

Hurtigmetoder til screening for coliforme bakterier og *E. coli* i drikkevand

Vibeke From Jeppesen
Eurofins Danmark A/S

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Indhold

INDHOLD	3
BAGGRUND	5
SUMMARY AND CONCLUSIONS	9
1 FORMÅL	11
2 MATERIALER OG METODER	13
2.1 VALGTE METODER	13
2.2 ANALYSEPRINCIPPER	13
2.3 PRØVEMATERIALE	14
2.4 FREMGANGSMÅDE	15
2.4.1 <i>Colilert®-18:</i>	15
2.4.2 <i>Colilert®:</i>	16
2.4.3 <i>Readycult®:</i>	16
2.4.4 <i>Modificeret DS 2255</i>	16
2.5 ANALYSEOMFANG	17
3 RESULTATER	19
4 DISKUSSION	23
5 KONKLUSION	27
6 LITTERATURLISTE	29

Bilag A – Analyseomfang

Baggrund

Der har i de senere år været flere sager med fund af coliforme bakterier – herunder *E. coli* - i drikkevandet i større vandforsyninger i København, Århus og Silkeborg. Disse sager har haft store og langvarige konsekvenser for hospitaler og andre forbrugere – og har været meget ressourcetrækkende for vandværkerne.

En bedre forebyggelse og håndtering af sager med forekomst af coliforme bakterier kan metodemæssigt gribes an på forskellig vis:

- 1) Hyppigere prøvetagning og dermed bedre overvågning.
- 2) Hurtigere metode, så udviklingen af vandkvaliteten kan følges tættere og med mulighed for hurtigere reaktion overfor brugerne.
- 3) Mere følsom metode og dermed lavere detektionsgrænse ved brug af større prøveløbsvolumen med henblik på at påvise koncentrationer, der er lavere end aktionsniveauet.

Der findes kommercielle hurtigmetoder uden dansk myndighedsgodkendelse på markedet. Metoderne anvendes dog i nogle tilfælde og udbydes også som ikke-akkrediterede analyser fra nogle laboratorier.

De metoder, der ønskes valideret og godkendt vil være til kvalitativ screening og vil ikke kunne anvendes til den lovbundne rutinemæssige offentlige kontrol af dansk drikkevand, men vil kunne bruges som led i kildeopsporing. Driftskontrol af drikkevand ud over det lovbundne er ikke myndighedsreguleret og metodevalget er frit.

Maltec og VWR takkes for deres deltagelse i projektet i form af at have stillet materialer (Maltec: Colilert®-systemerne; VWR: ReadyCult®) og viden til rådighed uden beregning.

Rapporten er udarbejdet af:

Vibeke From Jeppesen, Eurofins Danmark A/S
Linda Bagge, Miljøstyrelsen

Høringsgruppen for projektet har været:

Søren Lind (Københavns Energi/Vandkvalitet)
Hans-Jørgen Albrechtsen, DTU
Claus Jeppesen, Fødevareregion København
Thorlei Thomsen, DANVA
Solveg Nilsson, Foreningen af Vandværker i Danmark (FVD)

Sammenfatning og konklusioner

Med baggrund i en række langvarige sager med forurenede drikkevand har Miljøstyrelsen ønsket at kunne anvise mere simple og hurtigere metoder til kvalitativ (påvist / ikke påvist) screening for coliforme bakterier, herunder *E. coli* i drikkevand.

De afprøvede kvalitative metoder skal ikke erstatte de(n) til enhver tid af Miljøstyrelsen angivne kvantitative metode(r), men er tænkt som metoder der kan bruges ved kildeopsporing i forbindelse med en forurenings sag.

Der findes kommercielle hurtigmetoder uden dansk myndighedsgodkendelse på markedet. Det var derfor ønsket med nærværende afprøvning at vurdere metodernes egnethed til dansk drikkevand og samtidig vurdere den af Miljøstyrelsen angivne metode (DS 2255) modificeret med en lavere detektionsgrænse.

Afprøvningen omfattede 10 prøver af dansk drikkevand af varierende kvalitet. Alle prøverne blev analyseret som dobbeltbestemmelse for både coliforme bakterier og *E. coli*. Fem af prøverne blev desuden analyseret for begge parametre efter podning med *E. coli*, mens de fem andre prøver tilsvarende blev analyseret efter podning med *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* og *Citrobacter freundii* som renkulturer.

De testede hurtigmetoder gav positivt resultat i alle de naturlige prøver (100 ml, 500 ml, 1000 ml), hvor DS-metoden påviste coliforme bakterier og *E. coli*.

I enkelte tilfælde gav hurtigmetoderne positive resultater, hvor DS-metoden gav negativt resultat. Dette betyder, at hurtigmetoderne til sammenligning ikke overser en forurening.

Der var fuld overensstemmelse mellem resultaterne fra de forskellige metoder ved analyse af vandprøver podet med *E. coli*, *A. hydrophila* (non-coliform) og *K. pneumoniae* (coliform).

Derimod sås inkonsekvente resultater for prøver podet med *Citrobacter freundii*, hvilket kan have flere årsager, som f.eks. *Citrobacter's* sene laktoseforgæring, samspil med følgefloora samt det lave podeniveau. Atypiske reaktioner for *Citrobacter* er kendt i MacConkey-bouillon.

På baggrund af resultaterne vil Miljøstyrelsen tillade brug af de afprøvede alternative metoder til screening af dansk drikkevand for coliforme bakterier, herunder *E. coli*. Dog skal afsluttende negative fund med disse kvalitative metoder i en forurenings sag verificeres, hvilket vil blive nærmere præciseret af Miljøstyrelsen. Verifikation kan foretages ved fornyet analyse af vandprøven indenfor 24 timer fra prøvetagningen eller ved udtagning af en ny prøve.

De metoder, der hermed er validerede og godkendte og som vil kunne anvendes til kvalitativ screening, er angivet nedenfor. Metoderne må ikke anvendes til den rutinemæssige, lovbundne offentlige kontrol af drikkevand, men må dog indgå i kildeopsporingsarbejdet i en forurenings sag. Driftskontrol

af drikkevand ud over det lovbundne er ikke myndighedsreguleret og metodevalget er frit.

- Modifieret DS 2255 med analyse af større volumener (500 eller 1000 ml) vha. membranfiltrering, hvorved følsomheden forbedres (detektionsgrænsen sænkes) og forureninger eventuelt ville kunne observeres på et tidligere tidspunkt
- DS 2255 suppleret med direkte inkubering af et hold MacConkey-rør ved 44 °C.
- Colilert® systemerne (18 eller 24 timers)
- ReadyCULT®

Summary and conclusions

Having experienced a series of protracted incidents of polluted potable water the Danish EPA has called for more simple and rapid methods for qualitative screening (P/A) of coliform bacteria, including *E. coli* in potable water.

The tested methods are not intended to replace the quantitative method(s) approved at all times by the Danish EPA but meant to be used in connection with a specific pollution incident, with a view to tracking its source/cause.

Commercial rapid methods are available on the market which have not been approved by the Danish EPA. The intention of the present project was therefore to evaluate the suitability of the methods for Danish potable water and at the same time to evaluate a modification of the method approved by the Danish EPA (DS 2255) in terms of a lowered detection limit.

The testing included 10 samples of Danish potable water of varying quality. All samples were analysed as double determination for coliform bacteria as well as for *E. coli*. Five of the samples were furthermore analysed for both parameters after inoculation with *E. coli*, whereas the other five samples were analysed after inoculation with pure cultures of *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*.

The tested rapid methods gave positive findings for all the natural water samples (100 ml, 500 ml, 1000 ml) where the reference method detected coliforms and *E. coli*.

For a few samples the rapid methods gave positive results where the reference method showed negative findings. This means that the rapid methods do not fail to detect contaminated water.

The samples inoculated with *E. coli*, *A. hydrophila* (non-coliform) and *K. pneumoniae* (coliform) showed full agreement between the tested methods.

For samples inoculated with *Citrobacter freundii*, however, the results were inconsistent. This may be explained partly by the fact that *Citrobacter* is a slow lactose fermenter, and partly by the interference between the low concentration of coliforms and the other microorganisms in the water. Atypical reactions are known to appear for *Citrobacter* in MacConkey-broth.

On the basis of the results the Danish EPA will permit the use of the tested alternative methods for screening of Danish potable water for coliform bacteria, including *E. coli*. However, final negative findings with these qualitative methods in cases with polluted drinking water must be verified by quantitative analysis with the method approved at all times by the Danish EPA. Verification can be done on the same sample within 24 hours from sampling or by testing a new sample from the same source.

The methods which are, thus validated and approved and can be used for qualitative screening, are listed below. The methods cannot be used for the legally required routine public control of potable water, but may form part of

tracking the source in case of contamination. Apart from the statutory control, operational control of potable water is not under the auspices of the authorities, and the choice of method is free.

The methods are:

- Modified DS 2255 with analysis of greater volumes (500 or 1000 ml) by membrane filtration, at which the sensitivity is improved (lowering of the detection limit) and pollution, if any, may be observed at an earlier stage.
- DS 2255 supplemented with direct incubation of MacConkey tubes at 44°C.
- The Colilert® systems (18 or 24 hours)
- ReadyCULT®.

1 Formål

Formålet med projektet har været at skabe baggrunden for, at Miljøstyrelsen kan godkende en eller flere screeningsmetoder til kvalitativ påvisning af coliforme bakterier hhv. specifikt *E. coli*. Screeningsmetoderne skal være hurtigere og/eller mere følsomme end den hidtidige af Miljøstyrelsen angivne metode, DS 2255.

De afprøvede kvalitative metoder skal ikke erstatte de(n) til enhver tid af Miljøstyrelsen angivne kvantitative metode(r), men det er intentionen at få valideret hurtigmetoder, der kan anvendes i forureningssager til at identificere årsagen til forurening og dermed til kildeopsporing.

Som udgangspunkt for afprøvningen er valgt metoder, der:

- er beskrevet i international litteratur og har opnået internationale godkendelser hos EPA (US Environmental Protection Agency) og
- er kommercielt tilgængelige i Danmark.

Afprøvningen er begrænset til en afprøvning med dansk drikkevand af varierende kvalitet samt naturlige prøver podet med bakterier, der kan henregnes til hhv. non-coliforme bakterier, coliforme bakterier og specifikt *E. coli*.

Metoderne skal kunne anvendes af akkrediterede laboratorier samt eventuelt af driftslaboratorier på vandværkerne.

Fordelen ved at Miljøstyrelsen godkender en screeningsmetode til brug på forskellige laboratorier er, at undgå ”hvert laboratorium sin metode”, hvilket vil give risiko for en vis forvirring i fortolkning af og opfølgning på resultater.

Såfremt andre producenter, leverandører eller laboratorier ønsker at anvende en anden metode end de her angivne skal ansøgning indsendes til Miljøstyrelsen jf. den til enhver tid gældende kvalitetsbekendtgørelse (Kvalitetsbekendtgørelsen, 1997).

2 Materialer og metoder

2.1 Valgte metoder

Som kvalitative metoder (påvist/ikke påvist i 100 ml vand) er der valgt de simple, kommercielt tilgængelige metoder Colilert®-18, Colilert® og ReadyCult® overfor referencemetoden DS 2255 modificeret med direkte inkubering ved 44 °C som supplement til inkubering ved 37 °C.

Valget er baseret på kommercielle metoder, der er tilgængelige via danske leverandører og som har internationale godkendelser. Det skal bemærkes, at andre producenter / leverandører, der ønsker en godkendelse af deres metoder, kan indsende anmodning herom til Miljøstyrelsen, såfremt metoden dokumenteres at være ligeværdig eller bedre end den gældende nationale referencemetode, jf. Kvalitetsbekendtgørelsen.

De valgte kommercielle metoder er godkendte af EPA (US Environmental Protection Agency).

Med henblik på at godkende en metode med lavere detektionsgrænse – og samtidig også gerne hurtigere end referencemetoden – er undersøgt hhv. 500 ml prøve og 1000 ml prøve. Til dette formål er foretaget inkubering af membranfilter/-re fra filtrering af 500 ml hhv. 1000 ml vand. Som referencemetode hertil er anvendt inkubering af filtre i 50 ml enkeltstyrke MacConkey-bouillon ved 37 °C samt direkte ved 44 °C. Det skal bemærkes, at en direkte inkubering ved 44 °C er en modifikation fra DS 2255, hvor der er foreskrevet indledende inkubering ved 37 °C. Med direkte inkubering ved 44 °C kan der være en risiko for at stressede *E. coli* ikke kan vokse på grund af kombinationen af selektivt substrat og inkubation tæt på bakteriens maksimumtemperatur.

2.2 Analyseprincipper

For såvel Colilert®-systemerne som ReadyCULT® er der tale om de samme enzymatisk baserede analyseteknikker.

Coliforme bakterier producerer enzymet β -galactosidase og kan derved omsætte substratet o-nitrophenyl (såkaldt ONPG positive) og substratet 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (såkaldt X-Gal positive).

Ved omsætning af det farveløse o-nitrophenyl dannes den gule forbindelse o-nitrophenol. ONPG positive bakterier kan således påvises ved gulfarvning.

Ved omsætning af det farveløse 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (chromogent substrat) dannes en blå-grøn forbindelse. X-Gal positive bakterier kan således påvises ved blå-grøn farvning.

E. coli producerer – med få undtagelser - desuden enzymet β -glucuronidase og kan derved omsætte 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (såkaldt MUG positive).

Ved omsætning af det farveløse 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide dannes en fluorescerende forbindelse 4-methyl-umbelliferone. MUG positive bakterier kan således påvises ved fluorescens under UV-lys (365 – 366 nm).

I Colilert®-systemerne er ONPG og MUG de væsentligste kulstof-kilder, der derfor vil blive omsat, såfremt der er coliforme bakterier hhv. *E. coli* tilstede i prøven. Positive prøver bliver således gule hhv. fluorescerende.

I ReadyCULT® er X-Gal og MUG tilsvarende de væsentligste kulstof-kilder. Positive prøver bliver således blå-grønne hhv. fluorescerende. ReadyCULT® foreskriver, at fluorescerende prøver skal verificeres yderligere ved test for indolproduktion (positiv hos *E. coli*), hvilket gøres ved tilsætning af Kovacs' reagens og påvisning af en rødfarvning.

2.3 Prøvemateriale

Der er udtaget vandprøver fra ledningsnettet i henhold til DS 2250. Dog er prøverne udtaget i sterile 5 liter flasker og transporteret til laboratoriet uden køl, men analyseret indenfor 24 timer fra prøvetagning. Det er vurderet, at køl under transport ikke er nødvendig til nærværende undersøgelse. Følgefloraen kan evt. blive lidt kraftigere, hvilket da blot er at betragte som en "worst case" situation i relation til at påvise coliforme bakterier og *E. coli*. På grund af de store volumener, der er nødvendige for hver prøve (24 – 27,5 liter), er 5 liters flaskerne at betragte som delprøver, der vurderes at have samme homogenitet som én stor prøve.

Prøverne er udtaget fordelt over landet som angivet i tabel 1. Af hensyn til omfanget af undersøgelsen blev det valgt, at kun halvdelen af prøverne blev udsat for analyseprogrammet angivet i tabel 1 under prøvenr. 1 - 5 og resten af prøverne for analyseprogrammet nævnt i tabel 1 vedrørende prøve 6 - 10.

For podning af prøve 1 – 5 samt for alle positive kontroller er anvendt *E. coli* (ATCC 8739 i form af Quanti-Cult® fra Oxoid) i niveauet 10 – 100 cfu/prøve (dvs. pr. 100 ml, 500 ml eller 1000 ml vand).

For podning af prøve 6 – 10 er anvendt *Aeromonas hydrophila* (CCUG 25940), *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (CCUG 28450) og *Citrobacter freundii* (CCUG 418 T). Der blev tilstræbt et podeniveau på 10 – 100 cfu/prøve, dog gerne i den lave ende i lighed med naturlige prøver (inokulum: 0,1 ml af en passende fortynding i salt-pepton-vand i prøver á 100 ml eller 1000 ml). Niveauet kunne dog ikke holdes i alle prøver (se "Resultater"). *Aeromonas* er valgt som non-coliform bakterie, *Klebsiella* som coliform bakterie og *Citrobacter* som en "grænseorganisme", idet den er sent laktoseforgærende og dermed typisk giver sene reaktion ved undersøgelse for coliforme bakterier i DS 2255.

Som negative kontroller er anvendt sterilt (autoklaveret) drikkevand.

Tabel 1: Oversigt over vandprøver og prøveprogram.

Prøvenr.	Udtagningssted	Vandforsyning	Analyseprogram
1	Frydendalsvej 30, 1809 Frb. C	Frederiksberg Forsyning	Analyseret 100, 500 og 1000 ml. Upodete prøver samt prøver podet med <i>E. coli</i> .
2	Holsbjergvej 42, 2620 Albertslund	Albertslund Kommune, Vandforsyningen	
3	Robert Holms Vej 3, 8700 Horsens	Horsens Kommune, Vandforsyningen	
4	Midtsjælland	Privat boring A	
5	Midtsjælland	Privat boring B	
6	Boghvedevej 34, 8900 Randers	Energi Randers Vand	Analyseret 100 ml og 1000 ml. Upodete prøver samt prøver podet med enten <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> eller <i>Citrobacter freundii</i> .
7	Klostermarken 10, 8800 Viborg	Viborg Vand A/S	
8	Agern Allé 11, 2970 Hørsholm	Hørsholm Kommunale Vandforsyning	
9	Lille Tornbjerg Vej 24a, 5220 Odense SØ	Odense Vandselskab	
10	Ollerupvej 8, 9220 Aalborg Ø	Aalborg Kommunes Vandforsyning	

2.4 Fremgangsmåde

Testkulturerne blev opformeret i BHI-bouillon (non-selektiv næringsbouillon, Difco 0037) ved 37 °C natten over. Til *E. coli* blev dog anvendt QuantiCult® som nævnt tidligere.

Podeniveauer blev bestemt ved udsæd af inokulum på TSA (non-selektiv næringsagar, Merck 1.05458), 37 °C i 24 og 48 timer. For bestemmelse af *E. coli* blev suppleret med tælling på RVG (selektiv agar til bestemmelse af coliforme bakterier, Oxoid CM 107).

Nedenfor er i afsnittene 2.4.1 – 2.4.4 angivet de analyseforskrifter, der er anvendt under arbejdet og som vil være gældende ved brug af metoderne.

2.4.1 Colilert®-18:

Udtag 100 ml vand i steril beholder, der ikke må være fluorescerende i sig selv (her er anvendt éngangsbeholdere fra Colilert®). I de tilfælde, hvor prøvemængden skal være 500 ml eller 1000 ml filtreres vandet først (0,45 µm Cellulose Nitrate Filter) og filtrerne tilsættes til 100 ml sterilt vand i beholderen.

?

Tilsæt en portion Colilert®-18 pulver (fra én blister) til vandet. Ryst beholderen til pulveret er opløst.

?

For podede prøver tilsættes relevant bakteriekultur.

?

Opvarm prøven til 33 - 38 °C ved placering i 35 °C-vandbad i 20 minutter eller i 44 °C-vandbad i 7 - 10 minutter.

?

Inkubér ved 35.0 ± 0.5 °C til i alt 18 - 22 timer.

?

Coliforme: Gulfarvning i samme grad som standarden eller kraftigere.

E. coli: Positiv for coliform reaktionen og fluorescerende ved 365 nm i samme grad som standarden eller kraftigere.

Positive fund før 18 timer og negative fund efter 22 timer er også er valide.

Vand indeholdende klor kan give et blåt lys ved tilsætning af pulveret. Såfremt en sådan blåfarvning ses kan analysen ikke anvendes.

2.4.2 Colilert®:

Udtag 100 ml vand i steril beholder, der ikke må være fluorescerende i sig selv (her er anvendt éngangsbeholdere fra Colilert®). I de tilfælde, hvor prøvemængden skal være 500 ml eller 1000 ml filtreres vandet først (0,45 µm Cellulose Nitrate Filter) og filtrerne tilsættes til 100 ml sterilt vand i beholderen.

?

Tilsæt Colilert® pulver fra én blister til vandet. Ryst beholderen til pulveret er opløst.

?

For podede prøver tilsættes relevant bakteriekultur.

?

Inkubér ved 35.0 ± 0.5 °C i 24 timer.

?

Coliforme: Gulfarvning i samme grad som standarden eller kraftigere.

E. coli: Positiv for coliform reaktionen og fluorescerende ved 365 nm i samme grad som standarden eller kraftigere.

Positive fund før 24 timer og negative fund efter 24 timer er også valide.

Vand indeholdende klor kan give et blåt lys ved tilsætning af pulveret. Såfremt en sådan blåfarvning ses kan analysen ikke anvendes.

2.4.3 ReadyCult®:

Udtag 100 ml vand i steril beholder (100 – 250 ml beholder, der ikke må være fluorescerende i sig selv). I de tilfælde, hvor prøvemængden skal være 500 ml eller 1000 ml filtreres vandet først (0,45 µm Cellulose Nitrate Filter) og filtrerne tilsættes til 100 ml sterilt vand i beholderen.

?

Tilsæt ReadyCULT® pulver fra én blister til vandet. Ryst beholderen til pulveret er opløst.

?

For podede prøver tilsættes relevant bakteriekultur.

?

Inkubér ved 35 - 37 °C i 18 – 24 timer.

?

Coliforme: Ethvert farveomslag til blå-grøn uanset, at det kun ses i dele af boullonen. Negative prøver forbliver uændrede, dvs. svagt gule.

E. coli: Lys blå fluorescens i UV-lys. Positive skal konfirmeres ved tilsætning af Kovacs' reagens.

?

Tilsætning af 2.5 ml Kovacs' reagens til evt. fluorescerende prøver, hvorefter en rød farvning bekræfter indoldning.

2.4.4 Modificeret DS 2255

Udtag 100 ml vand og fordel i 2 x 50 ml dobbeltstyrke MacConkey bouillon med Durham-rør (jf DS 2255)

eller

Membranfiltrér (0,45 µm Cellulose Nitrate Filter) 500 ml eller 1000 ml og placér filter/-re i 50 ml enkeltstyrke MacConkey bouillon med Durham-rør (jf DS 2255).

?

For podede prøver tilsættes relevant bakteriekultur.

?

Inkubér ved 37 °C (luftinkubator) eller 44 °C (vandbad) i 24 hhv. 48 timer.

?

Coliforme: Luft i Durham-rør kombineret med enhver grad af gulfarvning af boullonen ved 37 °C som beskrevet i DS 2255.

E. coli: Luft i Durham-rør kombineret med enhver grad af gulfarvning af boullonen ved 44 °C. Positive skal konfirmeres ved test for indolproduktion (se næste trin).

?

44 °C prøver med luft og gulfarvning subkultiveres i tryptonvand og testes efter endt inkubering ved tilsætning af Kovacs' reagens, hvorefter en rødfarvning bekræfter indoldannelse. Dette trin foretages i henhold til DS 2255.

2.5 Analyseomfang

For alle ikke-podede prøver er foretaget dobbeltbestemmelse, mens alle podede prøver er analyseret som enkeltbestemmelser.

Analyseomfanget er mere detaljeret beskrevet i bilag A.

3 Resultater

På nær enkelte undtagelser viste alle dobbeltbestemmelser overensstemmende resultater. Resultaterne af dobbeltbestemmelserne er derfor angivet som ét samlet resultat af hensyn til overblikket. Tilfældene med forskelligt resultat i de to bestemmelser er angivet. Resultaterne er sammenfattet i tabel 2 - 6.

Alle positive og negative kontroller reagerede som forventet.

Tabel 2: Resultater for naturlige drikkevandsprøver. For positive prøver er prøvenummer angivet i parentes. Prøve 3 blev fundet positiv for coliforme bakterier, men ikke for *E. coli*. Prøve 4 og 5 blev fundet positive for såvel coliforme bakterier som *E. coli*.

Volumen	Mod. DS 2255, 37 °C	Mod. DS 2255, 44 °C	Colilert 18	Colilert	Readycult
100 ml	8 negative 2 positive (4,5)	8 negative 2 positive (4,5)	7 negative 2 positive (4,5) 1 neg./pos. ^{a)} (3 ^{b)})	7 negative 3 positive (3 ^{b)} ,4,5)	7 negative 3 positive (3 ^{b)} ,4,5)
500 ml	3 negative 2 positive (4,5)	3 negative 2 positive (4,5)	2 negative 2 positive (4,5) 1 neg./pos. ^{a)} (3 ^{b)})	3 negative 2 positive (4,5)	2 negative 3 positive (3 ^{b)} ,4,5)
1000 ml	8 negative 2 positive (4,5)	8 negative 2 positive (4,5)	7 negative 3 positive (3 ^{b)} ,4,5)	7 negative 3 positive (3 ^{b)} ,4,5)	8 negative 2 positive (4,5)

a) Forskellige resultater i dobbeltbestemmelsen.

b) Prøve 3 fundet positiv for coliforme, men ikke for *E. coli*.

Samlet viser resultaterne af de naturlige drikkevandsprøver i tabel 2, at der uanset prøvevolumen (100 ml, 500 ml eller 1000 ml) er fuld overensstemmelse mellem alle metoderne for prøverne 1 – 2 og 4 – 10, hvor prøve 4 og 5 findes positive for både coliforme bakterier og *E. coli*, mens øvrige prøver findes negative.

Prøve 3 findes i varierende grad positiv med de kommercielle metoder, men ikke med den modificerede DS 2255.

Tabel 3: Resultater for prøver podet med *E. coli*. Podeniveau: 10 – 100 (ca. 30) cfu pr. prøve. Tallene angiver % positive prøver (n = 5) for hhv. coliforme bakterier og *E. coli*.

Volumen	Positive for	Mod. DS 2255 37 °C	Mod. DS 2255 44 °C	Colilert 18	Colilert	Readycult
100 ml	Coliforme	100%		100%	100%	100%
	<i>E. coli</i>		100%	100%	100%	100%
500 ml	Coliforme	100%		100%	100%	100%
	<i>E. coli</i>		100%	100%	100%	100%
1000 ml	Coliforme	100%		100%	100%	100%
	<i>E. coli</i>		100%	100%	100%	100%

Resultaterne i tabel 3 viser, at ved podning af naturlige prøver med *E. coli* i niveauet 10 – 100 cfu kan *E. coli* påvises med alle metoder uanset prøvevolumen.

Tabel 4: Resultater for prøver podet med *A. hydrophila* (non-coliform). Podeniveau: ca. 1 – 80 cfu pr. prøve. Tallene angiver % positive prøver (n = 5) for hhv. coliforme bakterier og *E. coli*.

Volumen	Positive for	Mod. DS 2255 37 °C	Mod. DS 2255 44 °C	Colilert 18	Colilert	Readycult
100 ml	Coliforme	0%		0%	0%	0%
	<i>E. coli</i>		0%	0%	0%	0%
1000 ml	Coliforme	0%		0%	0%	0%
	<i>E. coli</i>		0%	0%	0%	0%

Resultaterne i tabel 4 viser, at der ved podning af naturlige prøver med *A. hydrophila* ikke påvises coliforme bakterier og dermed heller ikke *E. coli* i nogen af prøverne.

Podeniveauet viste sig at være lavere end beregnet i nogle af prøverne og svingede fra ca. 1 til 80 cfu pr. prøve med:

Ca. 1 cfu i prøve 7 og 9, 1 – 10 cfu i prøve 8, 28 cfu i prøve 10 og 80 cfu i prøve 6.

For de helt lave podeniveauer på ca. 1 cfu er der pga. den statistiske fordeling af organismer i fortyndingen en risiko for, at der reelt ikke er tilsat bakterier til prøven, men da der selv ved tilsætning af 28 – 80 cfu ikke ses positiv reaktion i prøverne konkluderes det, at *A. hydrophila* ikke detekteres som coliforme bakterier med de afprøvede metoder.

Tabel 5: Resultater for prøver podet med *Klebsiella pneumoniae* (coliform). Podeniveau: ca. 3 – 20 cfu pr. prøve. Tallene angiver % positive prøver (n = 5) for hhv. coliforme bakterier og *E. coli*.

Volumen	Positive for	Mod. DS 2255 37 °C	Mod. DS 2255 44 °C	Colilert 18	Colilert	Readycult
100 ml	Coliforme	100%		100%	100%	100%
	<i>E. coli</i>		0% ^{a)}	0%	0%	0%
1000 ml	Coliforme	100%		100%	100%	100%
	<i>E. coli</i>		0% ^{a)}	0%	0%	0%

a) Rørene viste farveomslag, men var negative for indolproduktion ved 44 °C.

Podeniveauet viste sig at være lavere end beregnet i nogle af prøverne og svingede fra ca. 3 – 20 cfu pr. prøve med:

3 cfu i prøve 6, 6 – 7 cfu i prøverne 7 –9 og 20 cfu i prøve 10.

I lighed med podeniveauerne for *A. hydrophila* kan der med de lave podeniveauer på ca. 3 cfu være en risiko for, at der reelt ikke er blevet tilsat bakterier til prøverne, men det kan konstateres, at alle prøver reagerer positivt og således har indeholdt *Klebsiella*.

Tabel 6: Resultater for prøver podet med *Citrobacter freundii* (sent laktoseforgærende). Podeniveau: 1 – 60 cfu pr. prøve. For positive prøver er prøvenummer angivet i parentes. Tallene angiver % positive prøver (n = 5) for hhv. coliforme bakterier og *E. coli*.

Volumen	Positive for	Mod. DS 2255 37 °C	Mod. DS 2255 44 °C	Colilert 18	Colilert	Readycult
100 ml	Coliforme	40% (7,8)		60% (8,9,10)	40% (9,10)	80% (7,8,9,10)
	<i>E. coli</i>		0%	0%	0%	0%
1000 ml	Coliforme	100% (6,7,8,9,10)		100% (6,7,8,9,10)	60% (7,9,10)	80% (8,9,10)
	<i>E. coli</i>		0%	0%	0%	0%

Resultaterne i tabel 6 viser varierende fund afhængig af den anvendte metode. For prøverne med 100 ml vandprøve findes prøve 9 og 10 positive med alle de tre kommercielle metoder. Prøve 7 og 8 findes positive med den modificerede DS 2255 ved 37 °C samt i Readycult og for prøve 8 også i Colilert-18.

For prøverne med 1000 ml vandprøve – og dermed større mængde ledsageflora – findes prøve 9 og 10 positiv for coliforme bakterier med alle metoderne. For prøverne 6, 7 og 8 findes varierende grad af positive fund.

Podeniveauet viste sig også her at være lavere end beregnet i nogle af prøverne og svingede fra ca. 1 – 60 cfu pr. prøve med:

Ca. 1 cfu i prøve 7 og 9, 3 cfu i prøve 6, 19 cfu i prøve 10 og ca. 30 (4 – 60) cfu i prøve 8.

I lighed med podeniveauerne nævnt for *A. hydrophila* og *Klebsiella* kan der med de lave podeniveauer på ca. 1 - 3 cfu være en risiko for, at der reelt ikke er blevet tilsat bakterier til prøverne.

Det kan dog konstateres, at prøve 9 og 10 med hhv. ca. 1 og ca. 19 cfu reagerer positivt for alle de tre kommercielle kits uanset 100 ml eller 1000 ml vandprøve. Der er dog ikke systematik i resultaterne i forhold til podeniveauerne og indenfor de enkelte metoder. Muligvis er der et samspil mellem følgefloraen og podningen, så der i nogle prøver totalt nås et tilstrækkeligt niveau til at give positiv reaktion.

4 Diskussion

Analyserne af de naturlige prøver viste, at to af de ti prøver (nr. 4 og 5) indeholdt *E. coli*, hvilket blev påvist med samtlige metoder og uanset prøvevolumen og dermed mængde af følgeflora. Begge de positive prøver var udtaget fra private boringer.

Syv af de resterende otte prøver blev fundet negative i alle analyser, mens én prøve (nr. 3) blev fundet positiv med de tre kommercielle metoder – men ikke i den modificerede DS 2255 - ved analyse af 100 ml vand. Disse resultater tyder på tilstedeværelse af bakterier, der ved påvisning af β -galactosidase findes positive, men som ikke er lactoseforgærende med luftproduktion. Der er således tale om to forskellige definitioner af coliforme bakterier i de anvendte metoder – om end de ofte giver ens resultat - i lighed med hvad Schets et al. (2002) beskriver. Alternativt kan forklaringen være, at MacConkey-bouillon virker mere selektivt på coliforme bakterier end substraterne i de kommercielle kits.

For prøve 3 er påvisningen i prøver med 500 ml hhv. 1000 ml vandprøve lidt svingende, hvilket kan skyldes påvirkning fra følgefloraen og dermed en uforudsigelig balance mellem positiv organisme og følgeflora.

Der er ikke ved analyse af de naturlige prøver i mængder på 500 ml vand og 1000 ml vand fundet flere positive prøver end ved analyse med 100 ml vand, hvilket alene kan skyldes, at der ikke har været coliforme bakterier tilstede – selv i de større volumener.

En vurdering af, hvorvidt den øgede mængde følgeflora som resultat af øget prøvevolumen vil kunne forstyrre detektionen af coliforme bakterier, herunder *E. coli*, viser at de øgede volumener ikke i nogen tilfælde har ført til reduceret påvisning. Tværtimod ses i tabel 6 for *Citrobacter*, at der generelt påvises lidt flere positive prøver i 1000 ml prøverne i forhold til i 100 ml prøverne. Dette forhold kan enten forklares ved *Citrobacters* status som "grænseorganisme" i forhold til coliforme bakterier (da den er sent laktoseforgærende), de svingende podeniveauer eller det forhold, at der ved en kombination af øget volumen og podning nås en detektionsgrænse, der ikke blev opnået med kun 100 ml vandprøve.

Fremgangsmåden med direkte inkubering af MacConkey-bouillon ved 44 °C er ikke acceptabel i forhold til DS 2255, da risikoen for at hæmme eventuelt stressede *E. coli* med den samtidige anvendelse af selektivt substrat og inkubering ved maksimal (ikke optimal) temperatur. Den direkte inkubering ved 44 °C har ikke påvirket påvisningen af *E. coli* i negativ retning i nærværende undersøgelse (se tabel 2 og 3), men talmaterialet er for småt til at drage mere generelle konklusioner. En direkte inkubering ved 44 °C parallelt med inkubering ved 37 °C vil dog kunne spare samlet inkuberingstid, der kan blive på under ét døgn for de hurtigst voksende *E. coli*. Fremgangsmåden kan anvendes supplerende, såfremt man holder sig for øje, at positive prøver er positive, hvorimod negative prøver kan være falsk negative og skal afvente 37 °C-resultatet og eventuel subkultivering herfra.

Schets et al. (2002) beskriver en sammenligning af den angivne metode i EU's drikkevandsdirektiv (Lactose TTC agar, ISO 9308-1) med en række andre metoder, herunder den kvantitative Colilert®-18. Schets et al. konkluderer, at Colilert-18 er et anvendeligt alternativ til påvisning af coliforme bakterier – dog påvises flere coliforme bakterier i form af et bredere spektrum af coliforme. Schets et al. konkluderer derimod, at Colilert-18 ikke er egnet til *E. coli* idet metoden påviser færre *E. coli* og i nogle tilfælde (11% af prøverne) er der tale om falsk negative prøver. Problemet her kan dog være, at definitionerne af *E. coli* ikke er identiske i metoderne, idet der synes at være en risiko for, at visse indolpositive regnes som *E. coli* i EU-metoden uden det er kendt, om de forgærer lactose med luftproduktion ved 44 °C. Vurderet ud fra de tre deltagende laboratoriers fund synes Colilert-18 dog kun at give lave gennemsnitlige fund på det ene af de tre laboratorier. Endelig er en vigtig konklusion hos Schets et al., at EU referencemetoden ikke findes optimal, da den mangler selektivitet og *E. coli* derved kan overvokses af ledsageflora.

Med et tilstrækkeligt antal prøver, vil der altid kunne påvises forskelle i resultater ved brug af forskellige bakteriologiske metoder/principper fordi følgeflora og stress-niveau af de efterspurgte bakterier varierer og i forskellig grad er påvirkelige af metodernes selektive og indikative principper.

Definitionen på coliforme bakterier og gruppens afgrænsning har ofte været drøftet – senest i forbindelse med problemer med DS 2255 (Jeppesen & Bagge, 2002) og fx organismer som *Aeromonas hydrophila* (non-coliforme) og *Citrobacter* (sent lactoseforgærende) har givet anledning til afgrænsningsproblemer.

For mikrobiologiske metoder vil resultatet i en vis udstrækning være metodeafhængigt og for en gruppe af bakterier som de coliforme er det næppe sandsynligt at finde metoder, der er fuldt ligeværdige, idet forskelle i definitioner, i forekomst af grænseorganismer – som nævnt i afsnittet ovenfor – samt forskelle i ledsageflora vil påvirke resultaterne.

Set i forhold til den overordnede problematik, der drejer sig om rent drikkevand contra forurenede dansk drikkevand, hurtig reaktionsevne og kildeopsporing i forbindelse med forureningssager, vurderes det at være af stor værdi, at kunne anvende hurtigere metoder. De afprøvede, hurtige, kommercielle metoder reagerer ikke positivt på en række almindelige, rene drikkevandsprøver svarende til blindprøver (prøverne 1 – 2 og 6 – 10). Når der derfor ses positive reaktioner i disse metoder må det således ses som udtryk for atypiske fund i det danske drikkevand.

De afprøvede kommercielle metoder er principielt ens, idet de er baseret på detektion af de samme enzymsystemer, som nærmere beskrevet i afsnit 2.2. Der er en række (mindre) forskelle mellem de afprøvede kommercielle metoder i form af: inkuberingstid, behov for verifikation, tydelighed i aflæsningen, pris mm.

Der findes nogle få non-coliforme, der kan omsætte MUG og dermed reagere som coliforme bakterier med de testede metodeprincipper. Jf forhandlerne skulle disse bakterier dog være undertrykt af de selektive principper i testene. Det bemærkes, at metoderne ikke påviser MUG-negative *E. coli* til forskel fra, hvad angives for Colitag-metoden®, der forhandles fra Holland (ikke afprøvet i nærværende undersøgelse). På baggrund af publicerede

metodesammenligninger vurderes det dog, at MUG-negative *E. coli* ikke har nogen signifikant betydning for resultaterne.

I den udstrækning metoderne anvendes af ikke-trænede personer, er det vigtigt at være meget opmærksom på risikoen for falsk positive fund pga. aflæsningerne såvel som krydsforureninger. Selv helt lavgradige forureninger af vandprøven under udførelse af analysen fx pga. berøring af låg eller flaskemunding med hænderne eller pga. snavsede omgivelser kan resultere i falsk positive fund og dermed mistanke om en større forurening af drikkevandet.

Afprøvningen viste, at man med anvendelse af et større volumen vandprøve kan øge følsomheden/sænke detektionsgrænsen og dermed forbedre bestemmelsen af coliforme bakterier og *E. coli* i dansk drikkevand, idet følgefloraen fra det større volumen ikke forstyrrer detektionen. Der kan naturligvis være tale om vandprøver, der er så kraftigt forurenede, at følgefloraen kan være et problem, men i de tilfælde må det antages, at kimalt 22 °C og/eller kimalt 37 °C vil være så høje, at det i sig selv vil føre til en opfølgende reaktion.

Med anvendelse af metoder med lavere detektionsgrænse som led i vandforsyningernes egen driftskontrol kan vandforsyningerne få oplysninger om, at vandet indeholder organismer, der reelt "ikke må påvises" (fx påvisning af coliforme i 1000 ml vand, men ikke i de foreskrevne 100 ml – jf. Drikkevandsbekendtgørelsen). Derfor er Miljøstyrelsen i gang med at revurdere holdningen til positive fund af coliforme bakterier, hvorimod fund af *E. coli* fortsat skal betragtes med samme alvor som i dag på grund af sin tætte forbindelse til fækal forurening (Bagge, 2004).

5 Konklusion

Den væsentligste årsag til at nærværende undersøgelse blev iværksat, var et behov for metoder til hurtigere og/eller forbedret påvisning af coliforme bakterier og *E. coli* i dansk drikkevand – såvel ved kildeopsporing som ved overvågning.

Den gældende foreskrevne metode DS 2255 blev i 2001 revideret for at øge ensartetheden i udførelse af metoden, men metoden må stadig betegnes som relativt omstændig (MPN) og med fortsatte diskussioner af korrekt aflæsning.

I nærværende undersøgelse blev der afprøvet en modifikation af den gældende danske referencemetode (DS 2255) samt tre forskellige kommercielle analysemetoder.

De testede hurtigmetoder gav positivt resultat i alle de naturlige prøver (100 ml, 500 ml, 1000 ml), hvor DS-metoden påviste coliforme og *E. coli*.

I enkelte tilfælde gav hurtigmetoderne positive resultater for coliforme bakterier, hvor DS-metoden gav negativt resultat. Dette betyder, at hurtigmetoderne ikke overser en forurening.

Der var fuld overensstemmelse mellem resultaterne fra de forskellige metoder ved analyse af vandprøver podet med *E. coli*, *A. hydrophila* (non-coliform) og *K. pneumoniae* (coliform).

Derimod ses inkonsekvente resultater for prøver podet med *Citrobacter freundii*, hvilket kan have flere årsager, som *Citrobacter*'s sene laktoseforgæring, samspil med følgefloora samt det lave podeniveau. Atypiske reaktioner for *Citrobacter* er kendt i MacConkey-bouillon.

De testede metoder bygger på forskellige detektionsprincipper og definitioner:

- DS 2255 og modifikationer heraf påviser coliforme bakterier som bakterier, der forgærer lactose under produktion af luft. *E. coli* påvises tilsvarende som de coliforme bakterier, der også ved 44 °C er i stand til at forgære lactose under produktion af luft og samtidig danne indol fra tryptofan.
- De kommercielle hurtigmetoder er baseret på detektion af enzymsystemer, der for coliforme bakteriers vedkommende er β -galactosidase og for *E. coli* er β -glucuronidase evt. kombineret med påvisning af indol.

For mikrobiologiske metoder vil resultatet i en vis udstrækning afhænge af metoden, idet der udover selve forskellene i detektionsprincipper vil være forhold som følgefloora og bakteriernes fysiologiske status, der i varierende grad vil påvirkes af metodernes selektive og indikative principper.

Resultaterne viste, at der ved analyse af normalt dansk drikkevand ikke blev observeret positive reaktioner i nogen af metoderne og det må derfor

konkluderes, at enhver positiv reaktion vil være udtryk for atypiske fund i dansk drikkevand og således give anledning til én eller anden form for opfølgning.

På baggrund af resultaterne vil Miljøstyrelsen tillade brug af de afprøvede metoder til kildeopsporing i forbindelse med forureningssager i dansk drikkevand. Dog skal afsluttende negative fund med disse kvalitative metoder i en forureningssag verificeres, hvilket vil blive nærmere præciseret af Miljøstyrelsen. Verifikation kan foretages ved fornyet analyse af vandprøven indenfor 24 timer fra prøvetagningen eller ved udtagning af en ny prøve.

De metoder, der hermed er validerede og godkendte og vil kunne anvendes til kvalitativ screening er angivet nedenfor. Metoderne må ikke anvendes til den rutinemæssige, lovbundne offentlige kontrol af drikkevand, men må dog indgå i kildeopsporingsarbejdet i en forureningssag. Driftskontrol af drikkevand ud over det lovbundne er ikke myndighedsreguleret og metodevalget er frit.

- Modifieret DS 2255 med analyse af større volumener (500 eller 1000 ml) vha. membranfiltrering, hvorved følsomheden forbedres (detektionsgrænsen sænkes) og forureninger eventuelt ville kunne observeres på et tidligere tidspunkt
- DS 2255 suppleret med direkte inkubering af et hold MacConkey-rør ved 44 °C.
- Colilert® systemerne (18 eller 24 timers)
- ReadyCULT®.

Hertil kommer, at overvågning af den hygiejniske standard af dansk drikkevand altid kan forbedres ved hyppigere prøvetagning som led i vandforsyningernes almindelige driftskontrol.

6 Litteraturliste

Bagge L (2004) Håndbog ved mikrobiologiske forureninger af drikkevand (kogevejledning). Linda Bagge, Miljøstyrelsen.

Drikkevandsbekendtgørelsen (2001) Miljøstyrelsens bekendtgørelse nr. 871 af 21/9/2001 om vandkvalitet og tilsyn med vandforsyningsanlæg.

DS 2250 (1983) Vandundersøgelse – Prøvetagning, transport og opbevaring af prøver til mikrobiologiske undersøgelser. Dansk Standard.

DS 2255 (2001, 2. udg.) Vandundersøgelse – Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier – Fortyndingsmetoden (MPN-metoden). Dansk Standard.

Jeppesen VF & Bagge L (2002) Var der colibakterier i vandet – eller var der noget andet? Dansk Vand, **8**, oktober, 383 – 384.

Kvalitetsbekendtgørelsen (1997) Bekendtgørelse nr. 637 af 30. juni 1997 om kvalitetskrav til miljømålinger udført af akkrediterede laboratorier, certificerede personer m.v. Miljø- og Energiministeriet.

Schets FM, Nobel PJ, Strating S, Mooijman KA, Engels GB & Brouwer A (2002) EU Drinking Water Directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* compared with alternative methods. Letters in Applied Microbiology, **34**, 227 – 231.

Analyseomfang

I nærværende bilag findes en detaljeret beskrivelse af fremgangsmåden ved afprøvningen:

Mellem hver testtrin er der foretaget 10 dobbeltvendinger af delprøverne (5 liters flaskerne).

Prøve 1 – 5:

Der er analyseret 5 prøver (nr. 1 – 5) – alle som dobbeltbestemmelser med nedenstående metoder.

For alle metoderne køres desuden parallelt med podning af *E. coli* (10 – 100 cfu pr. prøve) fra QuantiCult som enkeltbestemmelse.

Der laves således 3 ”ophældninger” af hver prøve – heraf podes den ene ”ophældning” med *E. coli*.

- 100 ml prøve fordelt i 2 x 50 ml dobbeltstyrke MacConkey-bouillon. 37 °C og 44 °C. **Ophæld 12 dobbeltstyrkerør. Pod 2 rør til 37 °C og 2 rør til 44 °C med *E. coli*. De resterende 8 rør fordeles med 4 (= dobbeltbestemmelse af 100 ml vand) ved hver temperatur.**
- 100 ml prøve i Colilert®-18, Colilert® hhv. Readycult®. **Ophæld 3 flasker for hver kit, dvs. 9 flasker i alt (6 Colilert-éngangsflasker + 3 Blue-cap flasker til Readycult). Én flaske med hvert kit podes med *E. coli*.**
- Filter/-re fra 500 ml vand i 50 ml enkeltstyrke MacConkey-bouillon. 37 °C og 44 °C. **Lav 6 membranfiltreringer. Kom ét filter i hvert af 6 enkeltstyrkerør. Pod 2 af rørene med *E. coli* – ét til 37 °C og ét til 44 °C. Inkubér de resterende 4 rør med 2 ved hver temperatur.**
- Filter/-re fra 500 ml vand i 100 ml sterilt drikkevand i de tre kommercielle systemer. **Lav 9 membranfiltreringer. Kom ét filter i hver af 6 Colilert flasker med 100 ml sterilt drikkevand og ét filter i hver af 3 Blue-cap flasker med 100 ml sterilt drikkevand. Én flaske med hvert kit podes med *E. coli*.**
- Filter/-re fra 1000 ml vand i 50 ml enkeltstyrke MacConkey-bouillon. 37 °C og 44 °C. **Lav 6 membranfiltreringer. Kom ét filter i hvert af 6 enkeltstyrkerør. Pod 2 af rørene med *E. coli* – ét til 37 °C og ét til 44 °C. Inkubér de resterende 4 rør med 2 ved hver temperatur.**
- Filter/-re fra 1000 ml vand i 100 ml sterilt drikkevand i de tre kommercielle systemer. **Lav 9 membranfiltreringer. Kom ét filter i hver af 6 Colilert flasker med 100 ml sterilt drikkevand og ét filter i hver af 3**

Blue-cap flasker med 100 ml sterilt drikkevand. Én flaske med hvert kit podes med *E. coli*.

Sterilt drikkevand anvendes som negative kontroller - enkeltbestemmelse.
Sterilt drikkevand podet med *E. coli* anvendes som positive kontroller - enkeltbestemmelse.

Ovenstående giver 45 bestemmelser (24 liter) pr. prøve + kontroller.

Prøve 6 – 10:

Der er analyseret 5 prøver (nr. 6 – 10) – alle som dobbeltbestemmelser med nedenstående metoder.

For alle metoderne køres desuden parallelt med podning af *A. hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* og *Citrobacter* - hver som enkeltbestemmelse.

Der laves således 5 ”ophældninger” af hver – heraf podes tre ”ophældninger” hver med én af de tre testorganismer.

- 100 ml prøve fordelt i 2 x 50 ml dobbeltstyrke MacConkey-bouillon. 37 °C og 44 °C. **Ophæld 20 dobbeltstyrkerør. Pod 2 rør til 37 °C og 2 rør til 44 °C med enten *A. hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* eller *Citrobacter*. De resterende 8 rør fordeles med 4 (= dobbeltbestemmelse af 100 ml vand) ved hver temperatur.**
- 100 ml prøve i Colilert®-18, Colilert® hhv. Readycult®. **Ophæld 5 flasker for hver kit, dvs. 15 flasker i alt (10 Colilert-éngangsflasker + 5 Blue-cap flasker til Readycult). Tre flaskes med hvert kit podes med hhv. *A. hydrophila*, *Klebsiella pneumoniae* og *Citrobacter*.**
- Filter/-re fra 1000 ml vand i 50 ml enkeltstyrke MacConkey-bouillon. 37 °C og 44 °C. **Lav 10 membranfiltreringer. Kom ét filter i hvert af 10 enkeltstyrkerør. Pod 2 af rørene med *A. hydrophila*, 2 med *Klebsiella pneumoniae* og 2 med *Citrobacter* – ét af hver til 37 °C og ét til 44 °C. Inkubér de resterende 4 rør med 2 ved hver temperatur.**
- Filter/-re fra 1000 ml vand i 100 ml sterilt drikkevand i de tre kommercielle systemer. **Lav 15 membranfiltreringer. Kom ét filter i hver af 10 Colilert flasker med 100 ml sterilt drikkevand og ét filter i hver af 5 Blue-cap flasker med 100 ml sterilt drikkevand. Én flaske med hvert kit podes med *A. hydrophila*, ét med *Klebsiella pneumoniae* og ét med *Citrobacter*.**

Sterilt drikkevand anvendes som negative kontroller i hver analysetype.
Sterilt drikkevand podet med relevant referencestamme anvendes som positive kontroller.

Ovenstående giver 50 bestemmelser (27,5 liter) pr. prøve + kontroller.

Hver af testene er inkuberet som foreskrevet i metoderne. For MacConkey dog ved 37 °C såvel som direkte ved 44 °C.