



Miljøministeriet
Naturstyrelsen

Online Coli Detection

Kolofon

Titel:

Online coli detection

ISBN nr.

978-87-92708-29-8 (PDF)

Emneord:

Målinger i vand, coli, drikkevand.

Udgiverkategori:

Statslig

Projektmidler:

Projektet er gennemført med støtte fra tilskudsmidlerne i forbindelse med den miljøteknologiske handleplan.

Resume:

Amphi-bac ApS har udviklet et funktionsdygtigt apparat (OCD), som muliggør automatiseret overvågning af drikkevand for coliforme bakterie, men en analysehyppighed på 24 timer. Ved en forureningshændelse gemmes en vandprøve til efterfølgende kildeopring. Opbygning, virkemåde og test beskrives i nærværende rapport.

Udgiver:

Naturstyrelsen

Forfatter:

Søren Bastholm, Amphi-bac ApS

Sprog:

Dansk

Må citeres med kildeangivelse.

År:

2011

Ansvarsfraskrivelse:

Naturstyrelsen offentliggør rapporter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøministeriet. Offentliggørelsen betyder, at Naturstyrelsen finder indholdet af væsentlig betydning for en bredere kreds. Naturstyrelsen deler dog ikke nødvendigvis de synspunkter, der kommer til udtryk i rapporterne

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

Forord	2
Introduktion	4
Baggrund	4
Projektbeskrivelse og formål	4
Laboratorieforsøg	6
Kompensering for turbiditet	7
Koncentrationsafhængig farveudvikling	8
Udvikling og test af målecelle og reaktionskammer	10
Målecelle	10
Reaktionskammer	10
Test af målecelle og reaktionskammer	11
Udvikling og fremstilling af prototype	14
Test af prototype	16
Formidling	18
Konklusion	20

Forord

Denne rapport er udarbejdet af Amphi-Bac ApS. Projektet er udført i perioden 1. marts 2009 til 1. marts 2010 med støtte fra miljøministeriets tilskudsordning til miljøeffektiv teknologi. Tak til følgegruppen for værdifuld sparring og opbakning gennem projektperioden.

Forfatter: Søren Bastholm

Følgegruppe:

Karin Dahlgren (BLST)

Peter Roslev (AAU)

Louise Appel Bjergbæk (Forsyningsvirksomhederne Aalborg)

Frede Frost (FDV)

Introduktion

Baggrund

I Danmark testes drikkevandet rutinemæssigt for coliforme bakterier og *E. coli*. Gruppen af coliforme bakterier dækker over mange slægter, og *E. coli* er indeholdt i gruppen af coliforme bakterier. Coliforme bakterier findes ikke naturligt i dansk grundvand og da vandforsyningen i Danmark er baseret på grundvand, vil en påvisning af coliforme bakterier i drikkevandet være en indikation på en udefrakommende forurening. *E. coli* kommer udelukkende fra fækalier mens andre coliforme bakterier er at finde næsten overalt i miljøet (spildevand, overfladevand, jord, orme og snegle osv.). Forurening af dansk drikkevand med coliforme bakterier er et velkendt problem, men i de fleste tilfælde lykkes det ikke, at detektere oprindelsen af disse udefrakommende bakterier og vandværker kan derfor opleve tilbagevendende overskridelser af kravet på <1 coliform bakterie per 100 ml.

Projektbeskrivelse og formål

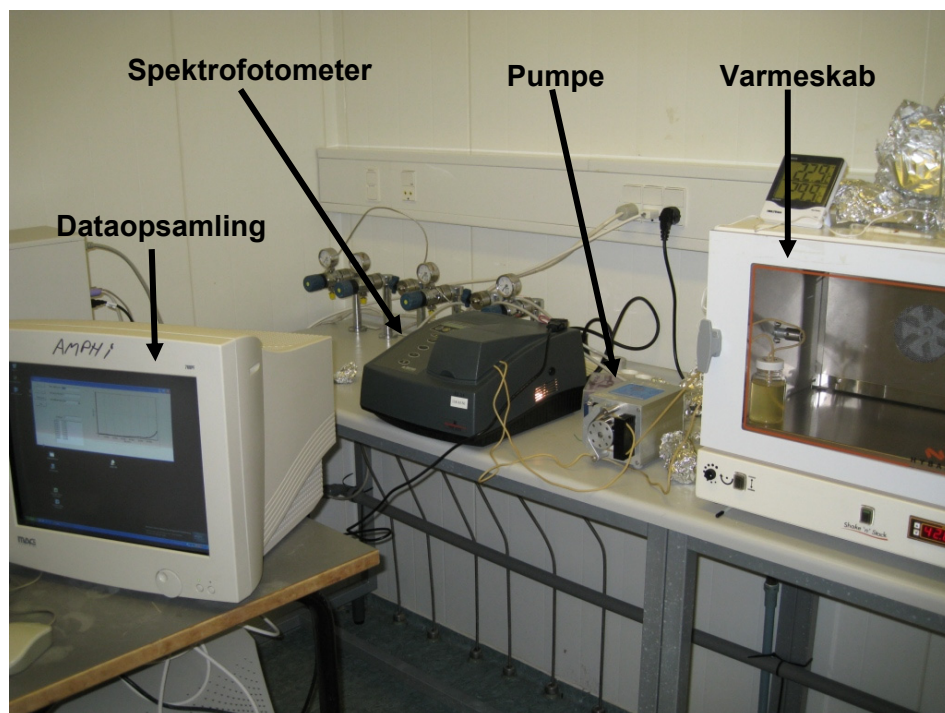
For Amphi-Bac ApS har de sporadiske forureninger været frustrerende. Vi er specialiseret i kildesporing af bakterielle forureninger, men fra der er konstateret en forurening og til vi får besked og er på stedet, har vi ofte oplevet, at det forurenede vand (bevismaterialet) ikke kan genfindes. Det har derfor været vores formål med projektet:

- ✓ At udvikle og fremstille et apparat, som automatisk kan udtage en vandprøve og analysere denne for coliforme bakterier og specifikt for *E. coli*.
- ✓ At apparatet i tilfælde af en forurening gemmer bevismaterialet i form af en større vandmængde og afsender en SMS eller mail til relevante personer.
- ✓ At apparatet automatisk renses efter en forurening.
- ✓ At apparatet er fuldautomatisk og kun skal tilses en gang om måneden.
- ✓ At apparatet kan fjernstyres via et modem.

Det er idéen, at vandværker, som oplever sporadiske tilfælde af forureninger med coliforme bakterier vil kunne benytte apparatet i en periode indtil en forurening er detekteret. Apparatet vil i dette tilfælde have gemt en større vandmængde af det forurenede vand, hvilket kan anvendes til kildesporing. Kildesporingen benyttes til at bestemme forureningskilden og få den stoppet.

Laboratorieforsøg

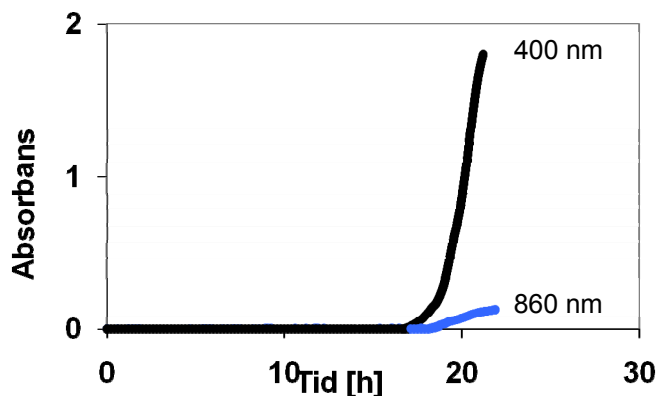
Det grundlæggende detekteringsprincip i det udviklede apparatur, herefter kaldet OCD, er kontinuerte absorbansmålinger af β -galactosidase aktivitet i coliforme bakterier. Coliforme bakterier tilstede i vandprøven vil bruge enzymet β -galactosidase, som alle coliforme bakterier har, til at omsætte ortho-Nitrophenyl- β -galactoside, som bliver tilsat vandprøven sammen med et vækstmedie. Vandprøven vil skifte farve fra farveløs til gul, hvis der er coliforme bakterier deri. Ved at måle farveudviklingen kontinuert dannes et udtryk for farveudviklingen som funktion af tiden. Til laboratorieforsøgene blev et spektrofotometer anvendt som både lyskilde og detektor. Prøven (100 ml vandprøve tilsat reagenser) blev placeret i et varmeskab (36 °C) og cirkuleret gennem en flowkuvette i spektrofotometeret via en peristaltisk pumpe. Opstillingen ses på nedenstående Figur 1.



Figur 1: Billede af opstilling anvendt i laboratoriet med dataopsamling, spektrofotometer, peristaltisk pumpe og varmeskab.

Kompensering for turbiditet

Eftersom både prøvens farveskift fra klar til gul og opformeringen af bakterier i prøven vil give anledning til øget absorbans blev partiklernes (bakterierne) bidrag til absorbansen undersøgt. Prøven blev vha. en peristaltisk pumpe cirkuleret gennem to flowkvetter i hver sit spektrofotometer. Det ene spektrofotometer målte absorbansen ved 400 nm svarende til den gule farves komplementærfarve og det andet spektrofotometer målte absorbansen ved 860 nm som et udtryk for absorbansen fra partiklerne i prøven. Figur 2 viser absorbansudviklingen for en 100 ml drikkevandsprøve spiket med omkring 160 *E. coli* til tiden 0. Startkoncentrationen blev bestemt med colilert i QuantiTray 2000.

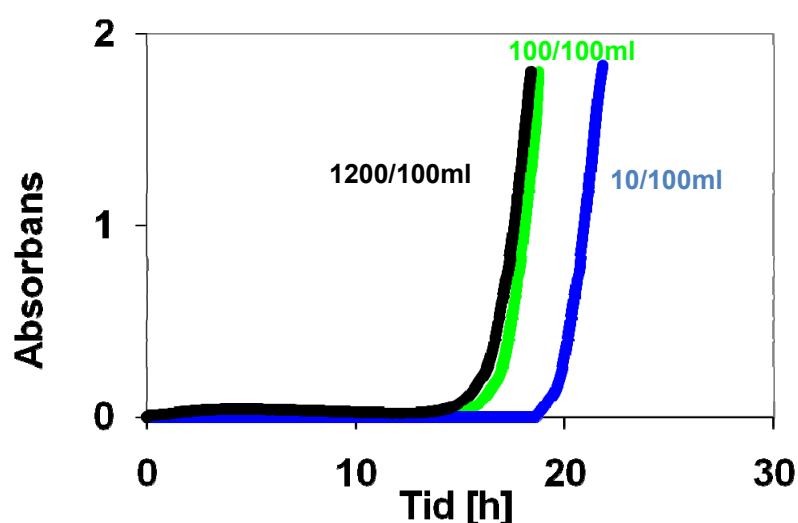


Figur 2: Absorbans som funktion af tiden målt ved 400 nm og 860 nm på samme 100ml vandprøve med omkring 160 *E. coli* til tiden 0.

Absorbansen ved 400 nm begyndte at stige efter cirka 18 timer på grund af en gul farveudvikling, hvorimod der første blev registreret en stigning i absorbansen ved 860 nm cirka en time senere og her var absorbansbidraget ved de 400 nm tydeligt dominerende. Det blev på denne baggrund besluttet, at absorbansbidraget fra partiklerne i prøven kunne regnes som neglisibelt og der er derfor i de følgende forsøg udelukkende målt ved 400 nm og derved ikke kompenseret for bakteriernes absorbansbidrag.

Koncentrationsafhængig farveudvikling

Til disse forsøg blev spektrofotometeret sat op til at måle absorbansen ved 400 nm hvert 10. sekund over en periode på 24 timer. Drikkevandsprøver med forskellige startkoncentrationer af *E. coli* (bestemt med colilert i QuantiTray 2000) blev analyseret og nedenstående Figur 3 viser et eksempel på absorbansudviklingen for 3 forskellige startkoncentrationer af *E. coli*.



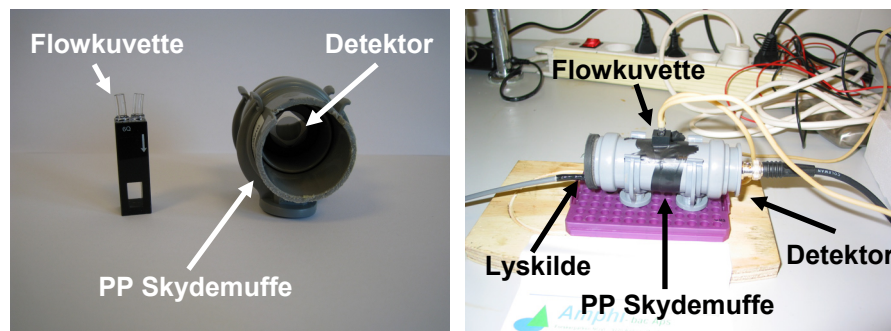
Figur 3: Eksempel på den tidlige absorbansudvikling for 3 forskellige startkoncentrationer af *E. coli*. De 3 kurver set fra venstre mod højre repræsenterer henholdsvis 1.200, 100 og 10 *E. coli* per 100 ml.

Som Figur 3 viser, er der en sammenhæng mellem startkoncentrationen af *E. coli* i prøven og den tid, der går inden absorbansen stiger som følge af prøvens farveskift fra klar til gul. For prøven med den højeste startkoncentration (1.200 *E. coli* per 100ml) ses absorbansstigningen først og for prøven med den laveste startkoncentration (10 *E. coli* per 100ml) kommer absorbansstigningen sidst. Forsøget her antyder, at startkoncentrationen kan estimeres alene ud fra tidspunktet, hvor der registreres en absorbansstigning. Reelle drikkevandsforureninger vil imidlertid ikke blot bestå af *E. coli*, men af en blanding af forskellige coliforme bakterier. Da det forventes, at de forskellige coliforme bakterier kan have forskellige nølefasen (tiden inden formering starter) samt fordoblingstider, kræves der yderligere forsøg med reelle drikkevandsforureninger for at komme en kvantificering af forureningen nærmere, ud fra tidsvariationen alene.

Udvikling og test af målecelle og reaktionskammer

Målecelle

Til opbygning af målecellen blev der anvendt en PP skydemuffe på 32 mm (se Figur 4).

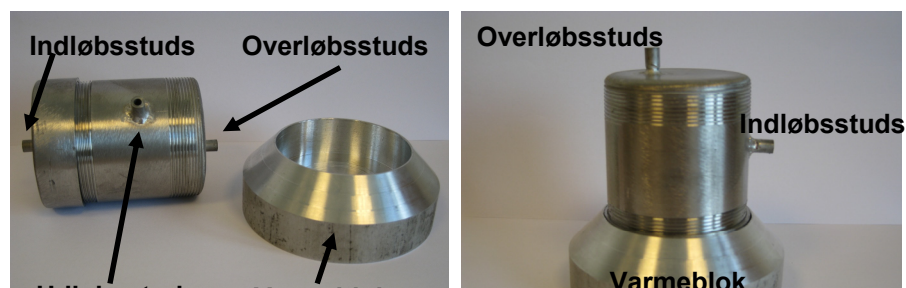


Figur 4: Billeder af målecellen med flowkuvette, lyskilde og detektor.

Som lyskilde blev en lysdiode, der udsender diffuseret lys med en peak-bølgelængde på 430 nm valgt og som detektor en SI fotodiode. Mellem lyskilde og detektor blev en flowkuvette placeret hvor igennem prøven recirkuleres. Herved kunne en gulfarvning af prøven detekteres som et spændingsfald over detektoren.

Reaktionskammer

Reaktionskammeret blev fremstillet i rustfrit stål og placeret på en varmeblok af aluminium. Figur 5 viser de to dele hver for sig og samlet.

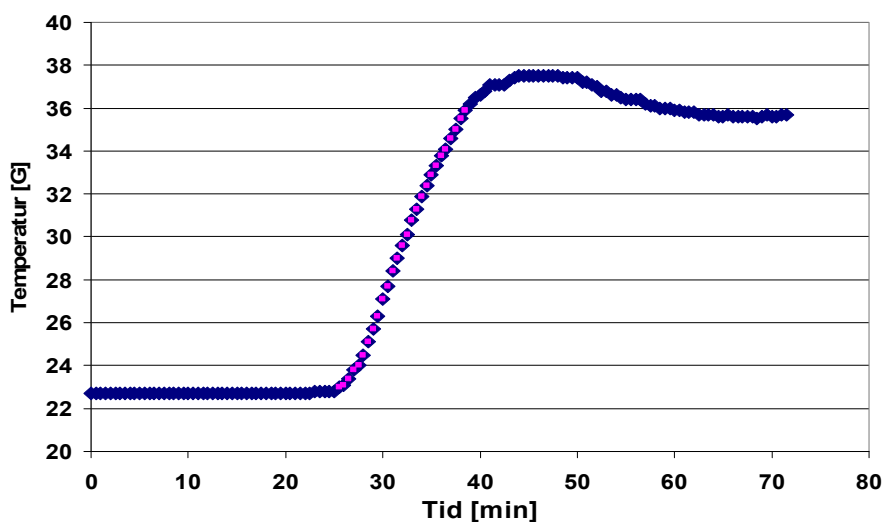


Figur 5: Billeder af reaktionskammer og varmeblok.

Reaktionskammeret har udløb i bunden og ned gennem varmeblokken.

Test af målecelle og reaktionskammer

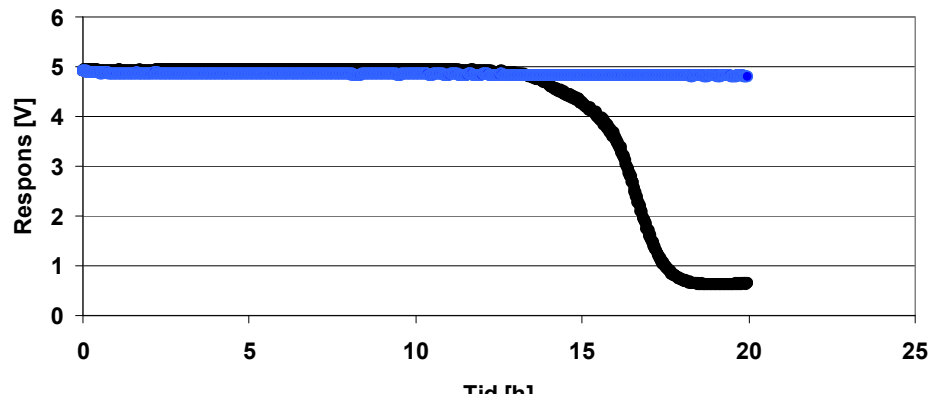
Målecellen blev forbundet med reaktionskammeret således, at prøven i reaktionskammeret blev recirkuleret ved brug af en peristaltisk pumpe gennem målecellen med 10 ml per minut. En elpatron indsat i varmeblokken sikrede opvarmning af prøven. Prøvens temperatur blev logget med en temperatursensor klistret direkte på reaktionskammeret. Figur 6 viser resultatet af den valgte Når opvarmningen aktiveres, sker opvarmningen fra 22,5 °C til 36 °C på 13 minut-



Figur 6: Eksempel på opvarmning af en 100 ml drikkevandsprøve. På x-aksen er tiden i minutter afbilledet Y-aksen viser temperaturen i grader celsius.

ter. Temperaturen svinger op på 37,5 °C inden den falder og stabiliserer sig på 36 °C +/- 0,2 °C. Figur 7 viser målecellens respons for en vandprøve med og uden coliforme bakterier. Prøvens indhold af coliforme bakterier blev bestemt til 126/100ml, hvoraf 59 var *E. coli*. Målecellen er forinden nulstillet så responset fra fotodioden er 0,0 V når dioden er slukket.

Af Figur 7 ses, at responset for prøven med coliforme bakterier falder fra 5V til omkring 0,7V i løbet af 20 timer. Hvis treshold for eksempel sættes til 4V vil OCD'en efter 15,5 time sende en alarm med oplysninger om, at der er detekteret coliforme bakterier.



Figur 7: Respons fra fotodioden vist som funktion af tiden for en vandprøve med og uden coliforme bakterier. Den blå kurve viser responset for vandprøven uden coliforme bakterier og den sorte responset for en vandprøve med 126 coliforme per 100 ml, hvoraf de 59 er *E. coli*. Enheden på y-aksen er Volt og tiden i timer er afbilledet på x-aksen

Målecellen er blevet kombineret med en mini-luminescens sensor som efter detektion af coliforme bakterier tester prøven for tilstedeværelsen af *E. coli* bakterier. Alarmen fra OCD'en vil således indeholde information om både coliforme bakterier og specifikt om der er *E.coli* i prøven.

Udvikling og fremstilling af prototype

OCD prototypen er bygget op omkring en aluminiumsramme på 80x80x80 cm. Prototypen er fremstillet med 2 uafhængige systemer således, at der automatisk skiftes fra system 0 til system 1 når der detekteres en forurening på system 0. Herved fortsætter OCD'en på system 1 og der er tid til at hente de gemte vandprøver. Figur 8 viser et billede af den færdige prototype set forfra. Øverst på OCD'en ses to 10L dunke som bruges til at gemme vandprøverne fra henholdsvis system 0 og 1. På bagsiden af OCD'en er der fire 5L dunke til rensevæsker og fire 5L dunke til vandprøver (2 til hvert system).



Figur 8: Billede af OCD'en opstillet på et mindre vandværk i Nordjylland.

Nedenstående beskriver OCD'ens cyklus for en situation uden coliforme bakterier i vandet og en situation, hvor OCD'en detekterer en forurening.

Cyklus uden coliforme i vandet:

Til tiden 0 udtages 5L vand (Prøve 1 system 0). 12 timer (denne tid er variabel) senere udtages 10L vand (Prøve 2 system 0), hvoraf 100ml anvendes til analysen for coliforme bakterier. Analysen påbegyndes til tiden 12 timer. Efter endnu 12 timer (denne tid er variabel) udtages en 5L vandprøve (Prøve 3 system 0). Er der ikke detekteret coliforme bakterier 24 timer efter analysen for coliforme er startet, anses vandet for coliformfrit ($<1/100\text{ml}$) og den 10L vandprøve (Prøve 2 system 0) tømmes. OCD'en tager derefter en ny 10L prøve, hvorpå analysen påbegyndes på 100ml på ny. Prøve 3 system 0 gemmes, da den nu udgør prøven taget 12 timer før den prøve, hvorpå der analyseres. 12 timer efter den nye 10L prøve er udtaget tages en ny 5L prøve og sådan fortsættes cyklussen

indtil der detekteres en coliform forurening. Ved denne cyklus vil der altid være en tidsserie på 3 vandprøver som er klar til at blive hentet og analyseret, hvis der detekteres en forurening.

Cyklus med coliforme i vandet

Til tiden 0 udtages 5L vand (Prøve 1 system 0). 12 timer (denne tid er variabel) senere udtages 10L vand (Prøve 2 system 0), hvoraf 100ml anvendes til analysen for coliforme bakterier. Analysen påbegyndes til tiden 12 timer. Efter endnu 12 timer (denne tid er variabel) udtages en 5L vandprøve (Prøve 3 system 0). Detekteres der coliforme bakterier ($>1/100\text{ml}$) sendes en SMS eller en E-mail til udvalgte personer. Reaktionskammeret renses automatisk og OCD'en slår over på system 1, hvor der er to nye sterile 5L dunke og en steril 10L dunk klar. De fyldte dunke fra system 0 hentes og udskiftes med nye tomme og sterile dunke. Således er bevismaterialet fra forureningen sikret og det er muligt at foretage DNA-analyser på vandprøverne for at fastslå, hvorfra de coliforme bakterier er kommet ind i drikkevandssystemet. System 1 kører nu som beskrevet under cyklussen uden coliforme i vandet indtil der igen detekteres coliforme i vandet. Når der igen detekteres coliforme bakterier vil OCD'en slå tilbage på system 0, sende SMS, rense reaktionskammeret osv. og denne måde fortsættes indtil den ønskede viden er indsamlet.

Test af prototype

OCD'en har været opsat på et mindre vandværk i Nordjylland. Vandværket har gentagende gange målt lave koncentrationer af coliforme bakterier i vandet indenfor de seneste år. 5 dage efter start blev en coliform forurening detekteret og Amphi blev alarmeret via SMS og de 3 vandprøver blev hentet. Der blev lavet Colilert analyser på vandprøverne og Tabel 1 viser resultaterne.

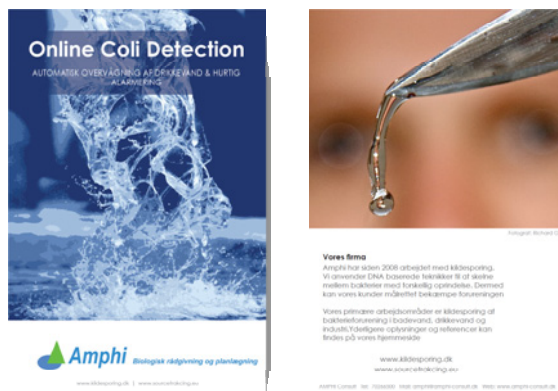
Tabel 1: Oversigt over de vandprøver, som blev hentet og analyseret for coliforme bakterier, da OCD'en gav alarm på et mindre vandværk i Nordjylland.

Vandprøve ID	Coliforme/100ml
Vandprøve 1, 5L, t=0h	1
Vandprøve 1, 5L, t=0h	3
Vandprøve 2, 10L, t=12h	2
Vandprøve 2, 10L, t=12h	2
Vandprøve 2, 10L, t=12h	0
Vandprøve 3, 5L, t=24h	1
Vandprøve 3, 5L, t=24h	2

Der blev i gennemsnit fundet 1,6 coliforme bakterier per 100ml i det gemte vand og der blev ikke fundet *E. coli*. Vandet fra de gemte vandprøver er opkoncentreret og DNA er ekstraheret. DNA'et er ikke færdiganalyseret, så der foreligger pt. ingen forklaring på, hvorfra de coliforme bakterier kommer. Testopstillingen på vandværket viser, at OCD'en er i stand til at reagere på en coliform forurening og at detektionsgrænsen er i niveau med detektionsgrænsen for de akkrediterede prøver (1/100ml). OCD'en blev efterfølgende flyttet til NOVI, Niels Jernes Vej 10, 9220 Aalborg Ø hvor den blev tilsluttet afgang fra en vandhane. Efter 2-3 uger, hvor vandet dagligt blev analyseret for coliforme bakterier, blev der observeret kalkaflejringer i slangerne. Der er derfor besluttet, at der i softwaren skal indføres en kort renseprocedure hver 3. til 5. dag for at fjerne kalkaflejringerne. OCD'en detekterede ikke coliforme bakterier i vandet fra NOVI i løbet af de 4 uger hvor den var tilsluttet vandhanen.

Formidling

Information om OCD'en er tilgængeligt på hjemmesiden www.kildesporing.dk
 Der er fremstillet en folder, som ganske kort beskriver OCD'en. Folderen er sendt til udvalgte personer og ligger som download på vores hjemmeside. Nedenstående Figur 10 viser henholdsvis forside og bagside af folderen.



Figur 10: Forside og bagside af folderen, som kort beskriver OCD'en.

Figur 9 viser indholdet af folderen.

Anvendelse

A. Ingen OCD

B. Med OCD

Automatisk overvågning & hurtig alarmering

Kildesporing

Bevismateriale til Kildesporing

Bakterieforurening	Hvor kommer bakterierne fra?			
Vandværk B	-	+	-	-

Muligheder med OCD overvågning

Automatisk overvågning af E. coli og coliforme bakterier i vand, fx en gang i døgnet.

Hurtig alarmering via SMS/e-mail i forbindelse med forureninger.

Ved alarm er der gemt tre vandprøver, som er udtaget på forskellige tidspunkter. Dette bevismateriale kan bruges til standardanalyser og kildesporing.

Figur 9: Indhold af folderen, som kort beskriver OCD'en.

Eksempel på cyklus VP = Vandprøve (-SL)

A. Ingen alarm

B. Alarm

Anvendelse

Fast placering på bestemte stationer i forsyningsnettet eller på vandværker, hvor man ønsker en konstant overvågning af vandkvaliteten

Midlertidig placering på mindre vandværker eller kritiske steder i ledningsnettet, hvor der er problemer med vandkvaliteten.

Efter en vellykket test af OCD'en på et mindre vandværk i Nordjylland lavede Nordjyske Stiftstidende en artikel om drikkevandskvalitet og mulighederne med OCD'en. Nedenstående Figur 11 viser udklip fra avisen.



Figur 11: Midtersider (8 og 9) af NORDJYSKE Stiftstidende tirsdag den 16. februar 2010.

Konklusion

Amphi-bac ApS har indenfor projektrammen opnået, at fremstille en fuld funktionsdygtig prototype (OCD). OCD'en kan automatisk udtage en vandprøve og analysere vandet specifikt for coliforme bakterier og *E. coli*. OCD'en er indstillet til at analysere vandet én gang i døgnet. Detekterer OCD'en en forurening afsendes en SMS eller en mail og OCD'en renses automatisk og fortsætter prøvetagningen. I tilfælde af en forurening har OCD'en gemt en større vandmængde af det forurenede vand, som efterfølgende kan anvendes kildesporing. OCD'en skal blot tilses én gang om måneden og alle funktioner kan fjernstyres via modemopkobling.

Der er således nu mulighed for, at vandværker kan kontrollere drikkevandet for coliforme bakterier en gang i døgnet på en nem, billig, sikker og CO₂ besparende måde.



Naturstyrelsen
Haraldsgade 53
2100 København Ø
www.nst.dk