

Styrelsen for Vand- og Naturforvaltnings Referencelaboratorium for Kemiske og Mikrobiologiske Miljømålinger

NOTAT

Til: Følgegruppen for Styrelsen for Vand- og Naturforvaltnings Referencelaboratorium

cc:

Fra: Simon Jensen og Inger Guldbæk

Dato: 8. december 2016

QA: Stine Ottsen

Emne: Vurdering af målemetode
Enterokokker i slam, kompost og biomasse

Dette notat indeholder en gennemgang af metoder for bestemmelse af enterokokker i slam, kompost og biomasse. Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger /1/ stiller kvalitetskrav og krav til metode til måling af enterokokker i ovennævnte prøvetyper ved henvisning til metodedatablad MM0007. Metodekravet i MM0007 er DS 2401 /2/.

Den seneste udgave af DS 2401 er fra 1999. Referencelaboratoriet har ikke tidligere forholdt sig til, om der findes anvendelige internationale metoder til bestemmelse af enterokokker i slam, kompost og biomasse. Der er i de forløbne 17 år sket en stor udvikling i mikrobiologiske metoder, referencerne i DS 2401 er udgåede, og fra et kvalitetsmæssigt synspunkt vil det være relevant at gennemgå metoden og vurdere, om der findes bedre alternativer.

Der er ikke udgivet internationale standarder for bestemmelse af enterokokker i slam, kompost og biomasse. Fra 2002 – 2008 blev der arbejdet med parameteren enterokokker i prøvetyperne slam, kompost og biomasse i et projekt – Project HORIZONTAL /3/. Arbejdet videreføres i den europæiske standardiseringsorganisation, CEN. På baggrund af projektet blev der udviklet udkast til to standarder for analyse af enterokokker i prøvetyper som slam, kompost og biomasse; Part 1 /4/ og Part 2 /5/. Udkastene er de eneste metoder, der i øjeblikket eksisterer som mulige alternativer til DS 2401. De er dog endnu ikke egnede som analysestandarder pga. manglende validering, men de er medtaget i dette notat, fordi de måske kan være relevante, når de foreligger som validerede internationale standarder. Referencelaboratoriet har ikke kendskab til, hvornår de vil foreligge som validerede metoder.

Kvalitetskrav

I bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger /1/ bilag 2.11 Slam, kompost og biomasse stilles følgende kvalitets- og metodekrav til bestemmelse af enterokokker:

Slam, kompost og biomasse

Parameter	Enhed	Anvendelses- område	Påvisnings- grænse	Analyse- kvalitet s_r	Metode
Enterokokker	cfu/ mL eller cfu/g	<100 – 20×10^4	100	0,15	MM0007 (DS 2401)

I bekendtgørelse nr. 1650 om anvendelse af affald til jordbrugsformål /6/ er der krav om, at indhold af enterokokker skal være mindre en 100 cfu/g våd vægt efter hygiejnisering af affaldet.

Beskrivelse af standarder

Nedenfor gives en beskrivelse af principperne i den danske standard DS 2401 for enterokokker og udkastene Part 1 og Part 2 Enterococci fra Project HORIZONTAL.

DS 2401:1999 Miljøundersøgelse Bestemmelse af enterokokker Kolonitælling på fast substrat Overfladeudsæd

Anvendelse: Slam, jord og biomasse.

Princip: Princippet er overfladeudsæd af prøven eller fortynding heraf på selektiv agar, Sanetz Bartley, og inkubation ved 44 °C i 48 ± 4 timer. Efterfølgende tælles hvælvede kolonier, som er røde, rødbrune eller lyserøde i centrum eller i hele kolonien som værende Enterokokker.

Project HORIZONTAL

Formålet med Project HORIZONTAL var at udvikle horisontale og harmoniserede europæiske standarder inden for prøvetyperne slam, jord og biomasse.

Der er udviklet et udkast til en standard for analyse af enterokokker i prøvetyper som slam, kompost og biomasse. I samme projekt er udarbejdet tekniske rapporter for *E. coli* (CEN/TR 15214-1 /7/, CEN/TR 15214-2 /8/ og CEN/TR 15214-3 /9/) og *Salmonella* (CEN/TR 15215-1 /10/, CEN/TR 15215-2 /11/ og CEN/TR 15215-3 /12/) i disse prøvetyper, som er udgivet af CEN.

Der er udarbejdet final draft, endnu ikke valideret, for Enterokok-standards med følgende nuværende titler:

Part 1 Soils, sludges and treated bio-wastes – Isolation and enumeration of intestinal enterococci – Part 1: Membrane filtration method onto selective agar

Anvendelse: Slam, jord og bioaffald

Princip: Princippet er membranfiltrering af fortyndet prøve med efterfølgende inkubation ved 36 °C i 4 timer efterfulgt af 43 °C i 40 timer på selektiv agar. Efterfølgende konfirmeres typiske kolonier på galdeaesculinagar. Metoden har en detektionsgrænse på ca. 27 cfu/g vådvægt.

Part 2 Soils, sludges and treated bio-wastes – Detection and enumeration of intestinal enterococci – Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium

Anvendelse: Slam, jord og bioaffald

Princip: Princippet er MPN-teknik (Most Probable Number) ved inokulering af mikrotiterplade og aflæsning af fluorescens efter endt inkubation ved 43 ± 1°C i 36-48 timer. Metoden tager udgangspunkt i ISO 7899-1 /13/, som er den ene af to metoder, der kan anvendes til bestemmelse af enterokokker i overfladevand jf. MM0010 i bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger. Part 2 har særlig fokus på den indledende fortynding, hvilket påvirker detektionsgrænsen, som er bestemt til at være ca. 169 MPN/g vådvægt.

Vurdering

DS 2401 refererer til DS 2250 som standard for prøvetagning, transport og opbevaring; standarden er tilbagetrukket og erstattet af ISO 19458. Endvidere refereres til Miljøstyrelsens bekendtgørelse nr. 637 af 30. juni 1997 om kvalitetskrav til miljømålinger udført af

akkrediterede laboratorier, certificerede personer m.v., som er ændret adskillige gange siden. Det er uhensigtsmæssigt, at standarden refererer til udgåede dokumenter.

DS 2401 og Project Horizontal part 1 anvender samme substrat, men kun Project Horizontal part 1 omfatter konfirmering af de talte kolonier. Det anføres i Project Horizontal part 1, at *Bacillus*, *Aerococcus* og staphylokokker også vil kunne vokse på substratet. Af den grund anses metoden i Project Horizontal at være den bedst egnede til bestemmelse af enterokokker af de to metoder.

Umiddelbart ser den ene metode fra Project HORIZONTAL, Part 1, ud til at kunne anvendes, når der er tale om filtrerbare prøvetyper. Analysemetodens begrænsning afhænger af tørstofindholdet i prøven. Hvis tørstofindholdet er højere end 20 % w/v blokeres filtrering, hvilket vil være tilfældet for biomasse og kompost og i visse tilfælde også slam. Analysemetoden har en detektionsgrænse på 27 cfu/g våd vægt og lever på det punkt op til kravet i bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger og i bekendtgørelse om anvendelse af affald til jordbrugsformål.

Part 2 fra Project HORIZONTAL kan anvendes til prøvetyper, som ikke er filtrerbare, dvs. biomasse og kompost og slam. Analysemetoden angives at have en detektionsgrænse på 169 MPN/g våd vægt. Den anførte detektionsgrænse er højere end kravet i både bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger og bekendtgørelse om anvendelse af affald til jordbrugsformål. Ud fra et teoretisk synspunkt vurderes det, at det vil være muligt at opnå lavere detektionsgrænser end 169 MPN/g for visse matricer. Der kan være stor forskel på den fysisk kemiske beskaffenhed af matricerne og dermed også på genfindelse af enterokokker deri. Valideringsforsøg udført på hver matrice for sig vil kunne give et mere nuanceret billede. Referencelaboratoriet er ikke bekendt med, om der udføres flere valideringsarbejder i projektet.

Såfremt prøvetypen er filtrerbar, vil det være mest hensigtsmæssigt at anvende Part 1 fra Project HORIZONTAL, da den metode har den laveste detektionsgrænse. Part 2 fra Project HORIZONTAL er en MPN-metode og har som følge af MPN-teknikken også den største usikkerhed.

Det vil være relevant at følge valideringen af standarderne, da de efter validering og publicering som internationale standarder vil kunne udgøre alternativer til DS 2401.

Sammendrag og anbefalinger

Nærværende notat indeholder en gennemgang af DS 2401. Der findes ikke internationale standarder for bestemmelse af enterokokker i slam, kompost og biomasse. Project HORIZONTAL har udarbejdet to metodeudkast, som det vil være relevant at følge valideringen og publicering af, idet de derefter vil kunne udgøre alternativer til DS 2401. DS 2401 refererer til udgåede standarder, men metoden er egnet til analyse af slam, kompost og biomasse. Det anbefales at opretholde DS 2401 som metodekrav ved analyse af enterokokker i slam, kompost og biomasse. Metodekravet findes i metodedatablad MM0007. Referencelaboratoriet anbefaler at opdatere MM0007 ved at fjerne noter, der er kopi fra DS 2401, samt information af almen-faglig karakter, som ikke er nødvendig for anvendelse af metodedatabladet.

Referencer

- /1/ Bekendtgørelse nr. 914 om kvalitetskrav til miljømålinger, 27. juni 2016.
- /2/ DS 2401:1999 Miljøundersøgelse. Bestemmelse af enterokokker. Kolonitælling på fast substrat. Overfladeudsæd
- /3/ Hjemmeside for Project HORIZONTAL <http://horizontal.ecn.nl/>
- /4/ Udkast enterokokker Part 1 <http://horizontal.ecn.nl/final-documents-including-validation-data/hygienic-parameters/> via hjemmesiden <http://horizontal.ecn.nl/>

- /5/ Udkast enterokokker Part 2 <http://horizontal.ecn.nl/final-documents-including-validation-data/hygienic-parameters/> via hjemmesiden <http://horizontal.ecn.nl/>
- /6/ Bekendtgørelse nr. 1650 om anvendelse af affald til jordbrugsformål (Slambekendtgørelsen), 13. december 2006
- /7/ CEN/TR 15214-1 Characterization of sludges – Detection and enumeration of Escherichia coli in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes – Part 1: Membrane filtration method for quantification, 2006
- /8/ CEN/TR 15214-2 Characterization of sludges – Detection and enumeration of Escherichia coli in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes – Part 2: Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium, 2006
- /9/ CEN/TR 15214-3 Characterization of sludges – Detection and enumeration of Escherichia coli in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes – Part 3: Macromethod (Most Probable Number) in liquid medium, 2006
- /10/ CEN/TR 15215-1 Characterization of sludges – Detection and enumeration of Salmonella spp. in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes – Part 1: Membrane filtration method for quantitative resuscitation of sublethally stressed bacteria (to confirm efficacy of log drop treatment procedures), 2006
- /11/ CEN/TR 15215-2 Characterization of sludges – Detection and enumeration of Salmonella spp. in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes – Part 2: Liquid enrichment method in selenite-cystine medium followed by Rapport-Vassiliadis for semi-quantitative Most Probable Number (MPN) determination, 2006
- /12/ CEN/TR 15215-3 Characterization of sludges – Detection and enumeration of Salmonella spp. in sludges, soils, soil improvers, growing media and biowastes – Part 3: Presence/absence method by liquid enrichment in peptone-novobiocin medium followed by Rapport-Vassiliadis, 2006
- /13/ ISO 7899-1 Vandundersøgelse Påvisning og bestemmelse af enterokokker i overflade- og spildevand Del 1: Metode med opformering i flydende medium (mini-MPN), 1999