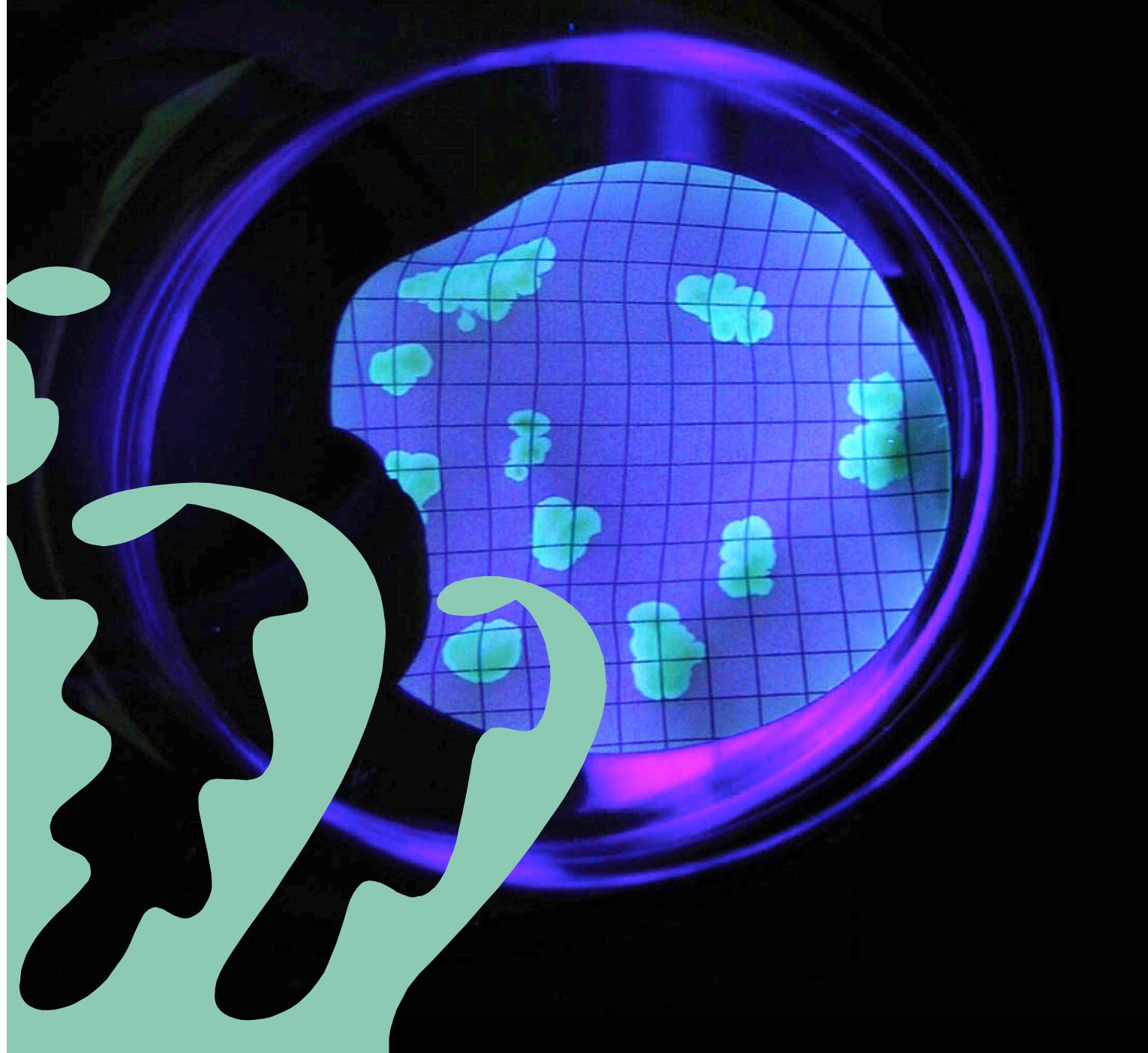




Miljøministeriet
Naturstyrelsen

ColiBox

- et kombineret koncept til filtrering og hurtig
påvisning af coliforme bakterier og *E. coli* i vand



Kolofon

Titel:

ColiBox – et kombineret koncept til filtrering og hurtig påvisning af coliforme bakterier og *E. coli* i vand

ISBN: 978-87-7279-596

Emneord:

Drikkevandskvalitet, mikrobiologi, hurtigmetode, overvågning, egenkontrol

Udgiverkategori:

Statslig

Projektmidler:

Projektet er gennemført med støtte fra Miljøministeriets tilskudsordning for miljøeffektiv teknologi (Ecoinovation).

Resume:

I ColiBox projektet er der udviklet hurtigmetoder til påvisning af fækale indikatorbakterier og karakterisering af mikrobielle forurenninger i drikkevand. Med de nye metoder kan der opnås en tidlig advarsel ved fækale forurenninger med en analysetid på få timer ("early-warning"). Forureningen kan efterfølgende karakteriseres for at skelne mellem mulige forurenings typer. De udviklede metoder er anvendelige med forskellige vandtyper og det udviklede udstyr er kompakt og mobilt og kræver ikke laboratoriefaciliteter. Metoderne vil blandt andet kunne anvendes til overvågning og egenkontrol i vandforsyninger.

Udgiver:

Naturstyrelsen

Forbehold:

Naturstyrelsen vil, når lejligheden gives, offentliggøre rapporter indenfor miljøsektoren, finansieret af Miljøministeriet. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Naturstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Naturstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Ansvarlig institution:

Naturstyrelsen

Forfattere:

Peter Roslev, Aalborg Universitet

Mary Bjerring Rasmussen, Aalborg Universitet

Andre bidragydere:

Annette S. Bukh

Margit Paulsen

Ann P. Brønnum

Sprog:

Dansk

År: 2012

1. Indhold

2. Forord.....	4
3. Sammenfatning	5
4. Summary	7
5. Indledning	1
6. Formål	11
7. ColiBox Toolbox.....	12
9. Vandprøver og analyser	14
9.1 Vandprøver.....	14
9.2 Indikatorbakterier	15
9.3 Fluorescens	15
10. FIB:Lite -early-warning	18
10.1 Optimering af FIB:Lite	19
Inkuberingstid	19
Kinetik	20
Inkubationstemperatur	21
Prøvevolumen	22
10.2 Validering af FIB:Lite	23
Bestemmelse af detektionsgrænsen for FIB:Lite	23
Specificitet og sensitivitet	24
Sammenligning af to hurtigmetoder	26
10.3 Udvikling af ColiBox udstyr.....	28
Prøvetagning og filtrering	28
Inkuberingsenhed.....	30
11. FIB:Vis -visuel bekræftelse	32
12. MST:Lite -mikrobiel kildesporing.....	34
12.1 Optimering af MST:Lite	35
12.1 Validering af MST:Lite	36
Skagen Vandværk.....	36
Drikkevand med forskellige forurenninger	38
13. Konklusioner og perspektiver.....	40
14. Formidling	42
15. Kilder	43

2. Forord

Dette er en afsluttende rapport for projektet "ColiBox – et kombineret koncept til filtrering og hurtig påvisning af coliforme bakterier og *E. coli* i vand".

Projektets formål har været at udvikle og validere et nyt kombineret koncept til hurtig påvisning og karakterisering af fækal forurening i drikkevand.

Der er nedsat følgende projektgruppe og følgegruppe til projektet:

Projektgruppe

Peter Roslev – Aalborg Universitet (Projektleder)

Mary Bjerring Rasmussen – Aalborg Universitet

Annette S. Bukh – Aalborg Universitet

Andre bidragydere

Margit Paulsen – Aalborg Universitet

Ann P. Brønnum – Aalborg Universitet

Følgegruppe

Robert Jensen, Naturstyrelsen

Else-Marie Østergaard – Aarhus Vand A/S

Louise Appel Bjergbæk – Aalborg Forsyning A/S

Kontaktpersonen i Naturstyrelsen har været Robert Jensen

3. Sammenfatning

I dette projekt er der blevet udviklet et kombineret koncept til filtrering, påvisning og karakterisering af fækal forurening i drikkevand (ColiBox). ColiBox består af 3 elementer:

- i. En metode til hurtig påvisning ("early warning") af fækale indikatorbakterier (FIB) i drikkevand med en responstid på få timer [FIB:Lite].
- ii. En metode til visuel eftervisning af resultater opnået med hurtigmetoden [FIB:Vis].
- iii. En metode til indledende karakterisering af mikrobielle forurenninger i drikkevand i forbindelse med mikrobiologisk kildesporing [MST:Lite].

I FIB:Lite benyttes der fluorescerende kemikalier og følsom fluorimetri til detektion af fækal forurening i drikkevand på 2-3 timer. Under projektet blev en række parametre undersøgt og optimeret, herunder substrater og co-substrater, kinetik, inkubationstid, temperatur, pH, signalforstærker, prøvevolumen samt specificitet og sensitivitet. Resultaterne viste blandt andet, at der med optimerede metoder var muligt på 2 timer at påvise forurening af drikkevand med spildevand svarende til 4-40 *E. coli*/100 mL.

I FIB:Vis udnyttes kromogene enzymsubstrater til visuel eftervisning af resultater opnået med FIB:Lite metoden. FIB:Vis kan opfattes som et supplement til hurtigmetoden og kan udføres hvis der ønskes en traditionel vækstbaseret bekræftelse med hensyn til coliforme bakterier og *E. coli*. FIB:Vis genbruger filterenheden fra hurtigmetoden og har en analysestid på 20 timer.

Hvis en mikrobiel forurening er blevet påvist, kan det være nyttigt at karakterisere situationen yderligere for at skelne mellem forskellige forureningsstyper. MST:Lite er en fluorescensbaseret hurtigmetode til indledende karakterisering i forbindelse med mikrobiologisk kildesporing ("Microbial Source Tracking" – MST). MST:Lite består af 10 fluorescensbaserede enzymreaktioner og giver et fingeraftryk ved analyse af forurenset drikkevand.

I projektet er de udviklede metoder blevet valideret ved anvendelse af drikkevand fra vandforsyninger i Aalborg, Aarhus, Skagen og Sønderborg. For at efterligne forskellige forureningssituationer er drikkevandet i nogle forsøg blevet kontamineret med overfladevand eller spildevand i forskellige koncentrationer. For at efterligne eftervækst er der i nogle forsøg anvendt drikkevand ældet i PEX rør ved forhøjede vandtemperaturer.

Der har i projektet været særlig fokus på udvikling af hurtigmetoder, der ikke kræver specielle laboratorieforhold eller udstyr og som muliggør anvendelse direkte i felten og/eller på vandværker (FIB:Lite). Der har i den sidste fase af projektet derfor også været fokus på udvikling af prototyper af udstyr, der dels var omkostningseffektivt og dels kan anvendes uden for et traditionelt laboratoriemiljø. Denne fase har blandt andet omfattet en ny kommercial high-flow filtreringsenhed samt udvikling af en temperaturstyret

miniinkubator og validering af et håndholdt fluorometer. Dette udstyr kan medbringes i felten, da det er relativt kompakt og samlet vejer under 5 kg. Muligheden for at filtrere større mængder drikkevand på kort tid til mikrobiologiske analyser blev undersøgt, og resultatet viste at 10 L ville kunne filtreres på under 30 min med et vakuum på -70 kPa.

De færdigudviklede ColiBox metoder herunder FIB:Lite vil blandt andet kunne bruges til overvågning og egenkontrol i vandforsyninger herunder Dokumenteret DrikkevandsSikkerhed (DDS) og vil kunne give en tidlig advarsel i forbindelse med større fækale forurenninger. Forekomst af fækale indikatorbakterier vil således kunne påvises inden for en arbejdsgang og muliggøre en tidlig indsats.

4. Summary

In this project, a combined concept has been developed for filtration, detection and characterization of fecal contamination of drinking water (ColiBox). ColiBox consists of three elements:

- i. An early warning method for rapid detection of fecal indicator bacteria (FIB) in drinking water with an analysis time of a few hours (FIB:Lite)
- ii. A method for visual confirmation of results obtained using the early warning method (FIB:Vis)
- iii. A method for initial characterization of microbial contamination in drinking water in relation to microbial source tracking (MST:Lite).

In the FIB:Lite method, fluorescent chemicals and sensitive fluorometry were used to detect fecal contaminations in drinking water within 2-3 hours. A range of parameters were examined and optimized in the project including substrates and co-substrates, kinetics, incubation time, temperature, pH, enhancers, sample volume, and specificity and sensitivity. The results indicated that it was possible within 2 hours to detect wastewater contamination in drinking water corresponding to 4-40 *E.coli*/100 mL.

In the FIB:Vis method, chromogenic substrates were used to provide visual confirmation of the results obtained using the rapid FIB:Lite method. FIB:Vis can be seen as an addition to the early warning method, and can be performed, if a traditional cultivation-based confirmation of coliform bacteria and *E.coli* is required. The FIB:Vis method reuses the filtration unit from the early warning method, and has an analysis time of 20 hours.

If fecal contamination has been detected, further characterization of the pollution can be useful in order to distinguish between different contamination types. MST:Lite is a rapid fluorescence based method for initial characterization of microbial contamination in relation to microbial source tracking (MST). MST:Lite consists of 10 fluorescence based enzyme reactions, and provided a characteristic fingerprint for contaminated drinking water.

The methods developed in this project were validated using drinking water from public utility companies in Aalborg, Aarhus, Skagen and Sønderborg. Microbial contamination of drinking water was simulated in laboratory experiments by introducing known amounts of surface water or wastewater. Regrowth of indigenous microorganisms were simulated using drinking water aged in PEX pipes at elevated water temperatures.

A major aim of the projects has been to develop a rapid detection principle that did not require special laboratory facilities or equipment, and was usable directly in the field or at waterworks. Thus, the focus in the final phase of the project has been on development and implementation of portable equipment that was cost-effective and operational outside a

traditional laboratory environment. The implementation included tests of a new commercial high-flow filtration unit, development of a temperature-controlled mini-incubator, and evaluation of a handheld fluorometer. The equipment is relatively compact, weighs about 5 kg, and is portable for fieldwork. The possibility for rapid filtration of relatively large volumes of drinking water for microbiological analysis was investigated, and the results showed that 10L of water can be filtrated in less than 30 min at a vacuum of -70 kPa.

The optimized ColiBox methods, including FIB:Lite, may be used by water utilities and water works for surveillance and routine monitoring of water quality. FIB:Lite can then provide an early warning in response to significant fecal contamination. The presence of fecal indicators can be detected within one workday, which then allows fast intervention.

5. Indledning

"The reliable supply of good, safe drinking water is fundamental to a healthy community and to its economic development"

(IWA, 2004)

Hurtig og effektiv påvisning af fækale bakterier er ofte afgørende for at kunne garantere forbrugerne drikkevand af høj kvalitet og undgå at befolkningen udsættes for en sundhedsrisiko. I danske vandforsyninger forekommer der hvert år tilfælde af mikrobiologiske forurenninger med coliforme bakterier, hvoraf nogle også inkluderer forekomst af *E. coli*. I 2010 registrerede embedslægerne således 105 mikrobiologiske forurenninger på almene vandværker, hvoraf 55 sager resulterede i kogeanbefalinger (Sundhedsstyrelsen og Naturstyrelsen, 2011). Ud af disse 55 sager, var 26 anbefalinger givet på baggrund af høje målinger af coliforme bakterier (Sundhedsstyrelsen og Naturstyrelsen, 2011). En række af disse forurenningstilfælde har omfattet mindre og ældre vandforsyninger og kan delvist forklares med dårlig vedligeholdelse og tilsyn. Det er dog tankevækkende, at de senere år også har budt på en række alvorlige forurenninger hvor større og mere moderne vandforsyninger har oplevet perioder med forekomst af fækale bakterier i ledningsnettet (Aarhus, Køge, København m.fl.). Disse forurenninger har i påvirket tusindvis af forbrugere som følge af nedsat vandkvalitet og deraf følgende restriktioner herunder kogeanbefalinger og påbud. Sådanne sager har tydeligt vist, at danske vandforsyninger fortsat bør have stor fokus på at implementere effektive overvågningssystemer og samtidig styrke indsatsen for at undgå fækal forurening af det vand, der distribueres til forbrugerne.

Drikkevandsforurenninger har store økonomiske konsekvenser for de berørte vandforsyninger og derudover kan de svække forbrugernes tillid, hvilket påvirker vandforsyningernes image (Schmeichel, 2012). Der er derfor et stigende ønske i branchen om nye hurtige og enkle metoder, der kan bruges til at imødekomme fremtidige skærpede krav til egenkontrol og til hurtig sporing af bakterielle forurenninger. Derudover er der et ønske om hurtige og robuste systemer, der kan bruges i forbindelse med nye initiativer omkring Dokumenteret DrikkevandsSikkerhed (DDS). Ved implementering af en DDS plan i en vandforsyning øges fokus på vandkvaliteten, hvilket giver mulighed for at være proaktiv og iværksætte aktiviteter, der skal forhindre at problemer opstår. Dermed vil risikoen for at levere drikkevand af dårlig kvalitet reduceres, og forbrugernes tillid til forsyningen vil generelt styrkes (DANVA, 2004).

Standardmetoder til påvisning af fækale forurenninger i drikkevand herunder de godkendte DS/ISO metoder har en analysestid, der i realiteten forhindrer en tidlig indsats i tilfælde af fækale forurenninger (Tabel 5.1). Nyere kommercielle hurtigmetoder som eksempelvis Colilert® 18 og ReadyCult® giver et hurtigere svar end DS/ISO metoderne men vil først kunne advare om en fækal forurening dagen efter vandprøverne er blevet udtaget (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Eksempler på internationale standarder og kommersielle dyrkningsmedier til påvisning af fækale bakterier i drikkevand.

Metode	Bakterie(r)	Detektionsgrænse	Analysetid	
			Primær	Bekræftelse
DS/EN ISO 9308-1	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 CFU per 100 mL	21 ± 3 timer (44 ± 4 timer)	21± 3 timer
DS/EN ISO 7899-2	Enterokokker	1 CFU per 100 mL	44 ± 4 timer	2 timer
Colilert®	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 MPN per 100 mL prøve	24 timer	
Colilert®-18	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 MPN per 100 mL	18 timer	
Enterolert®	Enterokokker	1 MPN per 100 mL	24 timer	
Readycult® Coliforms	Total coliforme og <i>E. coli</i>	Positiv/negativ per	18-24 timer	
Readycult® Enterococci	Enterokokker	Positiv/negativ per 100 mL	18-24 timer	
E*Colite®	Total coliforme og <i>E. coli</i>	Positiv/negativ per 100 mL	28 timer	
Colitag®	Total coliforme og <i>E. coli</i>	Positiv/negativ per 100 mL	16-48 timer	
RAPID' E. coli2®	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 CFU per 100 mL	21 ± 3 timer	
m-Coliblue 24®	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 CFU per 100 mL	24 timer	
CHROMagar ECC®	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 CFU per 100 mL	24 timer	
HardyChrom ECC	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 CFU per 100 mL	24 timer	
Brilliance® E.coli/coliform Selective Agar	Total coliforme og <i>E. coli</i>	1 CFU per 100 mL	24 timer	

Der er i de senere år introduceret en række molekylærbiologiske målemetoder og principper på det bakteriologiske område. Flere af de molekylærbiologiske metoder vil kunne give svar samme dag som en prøve er taget, hvilket vil være en fordel ved opsporing og afværg i forbindelse med fækale forurenninger. Imidlertid kræver de fleste molekylærbiologiske metoder specialuddannet personale og avanceret analyseudstyr, hvilket i praksis gør metoderne uegnede til for de fleste vandforsyninger. Det er således tydeligt, at der er en et behov for målemetoder, der hurtigt kan advare om fækale forurenninger, men at der også en teknologisk udfordring i at konstruere et enkelt, hurtigt og robust system, der kan påvise relevante bakterier indenfor samme arbejdsdag.

6. Formål

ColiBox projektets overordnede formål har været, at udvikle og validere et nyt kombineret koncept til filtrering, hurtig påvisning og karakterisering af fækale forurenninger i dansk drikkevand. Et væsentligt delmål har været, at optimere analysetiden, så det er muligt, at få en advarsel i løbet af en enkelt arbejdsdag om forringet vandkvalitet.

I projektet er der blevet arbejdet med følgende delellemner:

1. Specifikationer for ColiBox konceptet.
2. Optimering og validering af filtreringsudstyr, kemikalier og inkubationsbetingelser
3. Validering af metoder i forhold til forskellige vandtyper og forureningstyper
4. Fremstilling af prototype hardware.

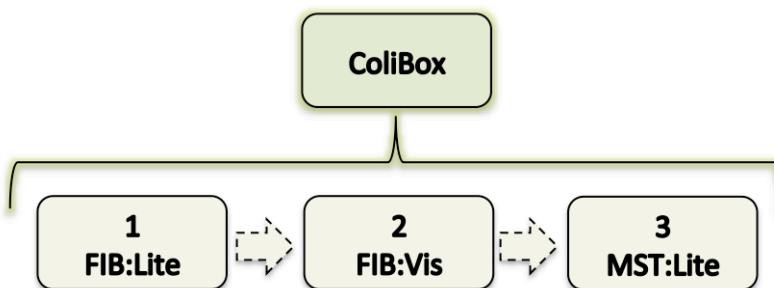
7. ColiBox Toolbox

Den udviklede ColiBox værktøjskasse indeholder tre trin (Figur 7.1). De enkelte dele i ColiBox værktøjskassen kan benyttes hver for sig eller som en kombination som angivet i Figur 7.1.

Trin 1 (FIB:Lite). En fluorescensbaseret metode til hurtig påvisning af fækale indikatorbakterier (FIB) i drikkevand med en responstid på få timer ("early warning"). Denne metode beskrives nærmere i kap. 10.

Trin 2 (FIB:Vis). En metode til visuel eftervisning af resultater opnået med hurtigmetoden i Trin 1. FIB:Vis giver mulighed for at be- eller afkræfte tilstedeværelsen af fækal forurening ved hjælp af traditionel dyrkning kombineret med en farvereaktion. Denne metode beskrives nærmere i kap. 11.

Trin 3 (MST:Lite). En fluorescensbaseret metode til indledende karakterisering af mikrobielle forureninger i drikkevand i forbindelse med mikrobiologisk kildesporing. MST:Lite består af 10 parametre og giver et fingeraftryk ved analyse af forurenset drikkevand. Denne metode beskrives nærmere i kap 12.

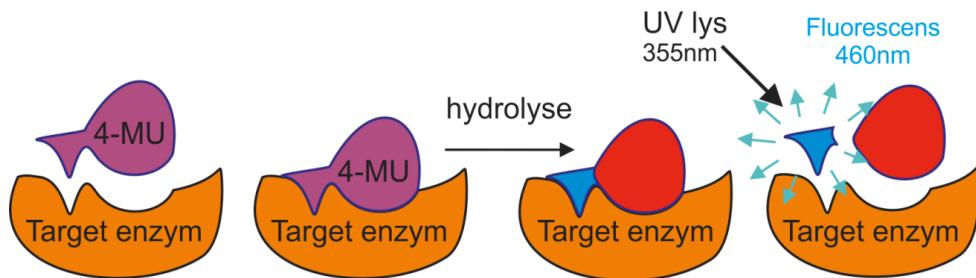


Figur 7.1 Oversigt over ColiBox konceptet.

8. Fluorescerende enzymsubstrater

Flere af de kommersielle dyrkningsbaserede metoder til påvisning af fækale bakterier benytter definerede fluorescensbaserede reaktioner til påvisning af coliforme bakterier, *E. coli* og enterokokker (Tabel 5.1). Fluorescensen er et resultat af omdannelsen af et fluorofor mærket enzymsubstrat, der bliver hydrolyseret ved tilstedeværelse af mere eller mindre bakteriespecifikke enzymer i organismerne. Sådanne enzymaktiviteter kan give et hurtigt indirekte mål for bakterieantallet i en vandprøve (aktiv biomasse).

I nærværende projekt er 4-methylumbelliferyl (4-MU) benyttet som fluorofor, og ved tilstedeværelse af "targetenzym" omsættes 4-MU-mærkede enzymsubstrater til 4-methylumbelliferon. Når 4-methylumbelliferon molekylet exciteres med UV-lys med bølgelængder omkring 355 nm vil det emmittere lys med bølgelængder med et maksimum ved 460nm (Figur 8.1).



Figur 8.1. Frigivelse af fluoroforen 4-methylumbelliferon ved hydrolyse af et 4-methylumbelliferyl mærket enzymsubstrat (4-MU).

Der findes i dag en lang række 4-MU mærkede enzymsubstrater, der kan anvendes til at påvise tilstedeværelsen af forskellige enzymer og bakterier (Fiksdal og Tryland, 2008; Orenga et al. 2009). Eksempelvis kan 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide bruges til at påvise *E. coli* i vandprøver, idet op til 97 % af alle *E. coli*-stammer indeholder enzymet β -D-glucuronidase, der spalter 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (Garcia-Armisen et al., 2005; Fiksdal og Tryland, 2008; Wildeboer et al., 2010). Koncentrationen af frigivet fluorescerende 4-methylumbelliferon er generelt proportional med antallet af "targetbakterier" i prøven og deres aktivitetsniveau, men vil også afhænge af en række fysisk-kemiske parametre herunder inkubationstid, temperatur, pH og signalforstærkere.

9. Vandprøver og analyser

I dette afsnit præsenteres de forskellige vandprøver, der er blevet analyseret i projektet, samt de traditionelle bakteriologiske metoder, der er benyttet.

9.1 Vandprøver

I løbet af projektet er der blevet indsamlet og analyseret vandprøver fra fire forskellige vandforsyninger i Danmark (Figur 9.1). Udvalgte vandkvalitetsparametre fra Jupiter databasen er endvidere vist i Figur 9.1 (GEUS, 2012).



Parameter	Sønderborg	Aarhus	Aalborg	Skagen
Turbiditet (FTU)	-	0,15-0,34	<0,05	0,2
NVOC (mg /L)	1,5-2,6	1,1-1,6	0,77-1,3	4,7
Jern (mg/L)	<0,01-0,057	0,039-0,012	<0,01-0,02	0,033
pH	7,4	7,7-8,1	7,43-7,68	7,9
Hårdhed (°dh)	15-17	14,1-18,8	14,2-15,2	9

Figur 9.1 Vandforsyninger hvorfra der er taget prøver samt udvalgte vandkvalitetsparametre fra Jupiter (GEUS, 2012).

Vandprøverne fra Aarhus, Aalborg og Sønderborg er udtaget ved private husinstallationer (taphaner). Prøverne fra Skagen er udtaget fra en boring (Figur 9.2), på Skagen Vandværk II og ved en privat husinstallation. I Skagen har råvandet en sammensætning, der nødvendiggør udvidet vanbehandling og der ses derfor store naturlige forskelle i den kemiske sammensætning mellem råvand og det færdige drikkevand (se også kap. 12).



Figur 9.2. Prøvetagning fra boring ved Skagen Vandværk II.

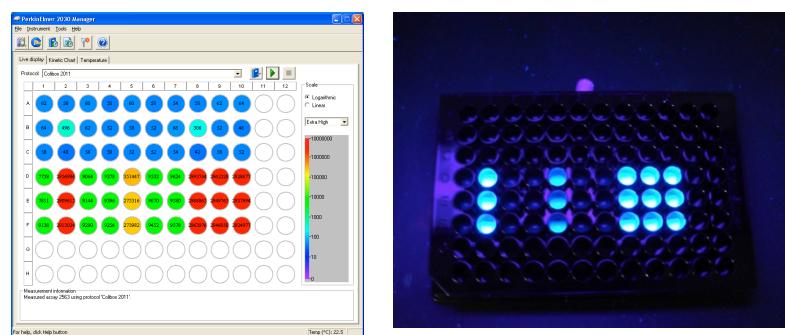
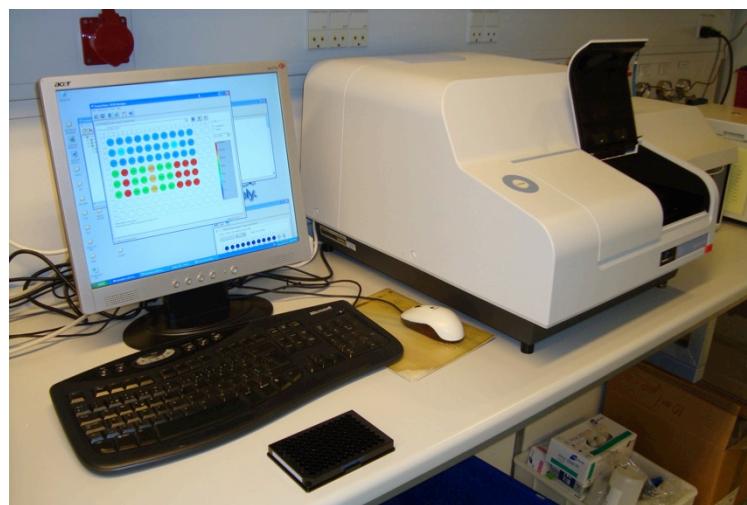
Til brug i forureningsforsøg er der indsamlet urensedt spildevand fra indløbet til Aalborg Renseanlæg Vest og fra indløbet til Egå Renseanlæg i Aarhus. Egå renseanlæg har en belastning på 100.000 PE hvoraf 40% er fra industri og 60% er fra husstande, mens Aalborg Renseanlæg Vest har en belastning på 330.000 PE med 30% fra industri og 70% fra husstande. Dette medfører en forskel i sammensætningen af bakterier i spildevandet fra de to renseanlæg. Det urensede spildevandet blev brugt til at fremstille forurenede drikkevandsprøver til forsøg.

9.2 Indikatorbakterier

Baggrundskoncentrationen af dyrkbare mikroorganismer i drikkevandsprøver (kimtal) blev bestemt ved hjælp af DS/EN ISO 6222 (2002). Baggrundskoncentrationen af *E. coli* og intestinale enterokokker blev bestemt ved hjælp af henholdsvis DS/EN ISO 9308-1 (2001/2006/2009) og DS/EN ISO 7899-2 (2000/2006). Koncentrationen af *E. coli* i kunstigt forurenede drikkevandsprøver blev bestemt i 96-brønds mikroplader ved brug af en Most Probable Number (MPN) metode med 8 gentagelser (Bukh og Roslev 2010). Fluorocult® LMX Broth (Merck) blev benyttet som vækstmedium og MPN værdier blev beregnet for positive prøver som beskrevet i Garthright og Blodget (2003).

9.3 Fluorescens

I forbindelse med udvikling og optimering af ColiBox metoderne blev fluorescensintensitet målt på en Victor X2 Multilabel Plate Reader med et umbelliferone filtersæt (Perkin Elmer). Dette instrument muliggjorde samtidig måling af op til 96 prøver i forbindelse med metodeoptimeringer (Figur 9.3). Efterfølgende blev prøver også målt med et bærbart fluorometer for at vurdere muligheden for at overføre metoderne til en mere enkel og mobil platform (Figur 9.4). Til disse målinger blev benyttet methacrylat kuvetter og et QuantiFluo-ST Fluorometer (Promega).

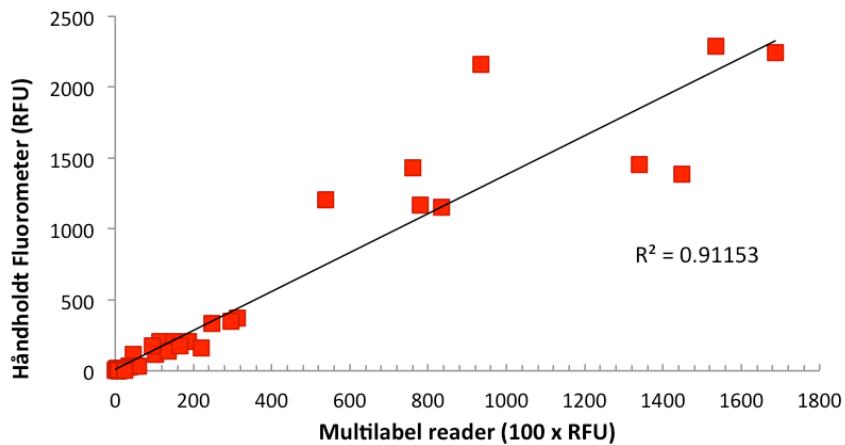


Figur 9.3 Multilabel Plate Reader til fluorescensmåling.



Figur 9.4. Håndholdt fluorometer til fluorescensmåling.

Parallelle målinger af fluorescerende prøver på henholdsvis et laboratorieinstrument (Figur 9.3) og et håndholdt instrument (Figur 9.4) viste tilfredsstillende overensstemmelse mellem de to sæt målinger (Figur 9.5). Specielt de lave fluorescensintensiteter gav god overensstemmelse. Et håndholdt fluorometer er langt billigere og mere enkelt at bruge og muliggør således anvendelse af fluorescensbaserede metoder udenfor et traditionelt laboratoriemiljø. Dette kan være relevant for mindre vandforsyninger og/eller ved brug i felten.



Figur 9.5. Parallelle målinger af fluorescerende prøver på hhv. et laboratorieinstrument (Victor X2 Multilabel Plate Reader) og et håndholdt instrument (QuantiFluor-ST fluorometer). RFU: Relative Fluorescent Units.

10. FIB:Lite -early-warning

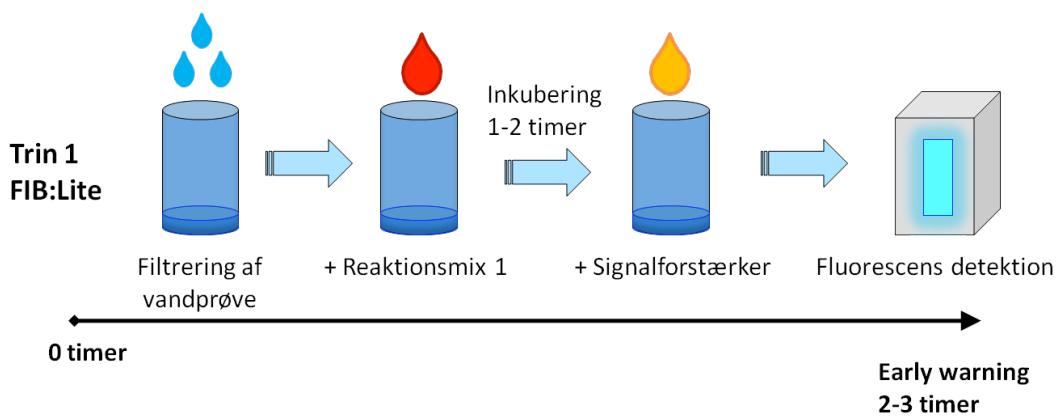
Dette afsnit beskriver nogle af de resultater, der er opnået i forbindelse med udvikling af metoden FIB:Lite til hurtig påvisning af fækale indikatorbakterier i drikkevand. FIB:Lite er første del af ColiBox konceptet (Figur 10.1).



Figur 10.1 FIB:Lite udgør det første trin i ColiBox værktøjskassen.

I FIB:Lite benyttes et reaktionsmix bestående af udvalgte fluorescerende enzymsubstrater i kombination med co-substrater, buffere og permeabilisatorer (Figur 10.2). Den generelle fremgangsmåde omfatter:

- Filtrering af 1 L vandprøve
- Tilsætning af FIB:Lite reaktionsmix
- Inkubation i 2 timer ved 30°C
- Tilsætning af signalforstærker
- Måling af fluorescens



Figur 10.2. Forløb af hurtigmetoden FIB:Lite med en analysetid på 2-3 timer.

10.1 Optimering af FIB:Lite

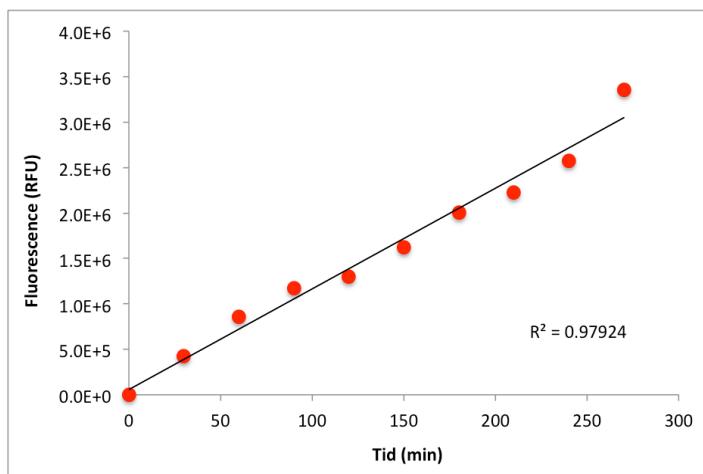
Udviklingen af FIB:Lite blev indledt med en række optimeringsforsøg med fokus på følgende parametre:

- Relevante enzymsubstrater
- Co-substrater
- Buffere og pH
- Substratkonzentrationer (enzymkinetik)
- Inkubationstid
- Inkubationstemperatur
- Permeabilisering
- Signalforstærkere
- Prøvevolumen og filtertyper
- Specificitet og sensitivitet

Eksempler på resultater fra optimeringsforsøgene er præsenteret i de følgende afsnit.

Inkuberingstid

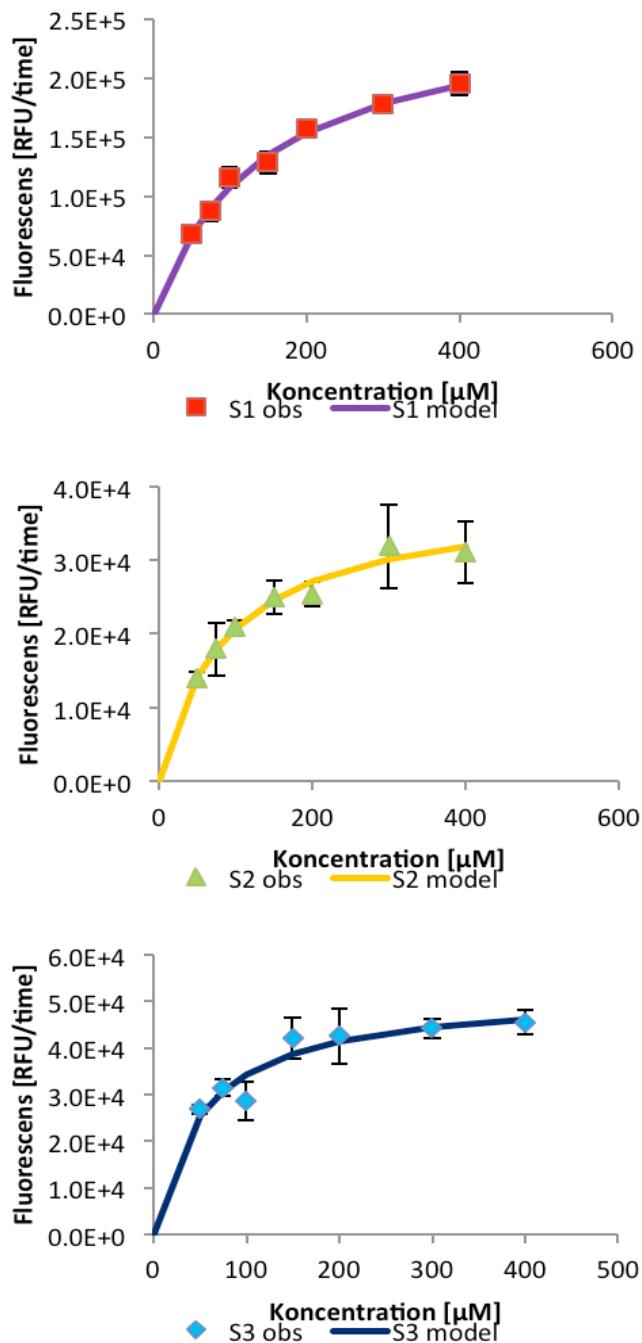
Målet med FIB:Lite er, at analysetiden skal være så kort, at der i løbet af en arbejdssdag kan gives svar på om en vandprøve er kontamineret eller ej. Et eksempel på sammenhængen mellem inkubationstid og fluorescensintensitet for drikkevand forurenset med spildevand er vist i Figur 10.3. Disse forsøg viste, at der er en lineær sammenhæng mellem inkubationstiden og fluorescensintensitet i minimum 4 timer. Det er således muligt at øge metodens følsomhed ved at øge inkubationstiden. Efterfølgende blev 2 timer valgt som generel inkubationstid for FIB:Lite som et kompromis mellem analysetid og følsomhed. I enkelte forsøg er 1 time dog også blevet benyttet for at give et hurtigere svar.



Figur 10.3. Sammenhængen mellem fluorescenssignal og inkubationstid for FIB:Lite.

Kinetik

For at finde den optimale substratkonzentration for FIB:Lite, blev reaktionshastigheden undersøgt for forskellige substratkonzentrationer i intervallet 50-400 μM . Figur 10.4 viser eksempler på sammenhængen mellem koncentration af fluorescerende substrater og reaktionshastigheden (RFU/time) for vandprøver med fækal forurening.



Figur 10.4. Sammenhængen mellem tre substratkonzentrationer (S1, S2, S3) og reaktionshastighed for vandprøver med fækale bakterier. Den optrukne linie ("model") viser tilnærmet Michaelis-Menten kinetik.

På baggrund af data i Figur 10.4 blev der beregnet tilnærmede halvmætningskonstanter ($K_{m(app)}$) for de forskellige substrater ved brug af tilnærmet Michaelis-Menten kinetik. De beregnede halvmætningskonstanter lå i området 53 - 144 μM (Tabel 10.1). Den maksimale reaktionshastighed fås således ved brug af substratkonzentrationer $>100 \mu\text{M}$ hvilket blev implementeret i de efterfølgende forsøg.

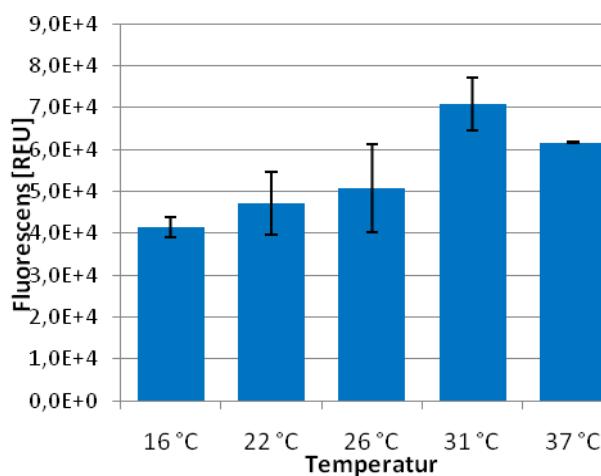
Tabel 10.1. Beregnede halvmætningskonstanter ($K_{m(app)}$) og maksimale hastigheder (V_{max}) for substrater i FIB:Lite.

	S1	S2	S3
$K_{m(app)} [\mu\text{M}]$	144	88	53
$V_{max} [\text{RFU/time}]$	$2,65 \cdot 10^5$	$3,89 \cdot 10^4$	$5,23 \cdot 10^4$

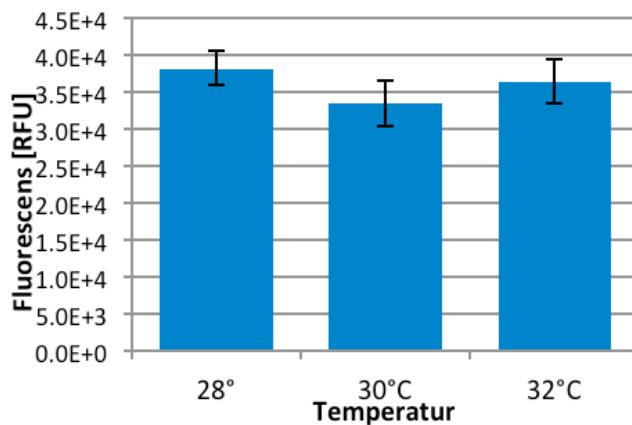
Inkubationstemperatur

Temperaturen kan have stor indflydelse på hastigheden af enzymkatalyserede reaktioner i bakterier. For at finde den optimale inkubationstemperatur for FIB:Lite blev der foretaget forsøg, hvor parallelle vandprøver med fækal forurening blev filtreret og inkuberet med FIB:Lite reagenser ved inkubationstemperaturer mellem 16 og 37 °C (Figur 10.5). Forsøgene viste den største aktivitet (hastighed) for FIB:Lite reaktionerne ved temperaturer omkring 31 °C (Figur 10.5).

Efterfølgende blev der lavet opfølgende forsøg, hvor et mindre temperaturinterval omkring 31 °C blev undersøgt (Figur 10.6). I disse forsøg sås der ikke nogen større forskel i reaktionshastighed i intervallet mellem 28 og 32 °C og det blev efterfølgende besluttet at bruge 30 °C som generel inkubationstemperatur.



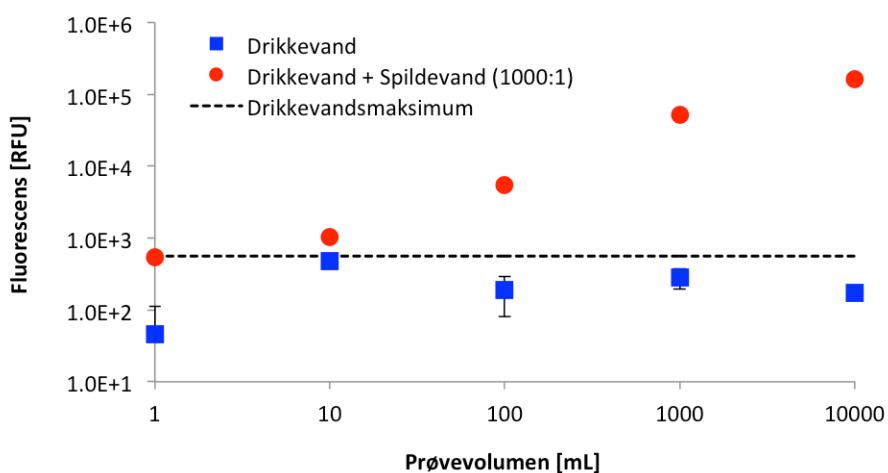
Figur 10.5. Effekt af inkubationstemperatur på reaktionshastighed i FIB:Lite .



Figur 10.6. Effekt af inkubationstemperatur på reaktionshastighed i FIB:Lite ved temperaturer omkring 30 °C.

Prøvevolumen

Filtrering af et større volumen drikkevand (>100 mL) kan bruges til at øge følsomheden ved svage forurenninger og til generelt at opkoncentrere en mere repræsentativ mængde biomasse. Større prøvevolumener øger dog også mængden af naturlige grundvandsbakterier, hvilket kan påvirke specifik detektionen af fækale indikatorbakterier. Effekten af prøvevolumen blev undersøgt i forsøg med drikkevand forurennet med spildevand i forholdet 1000:1 (Figur 10.7). Forsøgene viste, at filtrering og analyse af 100 mL vand var tilstrækkeligt til at påvise forurenningen men at analyse af et større prøvevolumen (1-10 L) gav et endnu tydeligere signal (Figur 10.7). Et andet væsentligt resultat af disse forsøg var, at baggrunds niveaueret for fluorescens i uforurennet drikkevand var relativt konstant og ikke steg med stigende prøvevolumen (Figur 10.7). Dermed var der baggrund for at anvende større prøvemængder for at øge følsomheden af FIB:Lite og det blev efterfølgende besluttet at anvende 1 L drikkevand som det generelle prøvevolumen.



Figur 10.7. Betydning af prøvevolumen for detektion spildevandsforurening af drikkevand. Den stippled linje angiver det maksimale fluorescensniveau for uforurennet drikkevand ("drikkevandmaksimum").

10.2 Validering af FIB:Lite

For at validere FIB:Lite er der blevet udført forskellige analyser herunder bestemmelse af detektionsgrænse, sensitivitet og specificitet. Derudover blev FIB:Lite sammenlignet med en nyere hurtigmetode der også benytter fluorescerende enzymsubstrat til at påvise *E. coli* (Wildeboer et al. 2010). I de følgende afsnit præsenteres resultaterne af disse analyser.

Bestemmelse af detektionsgrænsen for FIB:Lite

Detektionsgrænsen (Lower Limit of Detection; LOD), er den laveste målelige koncentration, hvor det med en vis statistisk sikkerhed kan siges, at en prøve adskiller sig fra en kontrolprøve. I denne rapport beregnes detektionsgrænsen ud fra ligning 1, på baggrund af målinger af drikkevand.

$$LOD = DV_{mittel} + 3 \cdot \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

hvor

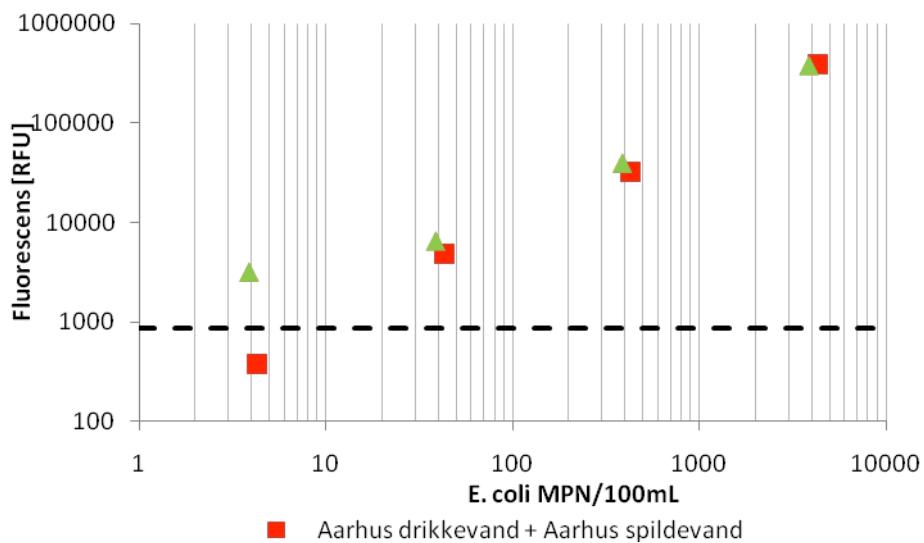
DV_{mittel} er middelværdien for drikkevand (fluorescens)

SD er standardafvigelsen for målingerne

n er antallet af målinger i serien

For at finde detektionsgrænsen for FIB:Lite blev der analyseret drikkevand udtaget fra private husinstallationer i Aarhus og Sønderborg. Udvalgte vandkvalitetsparametre for de 2 vandforsyninger kan ses i Figur 9.1. Som forureningskilde blev benyttet urensset spildevand fra Egå Renseanlæg og urensset spildevand fra Aarhus og Renseanlæg Vest i Aalborg.

I forsøgene blev det undersøgt hvor lav en koncentration af forurening, der kunne måles for prøver med et volumen på 1 L og en inkubationstid på 1 time for FIB:Lite. Det blev lavet blandinger af drikkevandsprøver tilsat spildevand i forholdet: 1.000:1, 10.000:1, 100.000:1 og 1.000.000:1. For drikkevandsprøver fra Sønderborg tilsat spildevand gav en fortyndning svarende til 4 *E. coli* per 100 mL et signal over detektionsgrænsen (Figur 10.8). Drikkevandsprøverne fra Aarhus tilsat spildevand gav et signal tydeligt over detektionsgrænsen ved en forurening svarende til ca. 40 *E. coli* per 100mL (Figur 10.8).



Figur 10.8. FIB:Lite fluorescens for drikkevandet forurennet med forskellige koncentrationer af spildevand.

En forskel i fluorescens og dermed detektionsgrænse for *E. coli* i forurenede vandprøver hænger formentlig sammen med kemiske og biologiske forskelle i vandet fra forskellige geografiske områder. Det vil således kræve specifikke forsøg at fastslå den præcise detektionsgrænse for en konkret vandtype. Det vurderes således ikke realistisk at kunne påvise svage forurenninger ned til 1 *E. coli* per 100 mL hvis en inkubationstid på kun 1-2 timer anvendes men derimod sandsynligt at kraftigere forurenninger på 10-100 *E. coli* per 100 mL vil kunne detekteres.

Specificitet og sensitivitet

FIB:Lite er valideret ved test af en række coliforme og non-coliforme bakterier. Metodens evne til at korrekt kunne identificere en forurening blev undersøgt ved at analysere 24 renkulturer hvoraf 14 indeholder mulige target bakterier.

Sensitivitet og specificitet er udtryk for hvor god en metode er til at korrekt kunne identificere sande positive og sande negative prøver og blev beregnet ved hjælp af ligning (2) og ligning (3).

$$\text{sensitivitet} = \frac{\text{sande positive}}{(\text{sande positive} + \text{falske negative})} \quad (2)$$

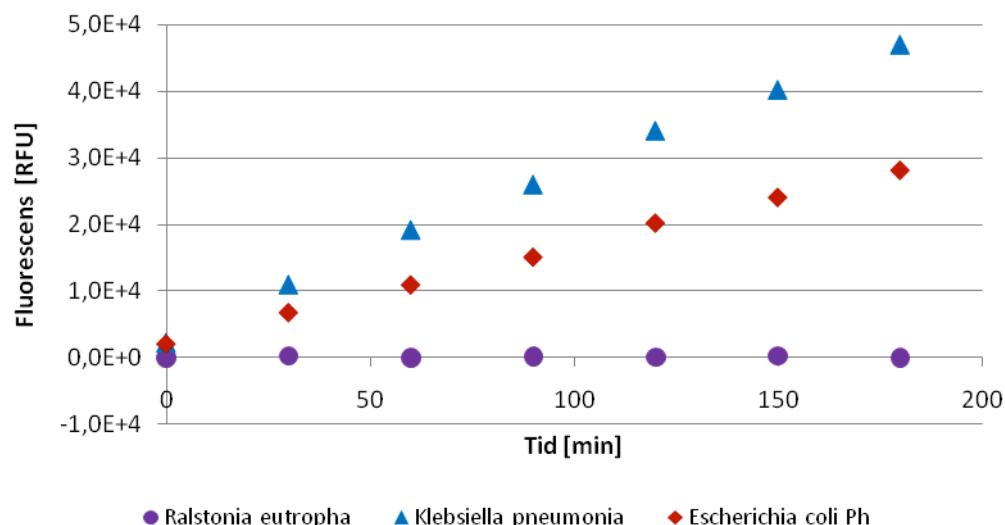
$$\text{specificitet} = \frac{\text{sande negative}}{(\text{sande negative} + \text{falske positive})} \quad (3)$$

Sensitivitet udtrykker således sandsynligheden for at en positiv vandprøve reelt er forurennet, mens specificitet udtrykker sandsynligheden for at en negativ vandprøve reelt er uforurennet. Tabel 10.2 viser resultater fra forsøg med 24 renkulturer og viser, at alle coliforme bakterier gav et positivt reaktion mens enterokokker og non-target bakterierne hovedsagligt gav negativt resultat.

Tabel 10.2. Positive og negative resultater for sensitivitet og specificitets analyse

Bakteriestamme	FIB:Lite reaktion
<i>Citrobacter koseri</i>	+
<i>Escherichia alberti</i>	+
<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	+
<i>Escherichia coli 13706</i>	+
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+
<i>Escherichia coli ED5a</i>	+
<i>Escherichia coli LUX/GFP</i>	+
<i>Enterococcus facium</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Enterococcus mundtii</i>	+
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	-
<i>Enterococcus pallens</i>	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+
<i>Ralstonia eutropha</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aerococcus ruber</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
<i>Bacillus megaterium</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-

I Figur 10.9 er vist et eksempel på udviklingen af fluorescens over 3 timer for tre bakteriestammer hhv. *E. coli* (target), *K. pneumonia* (target) og *R. eutropha* (non-target). *E. coli* (target) og *K. Pneumonia* (target) producerede som forventet fluorescens i FIB:Lite mens *R. eutropha* var negativ.



Figur 10.9 Fluorescensudvikling for tre bakteriestammers med FIB:Lite

Ud fra resultater i Tabel 10.2 er sensitiviteten og specifiteten for FIB:Lite beregnet (Tabel 10.3).

Tabel 10.3 Beregnet sensitivitet og specifitet af FIB:Lite

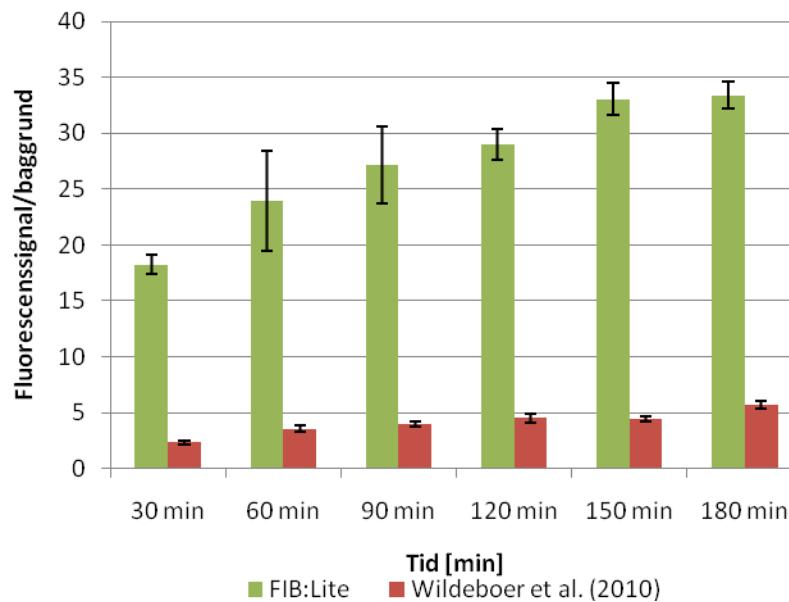
	Forventet positiv	Forventet negativ
Positivt resultat	10	0
Negativt resultat	4	10
	Sensitivitet 71 %	Specificitet 100 %

Sammenligning af to hurtigmetoder

For at undersøge validiteten af FIB:Lite metoden i forhold til nyere fluorescensbaserede hurtigmetoder blev der lavet en sammenligning med en metode beskrevet af Wildeboer et al. (2010). I denne metode påvises fækal forurening ved filtreres 100 mL vand og inkubere i 30 min med det fluorescerende substrat, 4-methylumbelliferone-β-D-glucuronide (Wildeboer et al. 2010). I sammenligningen af FIB:Lite med Wildeboer metoden blev der benyttet drikkevand forurennet med spildevand (1000:1) og der blev udtaget delprøver til analyse med de to metoder for hver 30 min (Figur 10.10).

Sammenligningen viste, at FIB:Lite medførte hurtigere og kraftigere fluorescens end den publicerede Wildeboer metode (Figur 10.10). Efter 30 min inkubation var forholdet mellem

signal og baggrund 2 for Wildeboer metoden mens forholdet mellem signal og baggrund for FIB:Lite var 18. Efter de første 30 min steg fluorescenssignalet ca. 40% pr time for FIB:Lite (Figur 10.10). FIB:Lite viste således tydeligere fluorescens både ved korte og længere inkuberinger. Derudover er detektionsgrænsen (LLOD) for Wildeboer metoden forholdsvis høj da den er beregnet til 700 *E. coli*/100mL mens resultaterne for FIB:Lite viste en detektionsgrænse svarende til <100 *E. coli* /100mL.



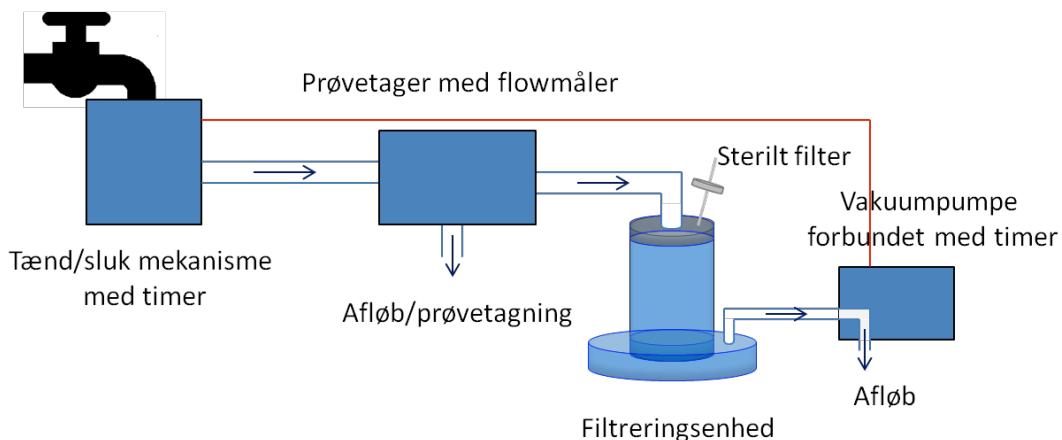
Figur 10.10. Tidsserie med sammenligning af FIB:Lite og en hurtigmetode beskrevet af Wildeboer et al. (2010)

10.3 Udvikling af ColiBox udstyr

Tanken bag ColiBox systemet er at det skal være lettere at kunne udtagte prøver og kunne analysere dem indenfor en arbejdssdag. Derfor vil det være en fordel at analyseudstyret er enkelt, ikke kræver et laboratorium og har potentialet for automatisering.

Prøvetagning og filtrering

Figur 10.11 viser et eksempel på et samlet koncept for automatiseret prøvetagning og filtrering. En timerfunktion styrer prøvetagning over eksempelvis 1-24 timer og når en given vandmængde er sendt videre til filtreringsenheden vil prøvetageren med indbygget flowmåler divergere vandstrømmen til afløb eller anden prøvetagning. En vakuumpumpe vil trække vandet gennem et filter hvorefter vandet løbet til afløb.



Figur 10.11. Eksempel på prøvetagning og filtrering

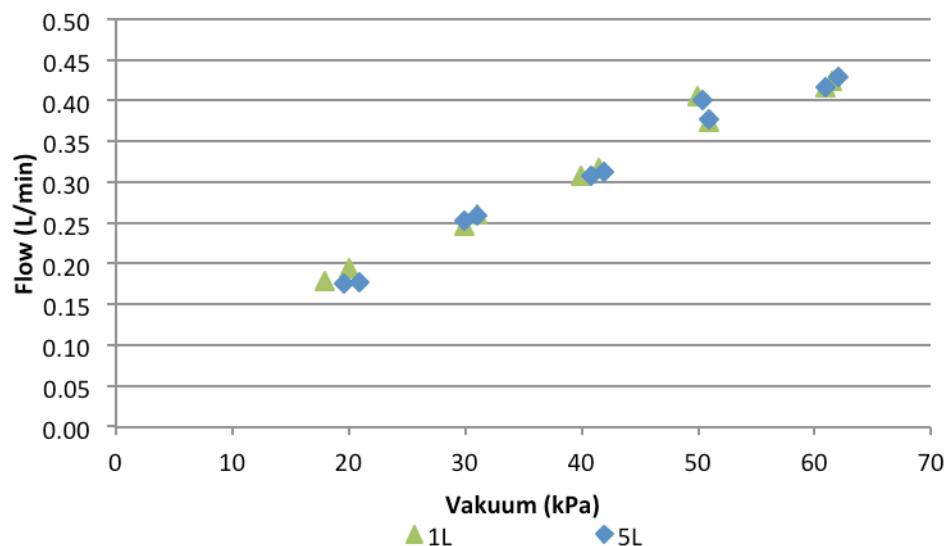
Filtreringsenhederne består af et filterenhed og en specialfremstillet filterholder (Figur 10.12). Reagenser tilsættes direkte til filterenheden og hele enheden overføres til inkubering. Filterenheden er udstyret med en Biosart® High-flow Monitor med et membranfiltrer (47 mm- 0.45 µm) og kan købes som engangsenheder (Sartorius®).



Figur 10.12. Filtreringsenhed med holder

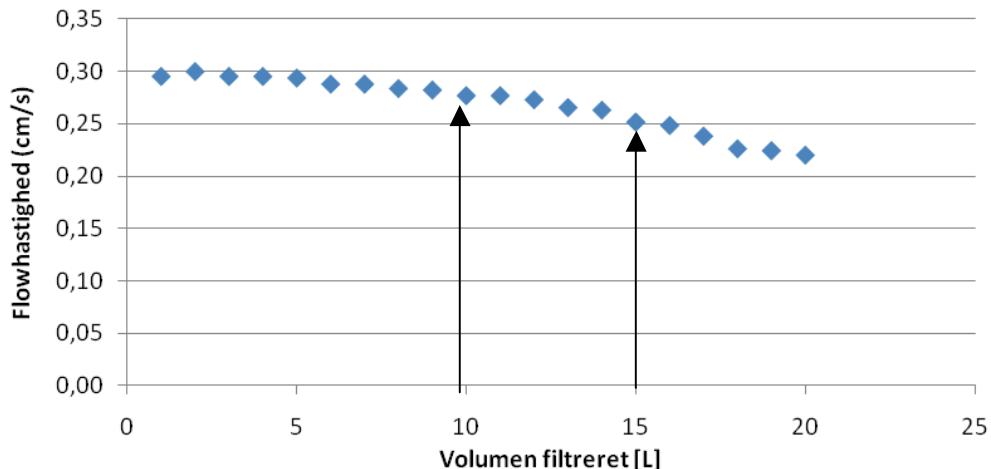
Undersøgelse af begrænsning på vandprøvevolumen

Ved at benytte større vandprøver til mikrobiologiske analyser ($>100\text{ mL}$) øges følsomheden og der opnås mere repræsentative prøver, men større volumener betyder også længere filtreringstid og større risiko for filtertilstopning. Effekten af vakuum og vandvolumen på filterflow blev undersøgt i forsøg med filtreringsenheden i Figur 10.12. Først blev det undersøgt, hvor lang tid filtrering af hhv. 1L og 5L drikkevand vil tage ved 5 forskellige vakuum, for derudfra at estimere tidsforbruget ved større vandvolumener samt undersøge sammenhængen mellem flow og vakuum (Figur 10.13). Ved det højeste vakuum var flowhastigheden 0,43L/min både ved 1L og ved 5L drikkevand, hvilket giver en filtreringstid på godt 2 min for 1L prøver og knap 12 min for 5L prøver.



Figur 10.13. Filterflow som funktion af vakuum ved filtrering af 1L og 5L drikkevand.

Hastigheden hvormed det anvendte filter blev tilstoppet blev undersøgt i et separat forsøg (Figur 10.14). 20 drikkevandsprøver på 1L blev filtreret igennem ét filter ved et vakuums på 40 kPa og filtreringstiden per prøve blev noteret, for at undersøge hvordan flowhastigheden ændrede sig med prøvevolumenet. Resultaterne viste et forholdsvis lille fald i flowhastighed ved filtrering af volumener op til ca. 10L (Figur 10.14). Efter filtrering af 10L var flowhastigheden falset med 6% i forhold til det oprindelige flow mens filtrering af 15L medførte et fald på 15%.



Figur 10.14. Ändring i flowhastighed som funktion af filtreret volumen. Pilene angiver hhv. 10L og 15L

Resultater fra filtreringsforsøgene viste, at det var muligt at filtrere op til 10 L vand gennem filtreringsenheden indenfor 30 min uden væsentlig tilstopning af filteret (Tabel 10.4).

Tabel 10.4. Filtreringstid for forskellige vandvolumener ved et vakuump på 60-70 kPa.

Volumen	100 mL	1.000 mL	10.000 mL
Tid	12 sek	2 min	23 min

Inkuberingsenhed

For at få et optimalt signal skal FIB:Lite prøver helst inkuberes ved 30°C med omrøring. For at brugere kan være uafhængige af et laboratorium med traditionelt udstyr, er der i projektet på Aalborg Universitet udviklet en simpel kombineret inkubationsboks med indbygget rystefunktion (Figur 10.15).



Figur 10.15. ColiBox inkubationsboks med varme- og rystefunktion.

Inkubationsboksen består af et varmeelement, en blæser og en vertikal vippefunktion, der medfører omrøring i prøven. Den ønskede inkubationstemperatur styres fra en kontrolboks og der er plads til to filtreringsenheder i inkubationsboksen (Figur 10.15).

Inkubationsboksen er en lille kompakt enhed, på størrelse med en almindelig værkøjskasse og vil derfor nemt vil kunne medbringes i felten (Tabel 10.5).

Tabel 10.5. Mål og vægt for filtreringsenhed og inkubationsboks.

	Filtreringsenhed med holder	Inkubationsboks
Mål (h x l x b) [cm]	10 x 8 x 8	16 x 33 x 21
Vægt [kg]	0,17	3,5

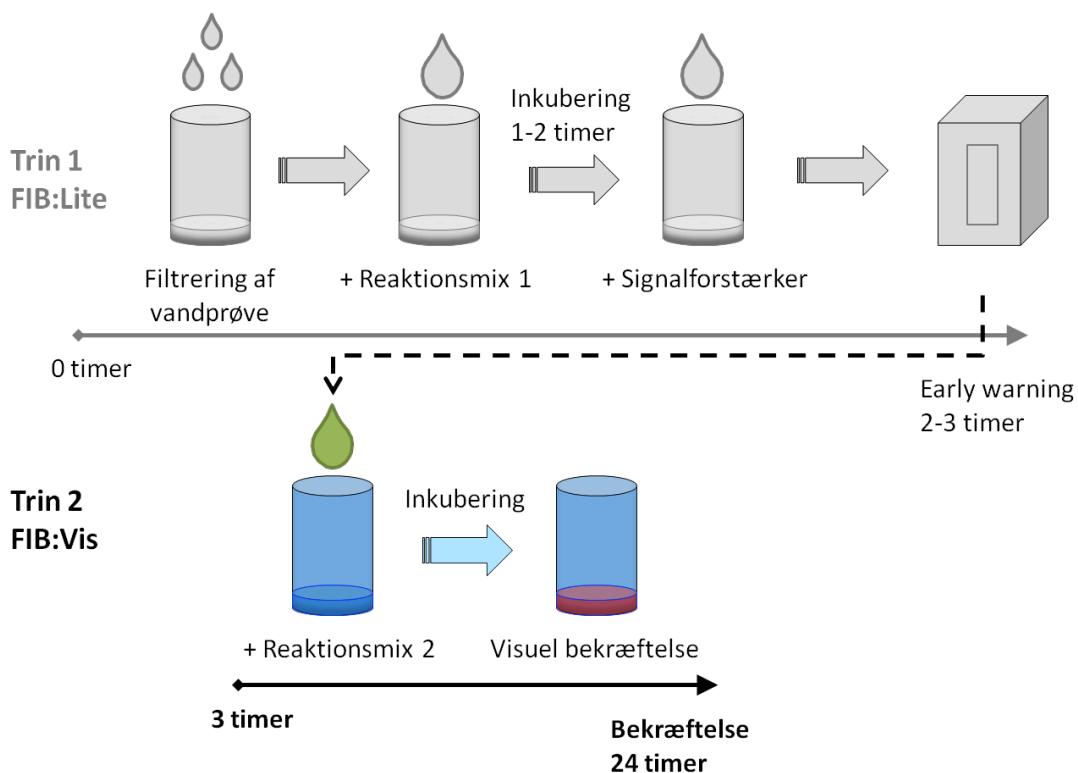
11. FIB:Vis -visuel bekræftelse

Dette afsnit beskriver nogle af de resultater, der er opnået i forbindelse med udvikling af metoden FIB:Vis til visuel eftervisning af resultater opnået med hurtigmetoden FIB:Lite (Figur 11.1).



Figur 11.1 FIB:Vis er andet trin i ColiBox konceptet og giver mulighed for at bekræfte resultater opnået med hurtigmetoden FIB:Lite.

FIB:Vis metoden udnytter den samme filtreringsenhed, der indgår i FIB:Lite og en prøve, der allerede er undersøgt med denne metode, kan således videreføres til bekræftelse med FIB:Vis (Figur 11.2). FIB:Vis benytter kromogene enzymsubstrater og resultatet kan aflæses visuelt efter en inkubationstid på 20 timer.



Figur 11.2 FIB:Vis bygger videre på FIB:Lite filterenheden og ses som Trin 2 i figuren.

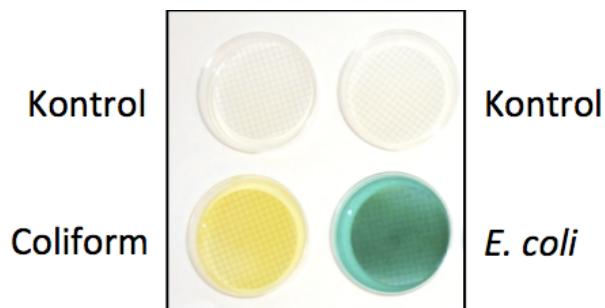
Generel fremgangsmåde for FIB-Vis:

- Tilsætning af Reaktionsmix 2 til filtreringsenhed fra FIB:Lite
- Inkubation i 20 timer ved 36°C
- Aflæsning af farvereaktion

Under udviklingen af FIB:Vis metoden blev en række parametre herunder:

- Type af kromogene substrater for coliforme bakterier
- Type af kromogene substrater for *E. coli*
- Sammensætning af reaktionsbuffer
- Inkubationstid

Det optimerede FIB:Vis består af et selektivt vækstbaseret medium med 2 kromogene enzymsubstrater. Mediet indeholder en optimeret sammensætning af organiske stoffer som fremmer bakteriel vækst og enzymaktivitet hos fækale indikatorbakterier mens et overfaldeaktivt stof begrænser vækst af andre mikroorganismes. I FIB:Vis mediet ses forekomst af coliforme bakterier som en kraftig gulfarvning af mediet mens *E. coli* ses som en grøn farve (Figur 11.3)

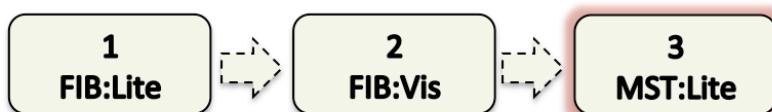


Figur 11.3 Visuel bekræftelse af forekomst af coliforme bakterier og *E. coli* ved hjælp af FIB:Vis

FIB:Vis mediet er valideret ved test af renkulturer med coliforme og non-coliforme bakterier fra Tabel 10.1 herunder *C. koseri*, *E. alberti*, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 13706, *K. pneumonia*, *E. aerogenes*, *E. coli* ED5a, *E. coli* LUX/GFP, *E. facium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. pallens*, *E. casseliflavus*, *R. eutropha*, *P. aeruginosa*, *A. ruber*, *B. cereus*, *P. stutzeri*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *P. putida*, *S. aureus*, *P. fluorescens*. Enterokokker og non-coliforme bakterier udviser generelt negativ respons i testen mens alle *E. coli* stammer gav positiv reaktion.

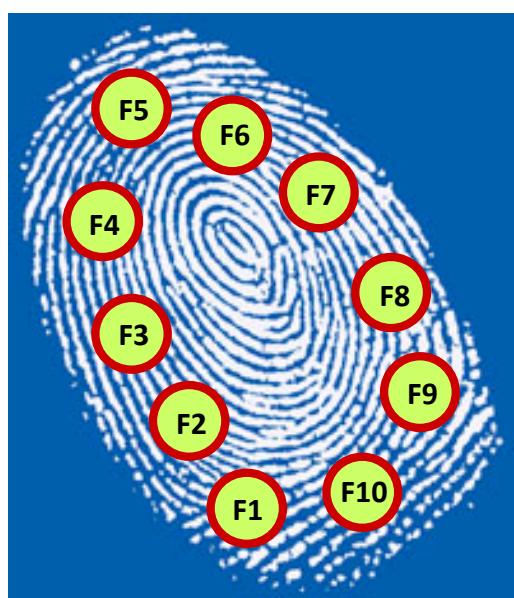
12. MST:Lite -mikrobiel kildesporing

Hvis forekomst af en mikrobiel forurening i en drikkevandsprøve er blevet påvist med FIB:Lite og eventuelt FIB:Vis, kan det være nyttigt at karakterisere forureningen yderligere for at skelne mellem forskellige forureningstyper. Dette afsnit beskriver nogle af de resultater, der er opnået i forbindelse med udvikling og afprøvning af en metode til fingerprinting af vandprøver ved hjælp af enzymaktivitet (MST:Lite). MST:Lite er sidste trin i ColiBox konceptet og giver mulighed for foreløbig karakterisering af en mikrobiel forurening (Figur 12.1).



Figur 12.1 MST:Lite kan indgå som et sidste trin i ColiBox konceptet.

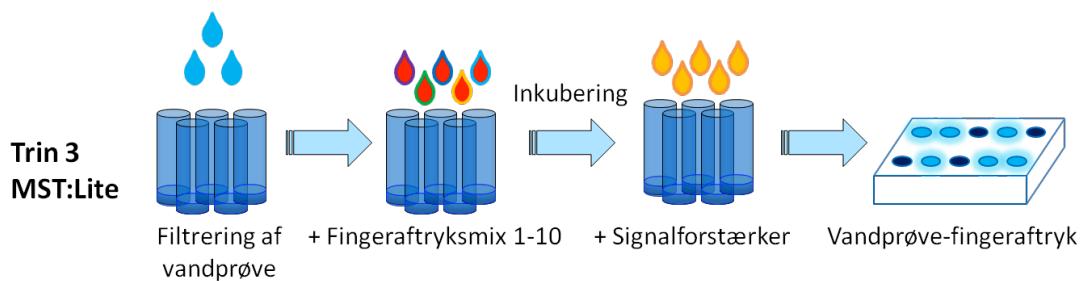
MST:Lite er en enkel og forholdsvis hurtig metode, der bygger på principperne omkring "Microbial Source Tracking (MST)" (Roslev og Bukh, 2011). I MST antages det ofte, at forskellige mikrobielle forurenninger besidder mere eller mindre unikke forureningsprofiler (fingeraftryk), der er karakteristiske for den pågældende forureningstype (Roslev og Bukh, 2011). I MST:Lite måles 10 forskellige enzymaktiviteter i en filtreret vandprøve og der anvendes fluorescerende substrat analoger for at etablere et fingeraftryk (profil) for den mikrobielle aktivitet (Figur 12.2).



Figur 12.2 Etablering af forureningsprofil (fingeraftryk) bestående af 10 enzymaktiviteter.

Generel fremgangsmåde for MST:Lite (Figur 12.3):

- Filtrering af 10 x 100mL vandprøve
- Tilsætning af MST:Lite reagensmix til filtre (Fingeraftryksmix F1-F10)
- Inkubation i 2 timer ved 30 °C
- Tilsætning af signalforstærker
- Måling af fluorescens



Figur 12.3. MST:Lite som sidste del af ColiBox (Trin 3).

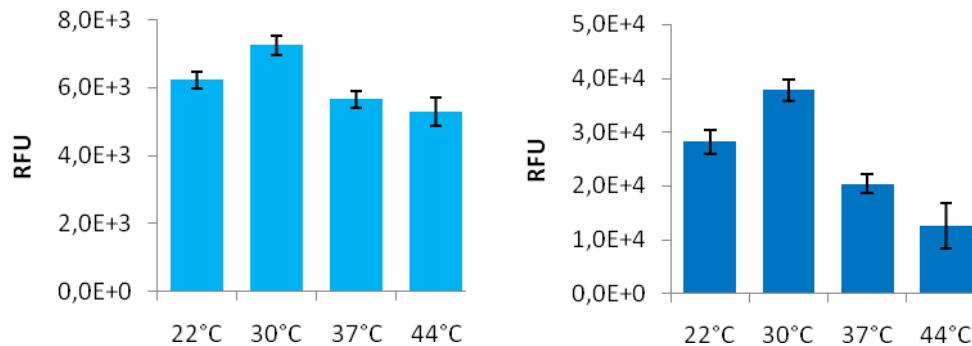
Analysetiden for MST:Lite er 3-4 timer inklusiv filtrering af prøver. Det bedste resultat opnås, hvis der udtages vandprøver nogenlunde samtidig med prøveudtagning til FIB:Lite. I forbindelse med udvikling af MST:Lite blev der først indledende optimering af de enkelte delreaktioner, hvorefter en foreløbig afprøvning er foretaget på forskellige vandtyper.

12.1 Optimering af MST:Lite

Indledningsvis blev en række fluorescerende substrat analoger undersøgt og screenet for evnen til at påvise enzymaktivitet i drikkevand. Derefter blev 10 substrater udvalgt til nærmere analyse. Under udviklingen af MST:Lite metoden blev der for hvert enkelt af de 10 enzymsubstrater optimeret for følgende parametre:

- Koncentrationer af enzymsubstrat
- Sammensætning af reaktionsbuffere
- Inkubationstemperatur
- Inkubationstid
- Signalforstærkere

I figur 12.4 er vist et eksempel på betydningen af inkubationstemperaturen for enzymaktiviteten for 2 substrater, der indgår i MST:Lite. Da der er 10 forskellige substrater i MST:Lite vil analysen blive simplere at udføre hvis der kan findes en fælles inkubationstemperatur. På baggrund af screeningerne blev 30 °C valgt som inkubationstemperatur.



Figur 12.4 Eksempel på betydning af inkubationstemperatur for reaktionshastigheden i MST:Lite.

12.1 Validering af MST:Lite

I forsøgsperioden blev der udtaget vandprøver fra private husinstallationer i forskellige byer til forsøg med både FIB:Lite og MST:Lite. Derudover blev der lavet fingeraftryk af forskellige forureningstyper i laboratoriet på baggrund af kendte forureningskilder.

Undersøgte vandtyper:

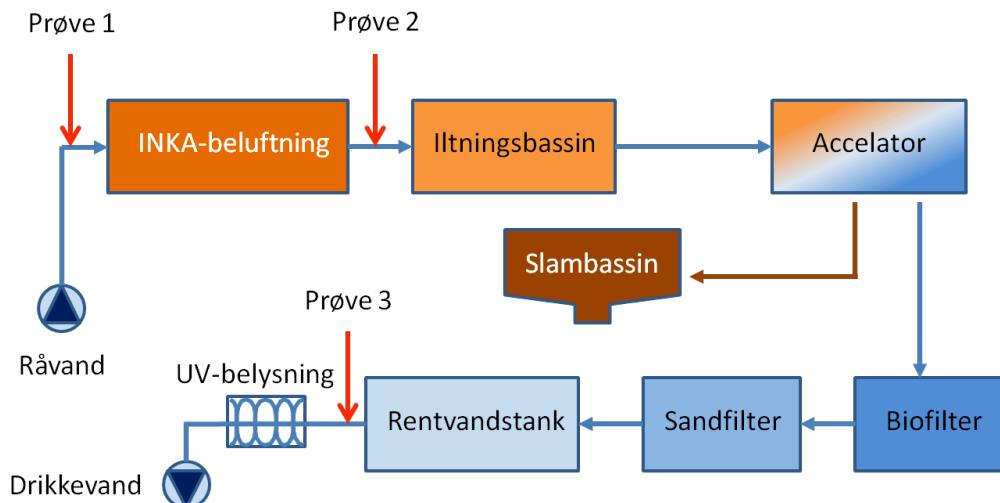
- Drikkevand udtaget fra privat husstand i Aalborg (Aalborg Forsyning, Vand A/S)
- Drikkevand udtaget fra privat husstand i Aarhus (Aarhus Vand A/S)
- Drikkevand udtaget fra privat husstand i Sønderborg (Sønderborg Vandforsyning A/S)
- Drikkevand udtaget på Skagen Vandværk II samt fra privat husstand i Skagen (Frederikshavn Forsyning A/S)

Undersøgte forureningstyper

- Råt spildevand fra Aalborg Vest Renseanlæg (Aalborg Forsyning A/S)
- Råt spildevand fra Egå Renseanlæg (Aarhus Vand A/S)
- Simuleret overfladevand
- Ældet vand i PEX-rør

Skagen Vandværk

Skagen Vandværk II har udvidet vandbehandling med adskillige rensetrin før grundvandet kan anvendes til drikkevand (Figur 12.5). I undersøgelsen er der taget vandprøver mellem de forskellige rensetrin for at undersøge hvordan vandets fingeraftryk ændrer fra råvand til færdigt drikkevand (Figur 12.6). Derudover blev der taget en vandprøve fra en husinstallation for at sammenligne med situationen på ledningsnettet.

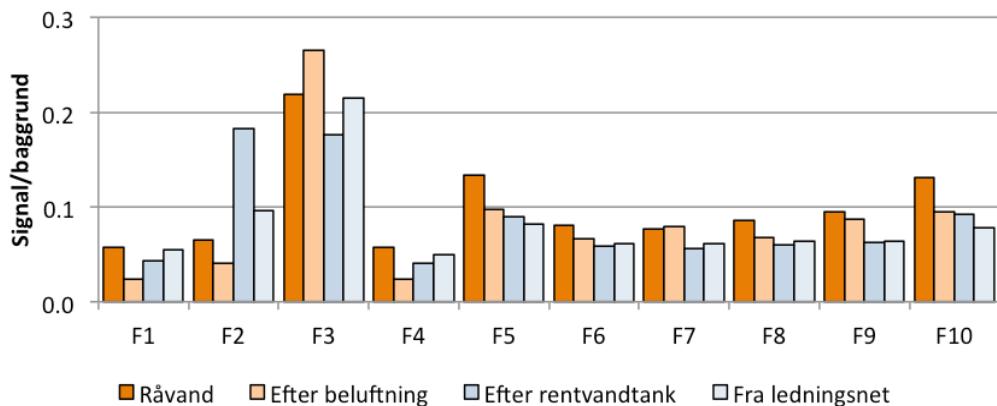


Figur 12.5. Oversigt over vandbehandlinger på Skagen Vandværk II. De røde pile indikerer, hvor der er taget vandprøver.



Figur 12.6 Prøver fra Skagen, fra venstre mod højre: Råvand (I), efter INKA beluftning (II), efter rentvandstank (III) og fra ledningsnettet (IV).

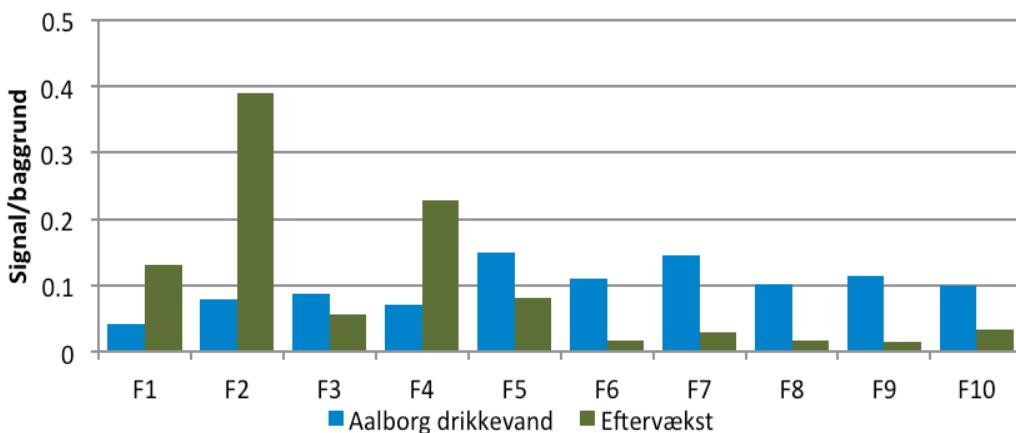
Der var en tydelig visuel forskel i vandprøverne fra de fire prøvesteder (Figur 12.6). Det enzymatiske fingeraftryk MST:Lite viste også forskelle i profilerne fra de forskellige prøvesteder (Figur 12.7). Der bemærkes specielt en forskel på profilen for råvand i forhold til profilerne for rentvandstank og ledningsnet.



Figur 12.7 MST:Lite profil for vandprøver fra Skagen Vandværk II.

Drikkevand med forskellige forurenninger

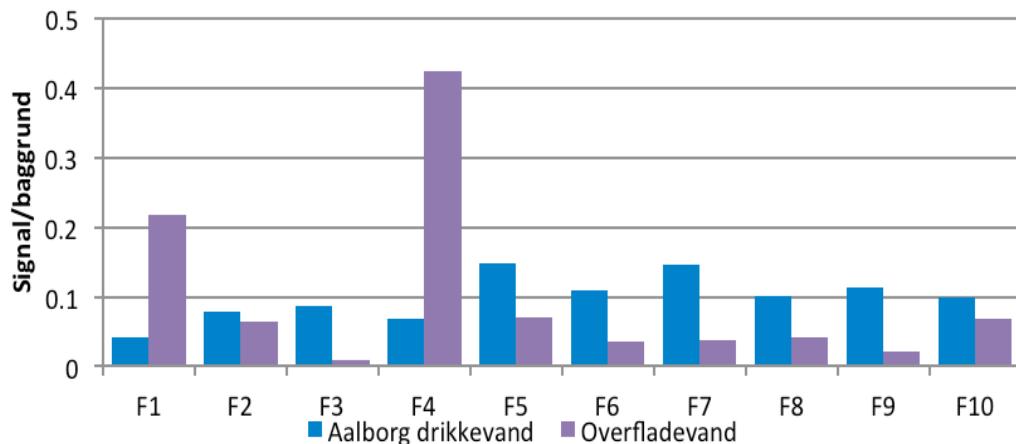
I projektet blev der målt MST:Lite profiler for simulerede forureningssituationer og situationer med nedsat vandkvalitet som følge af eftervækst. I Figur 12.8 er vist et eksempel på MST:Lite profiler for drikkevand med og uden eftervækst. I forsøget blev vand fra Aalborg Vand ældet i PEX rør ved 22 °C i 120 timer og kmtallet målt ved 22 °C (DS/EN ISO 6222) steg fra 18 CFU ml⁻¹ til >400 CFU ml⁻¹ for det ældede vand. Der ses en tydelig forskel i MST:Lite profil for frisk og ældet vand og specielt for substraterne F1, F2 og F4 blev der observeret øget aktivitet i vandet med eftervækst mens der blev observeret lavere aktivitet for F6-F10 (Figur 12.7).



Figur 12.7. MST:Lite profil for drikkevand fra Aalborg Vand med og uden eftervækst.

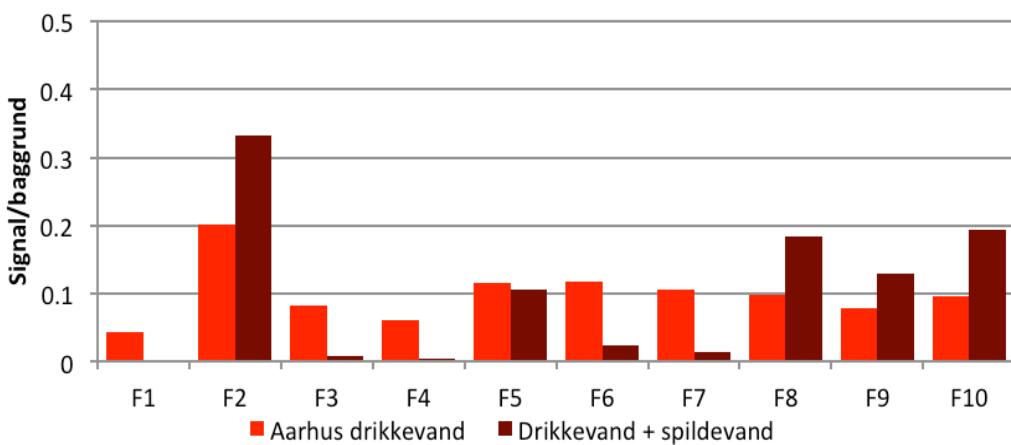
I Figur 12.8 er vist et eksempel på MST:Lite profil for drikkevand tilsat simulert overfladevand. Det simulerede overfladevand bestod af tørvejord opslemmet i demineraliseret vand, hvorefter det blev tilsat drikkevand fra Aalborg Vand til en koncentration på 1 mg jord L⁻¹. Forurenningen medførte ingen målbar forekomst af *E. coli* eller andre coliforme bakterier (> 1 CFU 100 mL⁻¹). Der ses en forskel i MST:Lite profil for

drikkevand med og uden tilsat simuleret overfaldevand og specielt for substraterne F1 og F4 blev der observeret øget aktivitet i det forurenede vand mens der blev observeret lavere aktivitet for F3 og F5-F10 (Figur 12.8).



Figur 12.8 MST:Lite profil for drikkevand fra Aalborg Vand med og uden tilsat overfladevand.

I Figur 12.9 er vist et eksempel på MST:Lite profil for drikkevand fra Aarhus Vand tilsat urensset spildevand i forholdet 1000:1 (1 %). Der ses en tydelig forskel i MST:Lite profilen for forurennet og uforurennet vand og specielt for substraterne F2, F8, F9 og F10 blev der observeret øget aktivitet i det forurenede vand mens der blev observeret lavere aktivitet for F1, F3, F4, F6 og F7 (Figur 12.9). Tilsvarende forsøg med blev lavet med drikkevand fra henholdsvis Aalborg Vand og Sønderborg Vand og resulterede i sammenlignelige forureningsprofiler. Det bemærkes endvidere, at profilerne for det spildevandforurenede vand (Figur 12.9) har en anderledes profil end vandet forurenede med simuleret overfladevand (Figur 12.8) og vand med eftervækst (Figur 12.7). Disse pilotforsøg antyder således, at der er potentiale for at adskille forskellige forureningstyper med MST:Lite. Dette vil imidlertid kræve yderligere test og validering herunder inddragelse af flere forskellige vand- og forureningstyper.



Figur 12.9. MST:Lite profil for drikkevand fra Aarhus Vand med og uden tilsat spildevandsforurening

13. Konklusioner og perspektiver

I ColiBox er der fokuseret på udvikling og validering af enkle og hurtige metoder til påvisning og karakterisering af fækale forurenninger i dansk drikkevand. Projektet har resulteret i udvikling af et koncept bestående af 3 elementer:

1. FIB:Lite -en metode til hurtig påvisning af fækale indikatorbakterier ("early warning").
2. FIB:Vis -en metode til bekræftelse af resultater opnået med hurtigmetoden FIB:Lite.
3. MST:Lite -en metode til enkel karakterisering af mikrobielle forurenninger.

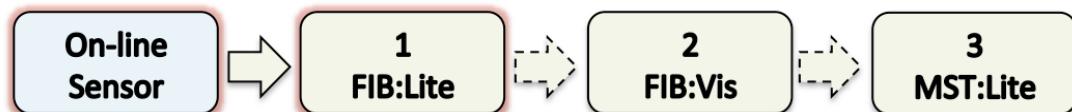
FIB:Lite. En tidlig advarsel om mulige mikrobielle overskridelser i en vandforsyning, vil kunne betyde at forureningsindsats og opfølgende aktiviteter kan iværksættes hurtigere end normalt. Dette er muligt hvis man accepterer at mange hurtigmetoder med kort analysetid ikke altid har samme specifitet og sensitivitet som traditionelle dyrkningsbaserede metoder. Med den optimeret fluorescensbaserede FIB:Lite metode var det muligt på få timer at detektere fækale forurenninger svarende til 4-40 *E. coli*/100 mL. Disse resultater blev opnået ved analyse af 1 L drikkevand og en inkubationstid på 2 timer, men ønskes en lavere detektionsgrænse (LLOD) kan dette opnås ved anvendelse af en længere inkubationstid og/eller filtrering af større vandmængder (5-10 L). Et vandvolumen op til 10 L kan filtreres på <30 min eller alternativt udtages som døgnprøver. Større vandvolumener medfører ikke øget reagensforbrug. FIB:Lite metoden kan tilpasses kompakt (mobilt) måleudstyr, der ikke kræver specielle laboratoriefaciliteter. En early warning om eventuelle overskridelser vil kunne betyde, at en forureningsindsats og afværge kan iværksættes tidligere end normalt.

FIB:Vis. Metoden kan betragtes som et supplement til FIB:Lite og kan udføres, hvis der ønskes en traditionel vækstbaseret bekræftelse af coliforme bakterier og *E. coli*. FIB:Vis har en analysetid på 20 timer og kan kombineres direkte med FIB:Lite.

MST:Lite. Hvis en mikrobiel forurening er blevet påvist i en vandforsyning, kan det være nyttigt at karakterisere forurenningen for at skelne mellem forskellige forurenings typer. MST:Lite kan give en forureningsprofil for det forurenede vand som efterfølgende kan sammenlignes med potentielle forureningskilder. MST:Lite kan ikke sammenlignes med mere detaljerede og komplicerede molekylærbiologiske metoder, men er en enkel og billig fluorescensbaseret metode med en analysetid på få timer.

Egenkontrol. Hurtigmetoder som beskrevet i dette projekt vil ikke middelbart kunne erstatte lovlige bakteriologiske analyser af drikkevand, men det vurderes, at der er et stort potentiale i forbindelse med eksempelvis screeninger ved forureningshændelser samt generel egenkontrol og overvåning. Det forventes at sådanne analyser vil blive mere almindelige i fremtiden for at imødekomme ønsker fra myndigheder og forbrugere om bedst mulig vandkvalitet.

I den forbindelse kunne ColiBox metoderne herunder FIB:Lite kombineres med fysiske eller kemiske sensorer i ledningsnettet, der giver signal om afvigelser fra normalsituationen (turbiditet, ledningsevne m.m.). En afvigelse kunne bruges til at initiere prøvetagning på udvalgte og/eller kritiske steder ved brug af en bakteriologisk hurtigmetode (egenkontrol). En sådan strategi vil føre til øget forbrugersikkerhed og hurtig opfølgning ved kritiske overskridelser.



Figur 13.1 Fysisk/kemiske on-line sensorer i ledningsnet kan eventuel kombineres med brug af bakteriologiske hurtigmetoder til egenkontrol.

14. Formidling

I projektperioden er der blevet udført følgende formidlingsaktiviteter omkring projektet.

Medie/anledning	Dato	Emne	Personer
Dansk Vand Konference 2011 (DANVA) (Aarhus)	1-2. Nov. 2011	Nye hurtigmetoder til påvisning af mikrobielle forurenninger i drikkevand	Peter Roslev
SENSOWAQ konference "Sensorer for drikkevandskvalitet – hvor langt er vi?" (København)	25. Jan. 2012	Sensorer og hurtigmetoder til fækale indikatorbakterier – hvor svært kan det være?	Peter Roslev Annette S. Bukh Mary B. Rasmussen
Bactiquant temadag hos Nordvand (Gentofte)	29. Aug. 2012	Lynkursus i drikkevandsmikrobiologi og detektionsmetoder	Peter Roslev
Artikel til videnskabeligt tidskrift	Under udarbejdelse	Rapid detection and characterization of microbial contamination in drinking water using fluorescent substrate analogues	Peter Roslev Mary B. Rasmussen Annette S. Bukh
Artikel til Dansk Kemi	Under udarbejdelse	Fluorescens sladrer om fremmede bakterier i drikkevand	Peter Roslev Mary B. Rasmussen Annette S. Bukh

15. Kilder

BEK nr. 1024. 2011. Bekendtgørelse om vandkvalitet og tilsyn med vandforsyningssanlæg. Miljøministeriet.

Bukh, A.B. og P. Roslev. 2010. Characterization and validation of a chemiluminescent assay based on 1,2-dioxetanes for rapid detection of viable *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology. 86:1947–1957.

Bukh, A.B., Hansen, N.E., og P. Roslev. 2012. Detection and persistence of clinical *Escherichia coli* in drinking water evaluated by a rapid enzyme assay and qPCR. Advances in Microbiology. 2, 252-262.

By- og Landskabsstyrelsen. 2009. Kvaliteten af det danske drikkevand for perioden 2005-2007. Rapport.

DANVAs vandforsyningsskomité. 2004. Vejledning I sikring af drikkevandskvalitet (Dokumenteret Drikkevands-Sikkerhed DDS). Vejledning nr. 72. Miljøministeriet, By og Landskabsstyrelsen.

DS/EN ISO 6222. 2002. Vandundersøgelse - Bestemmelse af antal mikroorganismer i gæresekstraktagar ved 22°C og 36°C – Dybdeudsæd. Dansk Standard.

DS/EN ISO 9308-1. 2001/2006/2009. Påvisning og bestemmelse af *Escherichia coli* og coliforme bakterier - Del 1: Membranfiltreringsmetode. Dansk Standard.

DS/EN ISO 7899-2. 2000/2006. Vandundersøgelse - Påvisning og bestemmelse af enterokokker - Del 2: Membranfiltreringsmetode. Dansk Standard.

Fiksdal, L. og I. Tryland, 2008, Application of rapid enzyme assay techniques for monitoring of microbial water quality. Current Opinion in Biotechnology. 19: 289-294.

Garcia-Armisen, T., Lebaron, P. og P. Servais. 2005. β -D-glucuronidase activity assay to assess viable *Escherichia coli* abundance in freshwaters. Letters in Applied Microbiology. 40: 278-282.

Garthright, W.H., og R.J. Blodget. 2003. FDAs preferred MPN method for standard, large or unusual tests with a spreadsheet. Food Microbiology. 20: 439-445.

Hansen, C. 2012. Beredskab under vandforureningen i København. danskVAND, nr. 2.

International Water Association. 2004. The Bonn Charter for safe drinking water. IWA Publishing.

Miljøstyrelsen. 2010. Vejledning 9243 af 27.5.2010. Vejledning om håndtering af overskridelser af de mikrobiologiske drikkevandsparmetere. Miljøministeriet.

Orenga, S. James, A.J., Manafi, M., Perry, J.D., og D.H. Pincus. 2009. Enzymatic substrates in microbiology. Journal of Microbiological Methods. 79: 139-155.

Roslev, P. Bjergbæk, L.A., og A.S. Petersen. 2004. Bakterierne går i dvale i dit vandrør. Aktuel Naturvidenskab. nr. 5: 15-18.

Roslev, P. og A.S. Bukh. 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. Applied Microbiology and Biotechnology. 89: 1341-1355.

Roslev, P. 2013. Mikrobiel kvalitet og desinfektion. Kap. 21 i "Vandforsyning" (3 udgave). Nyt Teknisk Forlag.

Schmeichel, K., 2012. Forurenninger giver vand dårligt omdømme. danskVAND, nr. 2

Sundhedsstyrelsen og Naturstyrelsen. 2011. Sundhedsstyrelsens og Naturstyrelsens erfaringsopsamling om Mikrobiologiske drikkevandsforurenninger 2010. Miljøministeriet.

Wildeboer, D., Amirat, L., Price, R.G., og R.A. Abuknesha. 2010. Rapid detection of *Escherichia coli* in water using a hand-held fluorescence detector. Water Research. 44: 2621-2628.