

Metodeafprøvning

Bestemmelse af coliforme bakterier
og *E. coli* i spildevand

**Naturstyrelsens Reference-
laboratorium for Mikrobiolo-
giske Miljøanalyser**

Titel: Metodeafprøvning, bestemmelse af coliforme bakterier og *E. coli* i spildevand

Resume: Der er gennemført metodeafprøvning af 4 metoder til bestemmelse af coliforme bakterier og *E. coli* i spildevand. For bestemmelse af coliforme bakterier findes der ikke forskel på nuværende metode DS 2255 og Colilertmetoden og heller ikke forskel mellem nuværende metode og drikkevandsmetoden DS/EN ISO 9308-1. For *E. coli* findes der ikke forskel på nuværende metode og drikkevandsmetoden DS/EN ISO 9308-1. Sammenligning med de øvrige metoder viste signifikante forskelle på metoderne medmindre t-test foretages på separate data dækkende indløb eller udløb hver for sig.

Emneord: coliforme, *E. coli*, spildevand

Forfatter: Inger Guldbæk

Godkendt af: Inger Guldbæk

Rådgiver: Eurofins Steins Laboratorium A/S

Udgiver: Naturstyrelsens Referencelaboratorium for Mikrobiologiske Miljøanalyser

Udgiverkategori: Statslig

År: 2012

Sprog: Dansk

Copyright: Må citeres med kildeangivelse.
Naturstyrelsens Referencelaboratorium for Mikrobiologiske Miljøanalyser

					QA dato
	Rapport (Udkast, Andet udkast, Endelig...)	IG	IG	IG	22022013
Revision	Beskrivelse	Udført	Kontrolleret	Godkendt	Dato

Indhold

.....	2
Sammenfatning og konklusioner	2
Summary and conclusions	3
1 Indledning	4
2 Forsøgsbeskrivelse	5
2.1 Metoder	5
2.1.1 DS 2255:2001 Vandundersøgelse – Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier – fortyndingsmetoden (MPN-metoden)	5
2.1.2 DS/EN ISO 9308-1:2001 vandundersøgelse – Påvisning og bestemmelse af Eschericia coli og coliforme bakterier – Del 1: membranfiltreringsmetode.....	5
2.1.3 Colilert 18	5
2.1.4 DS/EN ISO 9308-3:1999 vandundersøgelse – Påvisning og bestemmelse af Eschericia coli i overflade- og spildevand – Del 3: metode med opformering i flydende medium (mini-MPN)	6
3 Resultater:	7
4 Diskussion og databehandling	11
5 Konklusion	12

Sammenfatning og konklusioner

Forsøg er gennemført med henblik på at sammenligne metoderne DS 2255 Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier – fortyndingsmetoden (MPN-metode), DS/EN ISO 9308-1 Påvisning og bestemmelse af *Escherichia coli* og coliforme bakterier membranfiltreringsmetoden, Colilert Quanti Tray metoden samt DS/EN ISO 9308-3 Påvisning og bestemmelse af *Escherichia coli* i overflade- og spildevand. Metode med opformering i flydende medium (mini MPN) til bestemmelse af coliforme bakterier og *E. coli* i spildevand.

Til forsøgene er anvendt såvel indløbs som udløbsprøver af spildevand. Analyserne er iværksat indenfor 24 timer efter prøveudtagning og nødvendige verifikationer er gennemført som anført i metodebeskrivelserne.

Resultaterne er efter logaritmering sammenlignet ved t-test. For så vidt gælder metoder til bestemmelse af coliforme bakterier findes der ikke forskel på nuværende metode DS 2255 og Colilertmetoden og heller ikke forskel mellem nuværende metode og drikkevandsmetoden DS/EN ISO 9308-1. Når det drejer sig om *E. coli* findes der ikke forskel på nuværende metode og drikkevandsmetoden DS/EN ISO 9308-1. Sammenligning med de øvrige metoder viste signifikante forskelle på metoderne medmindre t-test foretages på separate data dækkende indløb eller udløb hver for sig.

Summary and conclusions

Tests have been conducted to compare the methods DS 2255 water quality - Enumeration of coliform bacteria and thermotolerant coliform bacteria - Multiple-tube fermentation method (Most Probable Number-method), DS / EN ISO 9308-1 Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method, Colilert Quanti Tray method and DS / EN ISO 9308-3 Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water - Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium.

The test included both inlet and outlet wastewater samples. The analyses were initiated within 24 hours after sampling and verifications were conducted according to the relevant method.

The results were compared by t-test on the logarithm values. With regard to enumeration of coliform bacteria no difference was found between the current method DS 2255 and the Colilert method also no difference was found between the current method and DS / EN ISO 9308-1. When it comes to *E. coli* no difference was found between the current method DS 2255 and DS / EN ISO 9308-1. Comparison with the other methods showed significant differences unless if t-test was carried out on separate data covering the inlet and separate data covering the outlet.

1 Indledning

Bestemmelse af coliforme bakterier og *E. coli* i spildevand foretages efter DS 2255 jf. kvalitetsbekendtgørelsen. Metoden er en MPN metode, som kræver meget håndtering og analysetiden er 4 døgn, hvilket er relativ lang tid. Det er derfor relevant at undersøge om andre metoder kan anvendes. Forsøg er udført med 15 indløb og 15 udløbsprøver fra renseanlæg. Prøverne er analyseret efter den i kvalitetsbekendtgørelsen foreskrevne metode DS 2255 og til sammenligning efter metoderne Colilert Quanti Tray, drikkevandsmetoden ISO 9308-1 MF. Desuden er *E. coli* bestemt efter ISO 9308-3 mikrotiterplate metoden.

DS 2255 metoden som er en MPN metode, er omstændelig og langsom og desuden er analyseusikkerheden stor. Metoden blev indtil 2004 anvendt til analyse af drikkevand og anvendes nu primært til spildevand og slam.

I nærværende rapport undersøges mulighed for at erstatte metoden med enten DS/EN ISO 9308-1:2001 eller med Colilert metoden. Desuden undersøges muligheden for bestemmelse af *E. coli* med ISO 9308-3, mikrotiterplate metoden.

2 Forsøgsbeskrivelse

Rutinemæssigt udtagne prøver af spildevand, såvel indkøb som udløb er analyseret. Prøverne er analyseret indenfor 24 timer efter prøveudtagning.

Prøverne er analyseret for coliforme bakterier og *E. coli* efter metoderne: DS 2255 MPN (McConkey bouillon), ISO 9308-1 MF (drikkevands metoden) og Colilert. Desuden er analyseret for *E. coli* efter ISO 9308-3 Mikrotiterplate metoden.

Verifikationer er udført som beskrevet i metoderne og verifikationen er udført i umiddelbar forlængelse af påvisningerne.

2.1 Metoder

Tekst

2.1.1 DS 2255:2001 Vandundersøgelse – Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier – fortyndingsmetoden (MPN-metoden)

Metodens princip er at pøde passende mængder af prøven i selektivt laktoseforgæringssubstrat (MacConkey-bouillon) i parallelrækker, 5 glas i hver række. Disse primærkulturer inkuberes ved 37°C ±1°C i 48 timer. På grundlag af kombinationen af kulturer med positiv og negativ reaktion findes det mest sandsynlige antal coliforme bakterier ved opslag i MPN tabel. Fra primærkulturer podes sekundærkulturer i selektivt laktoseforgæringssubstrat (MacConkey-bouillon) og i tryptonvand. Sekundærkulturer inkuberes ved 44°C ±0,2°C i 48 timer, hvorefter antallet af kulturer med såvel syre- og luftdannelse som med indoldannelse registreres. På grundlag af kombinationen af positive og negative sekundærkulturer findes det mest sandsynlige antal *E. coli* ved opslag i MPN tabel.

2.1.2 DS/EN ISO 9308-1:2001 vandundersøgelse – Påvisning og bestemmelse af *Eschericia coli* og coliforme bakterier – Del 1: membranfiltreringsmetode

Metoden er baseret på membranfiltrering. Efter filtrering af en passende mængde af vandprøven anbringes filteret på et selektivt laktosemedium (TTC agar) og inkuberes ved 36 ±2°C i 21 ±3 timer. Karakteristiske kolonier tælles og verificeres efter rendyrkning på non-selektivt agar. Verifikation foretages ved oxidase test og undersøgelse for indolproduktion.

2.1.3 Colilert 18

Metodens bygger på at coliforme bakterier producerer enzymet β-galactosidase og derved kan omsætte substratet o-nitrophenyl (såkaldt ONPG positive). Ved

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

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-glucuronid dannes en fluorescerende forbindelse 4-methyl-umbelliferon. MUG positive bakterier kan således påvises ved fluorescens under UV-lys (365 – 366 nm).

I Colilert 18 er ONPG og MUG de væsentligste kulstof-kilder, der derfor vil blive omsat, såfremt der er coliforme bakterier hhv. *E. coli* tilstede i prøven. Prøver positive for *E. coli* bliver således gule og fluorescerende.

Inkubation er i overensstemmelse med metodebeskrivelsen foretaget ved $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i 19-22 timer.

Metoden er en MPN metode, således antallet af gule/fluorescerende brønde aflæses og indhold af coliforme bakterier & *E. coli* beregnes ved opslag i MPN tabel.

2.1.4 DS/EN ISO 9308-3:1999 vandundersøgelse – Påvisning og bestemmelse af *Escherichia coli* i overflade- og spildevand – Del 3: metode med opformering i flydende medium (mini-MPN)

Fortyndinger af prøven inokuleres i mikrotiterplader indeholdende dehydreret medium. Mediet indeholder 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), som β -glucuronidase positive *E. coli* omsætter til den fluorescerende forbindelse 4-methyl-umbelliferon.

Pladerne inkuberes ved $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ i 36 (+3) timer. På basis af antal fluorescerende brønde beregnes prøvens indhold af *E. coli*.

3 Resultater:

Resultaterne af analyserne fordeler sig som vist nedenstående tabel 1 i henhold til de anvendte analysemetoder.

Tabel 1: Indhold af coliforme bakterier/100 mL spildevand, indløb

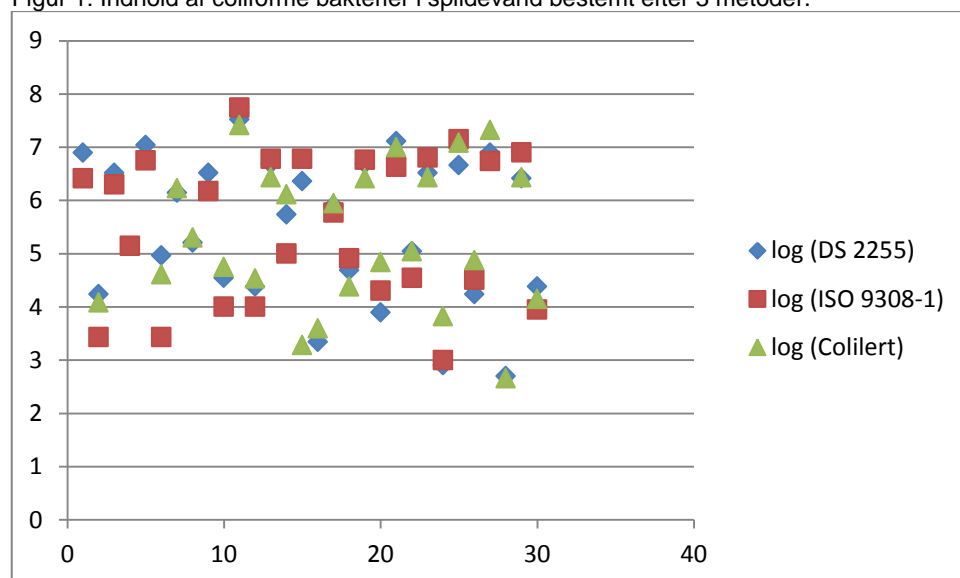
Prøve nr.	Coliforme, DS2255		Coliforme, ISO 9308-1		Coliforme, Colilert	
	MPN/100 mL	Log (MPN/100 mL)	CFU/100 mL	Log (CFU/100 mL)	MPN/100 mL	Log (MPN/100 mL)
1	7.900.000	6,90	2.600.000	6,41	>2.000.000	
3	3.300.000	6,52	2.000.000	6,30	>2.000.000	
5	11.000.000	7,04	5.600.000	6,75	>2.000.000	
7	1.400.000	6,15	<100.000		1.700.000	6,23
9	3.300.000	6,52	1.500.000	6,18	>2.000.000	
11	33.000.000	7,52	55.000.000	7,74	26.000.000	7,41
13	4.900.000	6,69	6.000.000	6,78	2.700.000	6,43
15	2.300.000	6,36	6.000.000	6,78	1.900	3,28
17	790.000	5,90	590.000	5,77	880.000	5,94
19	4.900.000	6,69	5.800.000	6,76	2.600.000	6,41
21	13.000.000	7,11	4.300.000	6,63	10.000.000	7,00
23	3.300.000	6,52	6.400.000	6,81	2.700.000	6,43
25	4.600.000	6,66	14.000.000	7,15	12.000.000	7,08
27	7.900.000	6,90	5.500.000	6,74	21.000.000	7,32
29	2.600.000	6,41	8.000.000	6,90	2.700.000	6,43

Tabel 2: Indhold af coliforme bakterier/100 mL spildevand, udløb

Prøve nr.	Coliforme, DS2255		Coliforme, ISO 9308-1		Coliforme, Colilert	
	MPN/ 100 mL	Log (MPN/ 100 mL)	CFU/ 100 mL	Log (CFU/ 100 mL)	MPN/ 100 mL	Log (MPN/ 100 mL)
2	17.200	4,24	2.700	3,43	12.000	4,08
4	>16.000.000		140.000	5,15	>200.000	
6	91.800	4,96	2.700	3,43	41.000	4,61
8	160.000	5,20	<1.000		200.000	5,30
10	35.000	4,54	10.000	4,00	56.000	4,75
12	24.000	4,38	10.000	4,00	34.000	4,53
14	540.000	5,73	100.000	5,00	1.300.000	6,11
16	2.200	3,34	<10.000		3.900	3,59
18	49.000	4,69	82.000	4,91	24.000	4,38
20	7.900	3,90	20.000	4,30	69.000	4,84
22	110.000	5,04	35.000	4,54	110.000	5,04
24	800	2,90	1.000	3,00	6.600	3,82
26	17.200	4,24	32.000	4,51	75.000	4,88
28	500	2,70	<1.000		450	2,65
30	24.000	4,38	8.900	3,95	14.000	4,15

I nedenstående figur præsenteres de samlede resultater grafisk.

Figur 1: Indhold af coliforme bakterier i spildevand bestemt efter 3 metoder.



Logaritmen til resultaterne for indhold af coliforme bakterier er afbildet for hver prøve og for hver analyse.

Tabel 3: Indhold af *E. coli*/100 mL spildevand, indløb

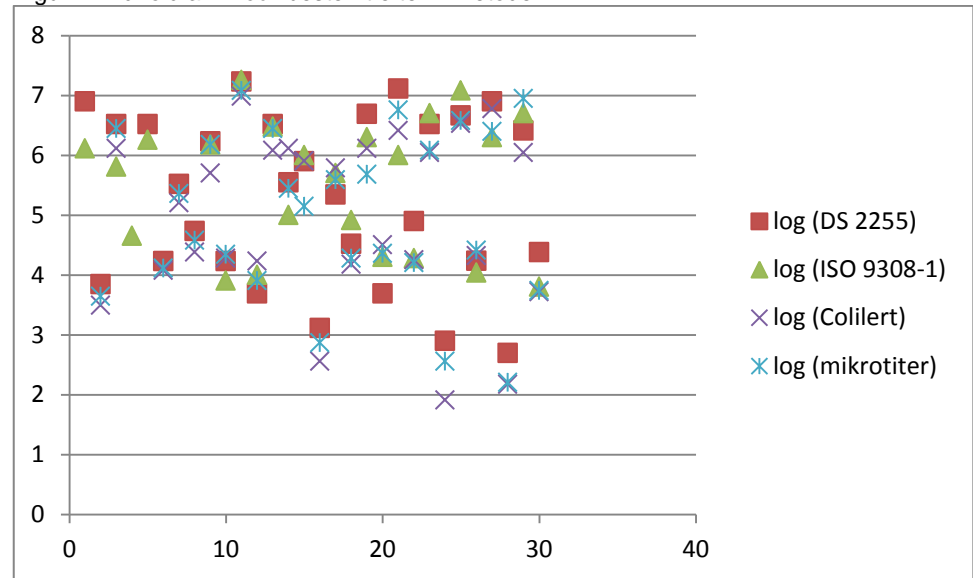
Prøve nr.	<i>E. coli</i> , DS 2255		<i>E. coli</i> , ISO 9308-1		<i>E. coli</i> , Colilert		<i>E. coli</i> , mikrotiter	
	MPN/100 mL	Log (MPN/100 mL)	CFU/100 mL	Log (CFU/100 mL)	MPN/100 mL	Log (MPN/100 mL)	MPN/100 mL	Log (MPN/100 mL)
1	7.900.000	6,90	1.300.000	6,11	>2.000.000		>3.500.000	
3	3.300.000	6,52	640.000	5,81	1.300.000	6,11	2.800.000	6,45
5	3.300.000	5,52	1.800.000	6,26	>2.000.000		>3.500.000	
7	330.000	6,23	<100.000		160.000	5,20	230.000	5,36
9	1.700.000	6,23	1.500.000	6,18	500.000	5,70	1.500.000	6,18
11	17.000.000	7,23	18.000.000	7,26	9.700.000	6,99	12.000.000	7,08
13	3.300.000	6,52	3.000.000	6,48	1.200.000	6,08	2.800.000	6,45
15	790.000	5,90	1.000.000	6,00	800.000	5,90	140.000	5,15
17	220.000	5,34	500.000	5,70	610.000	5,79	390.000	5,59
19	4.900.000	6,69	2.000.000	6,30	1.300.000	6,11	480.000	5,68
21	13.000.000	7,11	1.000.000	6,00	2.600.000	6,41	5.700.000	6,76
23	3.300.000	6,52	5.000.000	6,70	1.100.000	6,04	1.200.000	6,08
25	4.600.000	6,66	12.000.000	7,08	3.400.000	6,53	3.800.000	6,58
27	7.900.000	6,90	2.000.000	6,30	6.000.000	6,78	2.500.000	6,40
29	2.600.000	6,41	5.000.000	6,70	1.100.000	6,04	8.800.000	6,94

Tabel 4: Indhold af *E. coli*/100 mL spildevand, udløb

Prøve nr.	<i>E. coli</i> , DS 2255		<i>E. coli</i> , ISO 9308-1		<i>E. coli</i> , Colilert		<i>E. coli</i> , mikrotiter	
	MPN/100 mL	Log(MPN/100 mL)	CFU/100 mL	Log(CFU/100 mL)	MPN/100 mL	Log(MPN/100 mL)	MPN/100 mL	Log(MPN/100 mL)
2	7.000	3,85	<1000		3.100	3,49	4.400	3,64
4	>16.000.000	4,23	45.000	4,65	>200.000		>350.000	
6	17.000	4,73	<1.000		12.000	4,08	13.000	4,11
8	54.000	4,73	<1.000		24.000	4,38	38.000	4,58
10	17.000	4,23	8.000	3,90	19.000	4,28	22.000	4,34
12	4.900	3,69	10.000	4,00	17.000	4,23	8.000	3,90
14	350.000	5,54	100.000	5,00	1.300.000	6,11	280.000	5,45
16	1.300	3,11	<10.000		360	2,56	740	2,87
18	33.000	4,52	82.000	4,91	15.000	4,18	19.000	4,28
20	4.900	3,69	20.000	4,30	32.000	4,51	23.000	4,36
22	79.000	4,90	19.000	4,28	18.000	4,26	16.000	4,20
24	800	2,90	<1.000		82	1,91	360	2,56
26	17.200	4,24	11.000	4,04	21.000	4,32	26.000	4,41
28	500	2,70	<1.000		150	2,18	160	2,20
30	24.000	4,38	6.400	3,81	5.200	3,72	5.500	3,74

I nedenstående figur præsenteres samme resultater grafisk.

Figur 2: Indhold af *E. coli* bestemt efter 4 metoder.



Logaritmen til MPN værdierne for indhold af *E. coli* er afbildet for hver prøve og for hver analyse

4 Diskussion og databehandling

Mikrobiologiske resultater er ikke normalfordelte, men der er blandt mikrobiologer konsensus om at generelt at anvende logaritmerede værdier som normalfordelingsmodel når man ønsker at foretage statistiske test på mikrobiologiske resultater. Resultaterne for hver metode er sammenlignet med den nuværende metode (DS 2255) ved t-test af de logaritmerede data. Resultater indeholdende ">" og "<" er ikke medtaget i de statistiske test.

Som udgangspunkt er valgt at håndtere alle data, såvel indløb som udløb behandlet som et datasæt, uanset dette giver anledning til større spredning mellem resultaterne.

For coliforme bakterier findes $t = 1,674$ ved sammenligning af DS 2255 med ISO 9308-1 og $t = 1,674$ ved sammenligning af DS 2255 med Colilertmetoden. I begge tilfælde må resultatet tolkes således, at der ikke på foreliggende grundlag kan påvises forskelle mellem de 2 metoder.

For E. coli findes $t = 1,613$ ved sammenligning mellem DS 2255 og ISO 9308-1. Sammenlignes resultater for E. coli ved DS 2255 med Colilertmetoden findes $t = 2,856$. Foretages sammenligning mellem DS 2255 og mikrotitermetoden fås $t = 2,520$. Det betyder, at der ikke på foreliggende grundlag kan påvises systematiske forskelle mellem indholdet af E. coli bestemt efter DS 2255 og efter ISO 9308-1, hvorimod der kun er et svagt statistisk bevis for at Colilert og mikrotiter metoderne giver samme resultat som DS metoden.

Deles mikrotitermetoden op i indløb & udløb er hvert af datasættene signifikante på 5% niveau, dvs. man kan ikke afvise at metoderne giver ens resultater. For Colilert metoden gælder, at den er signifikant på 5% niveau for udløb, men kun en meget svag tendens til ens resultater på indløb. Det vurderes at årsagen er den meget store spredning på resultaterne og at større datasæt vil kunne bidrage til bedre afklaring af sammenhænge.

5 Konklusion

Der er foretaget analyser af 30 spildevandsprøver. Prøverne er analyseret for indhold af coliforme bakterier og *E. coli*. Forsøget viser, at der ikke ved t-test kan påvises signifikante forskelle mellem indhold af coliforme bakterier opnået ved DS 2255 og henholdsvis DS/EN ISO 9308-1 (drikkevands metoden) og Colilert metoden.

For så vidt angår indhold af *E. coli* viser forsøget, at der ikke ved t-test kan påvises signifikante forskelle på resultater opnået ved DS 2255 og ved DS/EN ISO 9308-1 (drikkevandsmetoden). Tilsvarende gør sig ikke gældende for Colilert metoden og for mikrotiterplatemetoden. For Colilertmetoden kan der ved t-test af datasæt fra udløb ikke påvises signifikante forskelle på resultater opnået ved DS 2255 og ved Colilertmetoden. For mikrotiterplatemetoden kan der ved statistisk analyse af separate data fra henholdsvis indløb og fra udløb vises, at der ikke er signifikante forskelle på resultater opnået ved DS 2255 og ved mikrotiterplatemetoden.

Det konkluderes deraf at DS/EN ISO 9308-1 kan anvendes til bestemmelse af *E. coli* i spildevand.

Det er sandsynligt, at der ved statistisk analyse af større datasæt ikke vil kunne påvises forskelle mellem DS 2255 og Colilert metoden hhv. mikrotiterplate metoden.