afhængig af testen. For de hurtigste vil det derfor være muligt at anvende dem til sporing af indtrængning af bakterier i vandbehandlingen på et vandværk. På denne baggrund vil det være muligt at undersøge et helt vandværk med mikrobiologiske problemer på en formiddag og iværksætte en arbejdsplan for udbedring af problemerne allerede samme eftermiddag.

Det er klart, at alle parter både forbruger, vandforsyning og teknisk personale vil nyde godt af en så hurtig indsats.

##### 4.1 Endotoxinmetoden

Endotoxiner er cellevægsbestanddele i gramnegative bakterier. 1000 gramnegative bakterier indeholder 14 pg (piko gram =  $10^{-12}$ g) endotoxin, eller sagt på en anden måde: der skal 7000 gramnegative bakterier til at give 1 EU/ml.

Til Endotoxinanalyser anvendes et blodestrakt fra dolkhalen (*Limulus polyphemus*). Når endotoxin er til stede i en prøve, som tilsættes blodestrakt, fører dette til dannelsen af et gult farvestof. Farveintensiteten bruges til at beregne indholdet af endotoxin.

Endotoxintesten er på denne baggrund i stand til at give et svar på, om der er eller har været gramnegative bakterier til stede i vandet. Der er ingen af de andre testmetoder, som har denne egenskab. Det er ingen forudsætning, at bakterierne er levende, idet endotoxinet fra dem alligevel detekteres.

I rent grundvand findes ofte ingen endotoxin. Under vandbehandlingen afsættes små mængder af endotoxin fra de naturlige bakteriepopulationer i f.eks. sandfiltrene, og det er muligt at måle et lettere forhøjet endotoxinniveau efter vandbehandlingen. Et naturligt niveau i grundvand ligger på 0,0 til 0,1 EU/ml, hvilket betegnes som meget rent drikkevand. Til sammenligning må apotekets sterilvand til intravenøs brug indeholde op til 0,25 EU/ml.

Det danske drikkevand er derfor af exceptionelt god kvalitet mht. endotoxin, og en kilde som Haralds kilde ved Ribe er helt endotoxinfri. Alt udenlandsk kildevand på nær et sydafrikansk mærke indeholder endotoxin i varierende mængder.

Færdigbehandlet drikkevand fra danske vandværker kan indeholde endotoxin svarende til 0,1-2,0 EU/ml. Endotoxinværdier i intervallet 2-5 EU/ml kan indikere en begyndende mikrobiologisk vækst eller en pludselig stigning i drikkevandstemperaturen. På dette niveau kræves ingen øjeblikkelig opfølgende målinger. Næste rutinekontrol vil indikere, om der er et mikrobiologisk problem.

Endotoxinværdier i intervallet 5-10 EU/ml vil give anledning til bekymring. I denne situation skal der udføres en ekstra test, og hvis denne værdi er identisk eller større, skal kilden til den forhøjede mikrobiologiske aktivitet opspores. Derudover vil det være gavnligt at supplere med en almindelig kimtest for at vurdere, om der skal etableres et kogepåbud.

Nedenstående tabel sammenfatter de nævnte vurderingskriterier:

Målekategori	Endotoxintal	Aktion
Kategori 1	$0 \leq \text{EU/ml} \leq 2$	Bedste kvalitet
Kategori 2	$2 < \text{EU/ml} < 10$	Mellem kvalitet
Kategori 3	$10 \leq \text{EU/ml}$	Uacceptabel kvalitet

**Tabel 2** Vurderingskriterier for Endotoxinmetoden

Målekategorierne er baseret på data fra undersøgelser foretaget af Rambøll og Scan Dia Labs ApS 2001-2005, hvor der er foretaget i alt 1500 analyser fordelt på 36 danske vandværker.

#### 4.2 **BactiQuant™-metoden**

BactiQuant™ er en ny dansk-udviklet hurtigmetode til måling af totalkim både gram-negative og grampositive bakteriestammer i brugsvand. Testen måler aktiviteten af et enzym, som er naturligt forekommende i bakterier. Enzymaktiviteten måles ved anvendelse af et substrat, der ved reaktion med enzymet fraspaltes et fluorescerende stof. Analysen er simpel og kan udføres direkte på prøvetagningsstedet med en samlet analysetid på 20 – 40 minutter.

Der er ved tidligere undersøgelser fundet en generel god overensstemmelse mellem analyseresultaterne fra BactiQuant™ målt i BQ og kimtal 22 °C, og metoden kan anvendes både på råvands- og rentvandssiden. Endnu er der for få undersøgelser til at opstille alle fortolkningskriterier mellem kimtal 22 °C og BactiQuant™ testen, men i tabel 3 er der opstillet 3 kategorier i relation til grænseværdien for kimtal 22 °C hos forbrugerne. Analyseresultatet (BQ-tal) kan her inddeles i følgende kategorier:

Målekategori	BQ - tal	Aktion
Kategori 1	BQ-tal $\leq$ 40	Bedste kvalitet
Kategori 2	40 < BQ-tal $\leq$ 200	Mellem kvalitet
Kategori 3	BQ-tal > 200	Uacceptabel kvalitet

**Tabel 3** Målekategorier for BactiQuant™ -metoden i relation til grænseværdien for kimtal 22 °C hos forbrugerne. Målekategorierne er baseret på data fra en undersøgelse hos Københavns Energi med 24 lokaliteter og 293 målinger

#### 4.3 Colilert metoden

Colilert er en ny hurtigmetode til undersøgelse for coliforme og E. Coli bakterier i drikkevand. Påvisningen af coliforme og E. Coli bakterier er i lighed med BactiQuant™ baseret på påvisning og kvantificering af en enzymaktivitet. I Colilert systemet påvises coliforme bakterier ved dannelsen af et gult farvestof, som kan observeres med det blotte øje. E. Coli påvises ved hjælp af et substrat, som ved nedbrydning danner et fluorescerende stof, som kan påvises under UV-lys. Analysetiden er 18 timer, og forekomsten af coliforme og E. Coli bestemmes ved hjælp af en såkaldt MPN-tabel. Testen og dens anvendelse er beskrevet i /1/.

#### 4.4 Kimtalsbestemmelse

Kimtal er defineret som det antal mikroorganismer, der kan danne synlige kolonier under standardiserede vækstbetingelser. I praksis overføres en vandprøve til et dyrkningsmedie, og prøven inkuberes (2-7 dage afhængig af den valgte standardmetode). Herefter tælles bakteriekolonierne, og resultatet angives som antal kolonidannende enheder (CFU) pr. ml vandprøve.

### 5. Forsøgsresultater

Alle forsøgsresultater er vist i tabel 4. Det er utroligt beklageligt, at der i de akkrediterede kimtalsanalyser er opstået 8 kontamineringsfejl. Det reducerer styrken af forsøgene, idet sammenligningsgrundlaget bliver mere usikkert.

	Endotoxin	Bacti-Quant™	Kim 22 °C	Kim 37 °C	Coliforme v 37 °C	E. Coli	Enterokokker
Metode	LAL test	Enzymatisk	DS/ENISO 6222	DS/ENISO 6222	Colilert	Colilert	ISO 7899/2
Prøve	[EU/ml]	[FE/ml]	[antal/ml]	[antal/ml]	[antal/100 ml]	[antal/100 ml]	[antal/100 ml]
A1	0,08	3,46	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
A2	0,05	1,87	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
A3	0,3	8,47	5	< 1	< 1	< 1	< 1
A10	0,56	11,69	160	< 1	< 1	< 1	< 1
A11	1,28	79,31	17	< 1	< 1	< 1	< 1
A12	0,5	13,67	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
A14a	0,13	3289,69	44	< 1	< 1	< 1	< 1
A14b	0,15	1980,64	15	< 1	< 1	< 1	< 1
B1	0,1	3,21	kontamineret	kontamineret	< 1	< 1	< 1
B2	0,04	1,66	kontamineret	kontamineret	< 1	< 1	< 1
B3	0,36	13,88	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
B10	0,48	13,52	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
B11	0,48	28,10	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
B12	0,99	12,01	kontamineret	kontamineret	< 1	< 1	< 1
B14a	0,4	1189,73	kontamineret	kontamineret	< 1	< 1	2
C1		9,32	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
C2		7,60	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
C3		25,16	6	< 1	< 1	< 1	< 1
C10		16,13	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
C11		50,94	7	< 1	< 1	< 1	< 1
C12		25,60	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
C14a		6137,57	170	< 1	< 1	< 1	< 1
C14b		1909,34	52	< 1	< 1	< 1	< 1
D1		10,34	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
D2		2,08	1	< 1	< 1	< 1	< 1
D3		16,32	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
D10		35,20	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
D11		45,75	1	< 1	< 1	< 1	< 1
D12		44,89	1	< 1	< 1	< 1	< 1
D14a		7277,44	110	< 1	< 1	< 1	< 1
D14b		2886,30	39	< 1	< 1	< 1	< 1
E1x		3,08	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
E1y		4,10	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
E1z		4,22	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
E1v		4,08	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
E11x		24,94	1	< 1	< 1	< 1	< 1
E11y		24,39	1	< 1	< 1	< 1	< 1
E11z		23,12	1	< 1	< 1	< 1	< 1
E11v		19,24	2	< 1	< 1	< 1	< 1
Kontamineret: Prøve udgået pga. forurening af pladen i laboratoriet							

**Tabel 4** Samtlige forsøgsresultater opmålt med såvel hurtigtestmetoderne som de traditionelle

## 6. Diskussion af resultater

### 6.1 Sammenligning af alle test med hensyn til prøvetagningsstedets placering

Det er almindeligt at observere en stigende mikrobiologisk aktivitet, efterhånden som vandbehandlingen skrider frem. Maksimum etableres ofte i sandfiltrene, hvor de mikrobiologiske processer sørger for omsætning/fjernelse af stoffer som jern og mangan samt forskellige former for kvælstofforbindelser: ammonium, nitrit og nitrat. Tendensen observeres tydeligt i denne undersøgelse, hvis testresultaterne fra forsøgene sammenlignes som funktion af prøvetagningsstedet.

Test	Prøvested				
	A1	A3	A10	A11	A12
Endotoxin testen	0,08	0,30	0,56	1,28	0,50
BactiQuant™	3,46	8,47	11,69	79,31	13,67
Kimtal v 22 °C	<1	5	160	17	<1
Kimtal v 37 °C	<1	<1	<1	<1	<1
Colilert	<1	<1	<1	<1	<1

**Tabel 5** Betydning af prøvestedets placering

Alle hurtigtestmetoder viser sammenstemmende, at den mikrobiologiske belastning stiger, efterhånden som man bevæger sig ind i vandbehandlingsprocessen fra grundvandet A1 til fælles afgang filtre A10, men i det videre forløb er der forskel mellem på den ene side hurtigtestmetoderne og på den anden side den traditionelle kimtalsmåling.

Endotoxin og BactiQuant™ testen angiver tapstedet A11 (afgang rentvandstank før pumpe) som stedet med størst mikrobiologisk aktivitet. Kim 22 °C angiver tapstedet A10 (fælles afgang filter) som stedet med størst mikrobiologisk aktivitet. Kim 37 °C og colilert testen angiver analyseværdier under metodernes detektionsværdier. Forskellen i tapsted med den største aktivitet kan ikke umiddelbart forklares, men kan måske tilskrives forskelle i metodernes følsomhed.

### 6.2 Sammenligning af alle test med hensyn til reproducerbarhed

En meget vigtig parameter var testenenes evne til gang på gang inden for samme prøvegang at give det samme resultat. Råvandet A1 tjener igen som udgangspunkt, idet der er udtaget 4 prøver inden for 2 minutter. Samme procedure blev gennemført med et andet tappende A11, hvor den mikrobiologiske belastning var større end i grundvandet. Resultaterne er vist i tabel 6 og 7.

Test	Replikat			
	E1 <sub>x</sub>	E1 <sub>y</sub>	E1 <sub>z</sub>	E1 <sub>v</sub>
BactiQuant™	3,08	4,10	4,22	4,08
Kimtal v 22 °C	<1	<1	<1	<1
Kimtal v 37 °C	<1	<1	<1	<1
Colilert	<1	<1	<1	<1

**Tabel 6** Test af reproducerbarhed for tæppested A1

Test	Replikat			
	E11 <sub>x</sub>	E11 <sub>y</sub>	E11 <sub>z</sub>	E11 <sub>v</sub>
BactiQuant™	24,94	24,39	23,12	19,24
Kimtal v 22 °C	1	1	1	2
Kimtal v 37 °C	<1	<1	<1	<1
Colilert	<1	<1	<1	<1

**Tabel 7** Test af reproducerbarhed for tæppested A11

For BactiQuant™ testen observeres en virkelig fin grad af reproducerbarhed for begge tæppesteder (niveauer). Det samme gælder i princippet for Kim 37 °C og Colilert testen, men den information, som kan trækkes ud af data for disse to test, er meget begrænset på grund af analyseværdier under metodernes detektionsværdier.

For tæppested A11, hvor det bakteriologiske niveau var større sammenlignet med A1, kommer resultaterne for kim 22 °C lige op over detektionsgrænsen. Fordi måltallene ligger så tæt ved detektionsgrænsen, og fordi analysetallet er et resultat af en kolonitælling og en fortyndingsrække, så bliver testens følsomhed meget lav. Det var derfor meget vanskeligt at se forskel på resultaternes nøjagtighed og på denne baggrund at udtale sig om kimtestenes (22 °C og 37 °C) reproducerbarhed.

### 6.3 Sammenligning af test med hensyn til følsomhed

Det har vist sig, at det bakteriologiske niveau på Østerbyvandværket var meget lavt, heldigvis for det vidner om en god og optimal vandbehandling. Denne situation har afstedkommet, at de undersøgte mikrobiologiske tests følsomhed bliver en meget vigtig parameter. Faren for at give et falsk positivt resultat medvirker til at underminere forbrugernes tillid til vandkvaliteten. Tilsvarende gælder for de falske negative prøver, hvor en mikrobiologisk forurening overses. Uanset udfaldet skal de test, som sammenlignes, være i stand til at give et klart og entydigt resultat.

De vandprøver, hvori der forventeligt burde kunne genfindes ekstra høj biologisk aktivitet stammede fra skyllevandssystemet (A, C og D 14<sub>a-b</sub> samt B14<sub>a</sub>). Alle analyse-resultater for skyllevandet er sammenfattet i tabel 8.

	A14 <sub>a</sub>	A14 <sub>b</sub>	B14 <sub>a</sub>	C14 <sub>a</sub>	C14 <sub>b</sub>	D14 <sub>a</sub>	D14 <sub>b</sub>
Endotoxin	0,13	0,15	0,99	-	-	-	-
BactiQuant™	3290	1981	1190	6138	1909	7277	2886
Kimtal v 22 °C	44	15	kontamineret	170	52	110	39
Kimtal v 37 °C	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Colilert	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

**Tabel 8** Test af følsomhed over for filterskyllevand (højeste bakterieniveau)

Der ses en højere bakteriologiske aktivitet i filterskyllevandet. Endotoxintesten udviser en ringe grad af korrelation med de øvrige test, måske et resultat af, at testen kun medbestemmer gramnegative bakterier. BactiQuant™ testen og kim 22 °C viser begge en forhøjet mikrobiologisk aktivitet. Netop dette resultat viser BactiQuant™ og kim 22 °C metodernes potentiale som diagnostisk værktøj.

I vand, som indeholder mange bakteriekim, fungerer 3 af testene udmærket, men hvorledes ser billedet ud på lavere niveauer, dvs. med færre bakterier i vandet. For at besvare dette spørgsmål blev analyserne for råvand, det laveste niveau, og tallene for færdigbehandlet vand, mellemste niveau, sammenlignet. Resultaterne er vist i tabel 9 og 10.

	A1	A2	B1	B2
Endotoxin	0,08	0,05	0,1	0,04
BactiQuant™	3,46	1,87	3,21	1,66
Kimtal v 22 °C	<1	<1	kontamineret	kontamineret
Kimtal v 37 °C	<1	<1	<1	<1
Colilert	<1	<1	<1	<1

**Tabel 9** Test af følsomhed på laveste niveau

	A11	A12	B11	B12
Endotoxin	1,28	0,50	0,48	0,99
BactiQuant™	79,31	13,67	28,10	12,01
Kimtal v 22 °C	17	<1	<1	kontamineret
Kimtal v 37 °C	<1	<1	<1	<1
Colilert	<1	<1	<1	<1

**Tabel 10** Test af følsomhed på mellemste niveau

På det laveste niveau, som er det uforurenede grundvand med kun meget få bakterier, viser alle test, at vandet ikke er mikrobiologisk belastet. Kun endotoxintesten og BactiQuant™ testen viser egentlige testværdier, for kimtal og colilert testen var niveauet under detektionsgrænsen. Med reference til drikkevandsbekendtgørelsen og

de kvalitetskategorier, som er opstillet for endotoxintesten og BactiQuant™ testen, var råvandet af særdeles god mikrobiologisk kvalitet.

På det mellemste niveau med lidt flere bakterier i vandet begynder der at være forskel på testresultaterne. Endotoxintesten og BactiQuant™ testen korrelerer meget fint med det forhøjede niveau og angiver samstemmende A11 som tapstedet med størst bakterieaktivitet.

Kimtal v 22 °C begynder at vågne op og angiver ligeledes A11 som tapstedet med størst bakterieaktivitet.

## **7. Sammenfatning og evaluering af testene**

### **7.1 Endotoxintesten**

Endotoxinanalyser af vandprøver kan være et fint redskab til at indikere tilstedeværelsen af gramnegative bakterier. Testen var i stand til at indikere stedet med størst mikrobiologisk aktivitet.

Endotoxintesten kan give et gradueret analyseresultat, som afspejler en gradvis stigende intensitet i bakterieantallet. I denne undersøgelse blev der i alle vandprøver målt lave koncentrationer af endotoxin. Det kan skyldes, at de kim, som påvises, var grampositive bakterier, som ikke tælles med i endotoxintesten. Hvis det er tilfældet, var det derfor forventeligt, at både BactiQuant™ testen og kimtællingerne vil vise større udslag sammenlignet med endotoxintesten.

De vandprøver, hvori der forventeligt burde genfindes endotoxinrester, stammede fra skyllevandssystemet (A14<sub>a-b</sub>, B14<sub>a</sub>), hvor der blev målt moderat kim og høje BQ-tal. I disse prøver var der store mængder af bundfald, som skulle fjernes før analysen. Varmebehandling og centrifugering blev benyttet, som er accepterede behandlinger inden for endotoxintesten. Der er således ikke en umiddelbar forklaring på de lave endotoxintal i skyllevand, som er højst uventet. Analysen må formentlig alligevel på en eller anden måde være påvirket af de store mængder af udfældede materialer, som fandtes i filterskyllevandsprøverne.

Endotoxintestens største styrke var den meget hurtige analysetid på kun 1-3 timer. En negativ ting var, at testen kræver en akkrediteret eksternt laboratorium.

### **7.2 BactiQuant™**

Resultaterne af BactiQuant™ analysen viste en god overensstemmelse mellem BQ-tallet og kimtal bestemt ved 22 °C. De steder, hvor der påvises kim, slår BactiQuant™ testen ligeledes ud.

Testens følsomhed var fin på alle koncentrationsniveauer. I filterskyllevand, hvor der blev forventet et højt indhold af bakterier, resulterede BactiQuant™ testen i kategori 3 målinger svarende til en uacceptabel vandkvalitet.

Forklaringen på de relativt lave kimtal i filterskyllevand med mange partikler er højest sandsynligt et højt indhold af bakterier immobiliseret på partiklerne. Det er velkendt, at mikroorganismer i vand for størstedelen forekommer i flager og hobe. I praksis betyder det, at det ikke er muligt at adskille flagerne i enkeltorganismer. En kolonidannende enhed kan derfor lige såvel udgå fra en stor flage med mange bakterier såvel som fra enkeltorganismer. Dette betyder, at kimtalsbestemmelser i vand vil have en tendens til at underestimere antallet af bakterier (/2/). I filterskyllevand vil denne tendens være særligt udpræget, da en stor del af bakterierne som nævnt må formodes at være immobiliseret på partikler. BactiQuant™ metoden vil således, specielt i prøver med mange partikler, måle på en større fraktion af de forekommende bakterier end kimtalsmetoden.

Reproducerbarheden for BactiQuant™ testen var meget fin. Målingerne ( $E1_{x-v}$  og  $E11_{x-v}$ ) blev udtaget som 4 ens prøver ved henholdsvis råvand (E1) og ved Afgang rentvandstank (E11). Testens reproducerbarhed kan udtrykkes ved middelværdien af de 4 målinger +/- en standardafvigelse. Resultatet ( $BQ = 3,87 \pm 0,53$ ) var et fint resultat for råvandsmålingerne ( $E1_{x-v}$ ) og resultatet ( $BQ = 22,92 \pm 2,57$ ) for rentvandsmålingerne ( $E11_{x-v}$ ) viser ligeledes en høj grad af reproducerbarhed. Usikkerheden for metoden må dog vurderes at være højere sammenlignet med endotointesten.

### 7.3 **Kim 22**

Resultaterne af kim 22 °C viste forventeligt et lavt niveau i råvand og rent vand. I foregående afsnit er givet en sandsynlig forklaring på de relativt lave niveauer i filterskyllevand, som ellers forventedes at have høje bakteriekoncentrationer.

Reproducerbarheden for kim 22 °C var meget fin. Målingerne ( $E1_{x-v}$ ) og  $E11_{x-v}$ ) blev udtaget som 4 ens prøver ved henholdsvis råvand (E1) og ved afgang rentvandstank (E11). Testens reproducerbarhed kan udtrykkes ved middelværdien af de 4 målinger +/- en standardafvigelse. Resultaterne for råvand ( $E1_{x-v}$ ) var under detektionsgrænsen, idet der var mindre end 1 kim pr. 100 ml. For rentvand ( $E11_{x-v}$ ) var kim 22 °C resultaterne kun lige over detektionsgrænsen og viste en høj grad af reproducerbarhed (kim 22 °C =  $1,25 \pm 0,25$ ).

En enkelt prøve (A10) falder dog helt ved siden af. Kimtallet var målt ved tilgangen til rentvandstanken, og målingerne efter rentvandstanken viser lave indhold (A11, A12).

Derudover er det meget bekymrende, at der for 20 % af de prøver, som blev sendt til analyse på et akkrediteret laboratorium, blev meldt tilbage, at man ikke kunne sende et analyseresultatet, idet prøverne var blevet forurenede.

### 7.4 **Kim 37**

For kimtal ved 37 °C var alle resultater under detektionsgrænsen.

### 7.5 **Colilert testen (Coliforme og E. Coli)**

Der blev ikke i nogen af de kvalitative analyser konstateret tilstedeværelse af specifikke bakterier (Coliforme, E-coli).

### 7.6 **Enterokokker**

I en enkelt prøve B14<sub>a</sub> blev der målt 2 Enterokokker/100 ml. Det samlede resultat var dog ikke overraskende, idet disse indikatorbakterier heldigvis kun sjældent forekommer i drikkevandsundersøgelser.

## 8. **Samlet konklusion**

Det var ikke muligt i den foreliggende undersøgelse at bruge resultaterne af endotoxinmålingerne til at se forskel på de anvendte mikrobiologiske hurtigtest. Endvidere var der heller ikke på det foreliggende grundlag en oplagt sammenhæng mellem kimtal og endotoxinmålingerne. Det er en mulighed, at de kim, som påvises, var grampositive bakterier, som derfor ikke tælles med af endotoxintesten. Som følge heraf vil det være forventeligt, at både BactiQuant™ testen og kimtællingerne vil udvise større udslag sammenlignet med endotoxintesten. Resultaterne for de gramnegative bakterier, coliforme og E.coli, stemmer fint overens med endotoxinresultaterne. Det samme gælder for enterokokkerne, en grampositiv stamme, som ikke detekteres af endotoxintesten.

Endotoxintesten kan ikke umiddelbart anvendes til at vurdere kimtal, idet den kun medtager gramnegative bakteriestammer. Dette behøver ikke at være en dårlig egenskab, idet langt de fleste sygdomsfremkaldende bakterier er gramnegative. Endotoxintesten har som den eneste test en akkumulerende funktion, idet den måler på alle gramnegative bakterier, som er eller har været i vandet. Det har den fordel, at selv om man ikke måler præcis der, hvor bakterietilvæksten er, men senere i systemet, vil man alligevel fange forureningen og herefter kunne arbejde sig baglæns, indtil oprindelsesstedet er fundet. Ved konventionelle kimtalsmålinger er målingen altid et øjebliksbillede, og for at fange en forurening skal der måles på rette sted og det rette tidspunkt. Endotoxintesten er dermed velegnet til opsporing i forurenings-sager, men der kan også med fordel etableres en endotoxinprofil for vandforsynin-gen, hvor normalniveauet for endotoxin strategiske steder er fastlagt gennem gentagne målinger, og hvor niveauet løbende måles for hurtigt at kunne opspore ændringer.

Den diagnostiske værdi af endotoxintesten er høj, idet testresultaterne kan leveres til vandværket 1-3 timer, efter prøven er modtaget på laboratoriet. Denne respons er stadig væsentligt hurtigere end de konventionelle kimtællinger. På baggrund af de mange fejl i kim 22°C målingerne i denne forsøgsrunde må det konkluderes, at usikkerheden og analyseusikkerheden på endotoxinanalyserne er væsentligt lavere sammenlignet med kimtalsmålingerne. Et minus ved metoden er, at den ikke kan udføres på vandværk, men kræver laboratoriefaciliteter.

Resultaterne af BactiQuant™ analysen viser en god overensstemmelse mellem BQ-tallet og kimtal bestemt ved 22 °C. Testen var let og ukompliceret at udføre på stedet og analysetiden 20-40 minutter, hvilket er et attraktivt plus.

BactiQuant™ testen kan anvendes til en indledende hurtig screening af vandets mikrobiologiske kvalitet i hele vandforsyningssystemet. Metoden vil være velegnet i en forureningssituation, hvor netop tiden er afgørende for at begrænse bakterievæksten. Den korte inkubationstid 20-40 min er her en stor fordel. Med BactiQuant™ testen er det muligt at analysere sit vandværk igennem på en formiddag og om eftermiddagen være klar til at reagere på evt. uregelmæssigheder.

Udover at være hurtig kan metoden udføres på vandværket. Prøveudtageren skal være certificeret hertil. Der er dermed ingen prøver, der skal sendes til laboratorium og håndteres på ny med de fejlkilder, det giver anledning til.

Resultaterne af kim 22 °C viste forventeligt et lavt niveau i råvand og rent vand. Kimtællinger var ikke specielt følsomme, da det var umuligt at se forskel på laveste og mellemste bakteriekoncentrationsniveau. Først på højeste niveau og i filterskyllevandet vågnede kimtællingen op til dåd.

Der blev ikke i Colilert testen konstateret tilstedeværelse af specifikke bakterier (Coliforme, E-coli) og kun en enkelt prøve med Enterokokker. Dette resultat var dog ikke overraskende, idet disse indikatorbakterier heldigvis kun sjældent forekommer i drikkevandsundersøgelser.

Det var ønskeligt, at detektionsgrænsen for Colilert testen var lidt lavere. Evt. kunne der udtages mere vand til prøverne i forhold til forskriften for analyserne. Detektionsgrænsen gør, at testene i denne forsøgsrunde ikke rigtig kan sammenlignes med de øvrige test. Generelt er et klart plus for Colilert testen, at analysetiden (18 eller 24 timer) er væsentligt nedbragt i forhold til konventionelle test for coliforme bakterier og E. Coli.

## 9. Referencer

- /1/ Miljøstyrelsen Miljøprojekt nr. 934, 2004. "Hurtigmetoder til screening for coliforme bakterier og E.coli i drikkevand".
- /2/ DS 2250 Vandundersøgelse – Prøvetagning, transport og opbevaring af prøver til mikrobiologiske undersøgelser.