

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: 15. december 2016

QA: Stine Ottsen

Emne: Vurdering af målemetode
Kimal ved 37 °C i bassinvand

Dette notat indeholder en vurdering af metoder for bestemmelse af aerob kimal ved 37 °C i bassinvand. Bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger /1/ stiller kvalitetskrav og krav til metode til måling af kimal ved 37 °C i bassinvand ved henvisning til metodedatablad MM0012. Metodekravet i MM0012 er DS 2217 /2/.

Den seneste udgave af DS 2217 /2/ er fra 1999. Der findes en alternativ international standardiseret metode til bestemmelse af kimal ved 37 °C: ISO 6222 /3/. Denne internationale metode er ligeledes fra 1999. Referencelaboratoriet har ikke tidligere forholdt sig til, om ISO 6222 hensigtsmæssigt kan anvendes til bestemmelse af kimal ved 37 °C i bassinvand. Det er derfor aktuelt at vurdere, om denne alternative metode er egnet og evt. bedre end DS 2217.

Referencer i DS 2217 er udgåede, og der ligger et notat fra Niels Skovgaard, professor ved KVL, til Miljøstyrelsen fra 2003 /5/, som konkluderer, at fåreblod ud fra et spørgsmål om analysekvalitet er lige så egnet som alternativ til det i DS 2217 angivne kalveblod.

Kvalitetskrav

I bekendtgørelse om kvalitetskrav til miljømålinger /1/ bilag 2.4 Svømmebassinkontrol og 2.6 Returskyllevand fra svømmebassin stilles følgende kvalitets- og metodekrav til bestemmelse af kimal ved 37 °C:

Svømmebassinkontrol

Parameter	Enhed	Anvendelses- område	Påvisnings- grænse	Analyse- kvalitet s _r	Metode
Kimal v. 37 °C	cfu/100 mL	<1 – 2000	1	0,11	MM0012 (DS 2217)

Returskyllevand fra svømmebassin

Parameter	Enhed	Anvendelses- område	Påvisnings- grænse	Analyse- kvalitet s _r	Metode
Kimtal v. 37 °C	cfu/100 mL	<1 – 2000	1	0,11	MM0012 (DS 2217)

Kvalitetskravet til bassinvand er ifølge bekendtgørelse om svømmebadsanlæg m.v. og disses vandkvalitet /4/ 500 cfu/100 mL.

Beskrivelse af standarder

Nedenfor gives en beskrivelse af analyseprincipperne for DS 2217 og ISO 6222.

DS 2217:1999 Vandundersøgelse Bestemmelse af antal mikroorganismer på blodagar ved 37 °C Membranfiltreringsmetode

Anvendelse: Vand

Princip: Membranfiltrering af prøven med efterfølgende inkubation på blodagar ved 37 °C i 24 timer. Efterfølgende tælles alle synlige kim.

Blodagaren fremstilles ved tilsætning af defibrineret kalveblod til et grundsubstrat, som består af kødekstrakt, gærekstrakt, pepton, salt, vand og agar.

ISO 6222:1999 Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium

Anvendelse: Vand

Princip: Dybdeudsæd af prøven i gærekstraktagar med efterfølgende inkubation ved 37 °C i 48 timer. Efterfølgende tælles alle synlige kim.

Vurdering

Princippet i DS 2217 er membranfiltrering af 111 mL prøve, fordelt på tre skåle (100 mL, 10 mL og 1 mL) og inkubation på blodagar. Princippet i ISO 6222 er dybdeudsæd, hvilket giver en naturlig begrænsning af størrelsen på prøvemængden. Umiddelbart analyseres der 1 mL og 0,1 mL prøvemateriale i ISO 6222. Pga. den store prøvemængde i DS 2217 i forhold til ISO 6222 vurderes DS 2217 som en mere sikker metode.

Kvalitetskravet til bassinvand er ifølge bekendtgørelse om svømmebadsanlæg m.v. og disses vandkvalitet /4/ 500 cfu/100 mL. Prøvningsresultatet 500 cfu/100 mL svarer til at tælle 50 kolonier på membranfilter fra filtrering af 10 mL prøve i henhold til DS 2217 eller til at tælle 5 kolonier på en petriskål fra udsæd af 1 mL i henhold til ISO 6222. 50 kolonier er et optimalt antal kolonier at basere et resultat på, mens tælling af 5 kolonier er behæftet med stor usikkerhed. Usikkerheden er således større ved anvendelse af ISO 6222 end ved DS 2217.

DS 2217 aflæses efter 24 timer, mens ISO 6222 aflæses efter 48 timer. Resultatet fra DS 2217 vil derfor foreligge hurtigere end fra ISO 6222.

I DS 2217 dyrkes bakterierne på blodagar, mens der i ISO 6222 anvendes gærekstraktagar. Blodagaren består dels af blod og dels af et grundsubstrat. Grundsubstratet er non-selektivt og meget næringsrigt og giver bedre vækstmuligheder end den næringsfattige gærekstraktagar for de fleste mikroorganismer. Det vil derfor være en fordel at anvende blodagar fremfor gærekstraktagar, når man skal have et mål for hygiejnen i bassinvand.

DS 2217 beskriver tælling af de fremvoksede kim, men ikke tælling af hæmolytiske kim. Tilsætning af blod til agaren som foreskrevet i DS 2217 gør det ellers muligt at differentiere

mellem forskellige typer af mikroorganismer i forbindelse med aflæsningen, idet forskellige mikroorganismer danner forskellige hæmolyser på blod, og nogen danner slet ikke hæmolyser. Især patogene bakterier danner hæmolyser. Hæmolysernes udseende kan variere, afhængig af hvilken dyreart blodet stammer fra. Oprindelsen af det tilsatte blod har historisk set været geografisk betinget. I Norden har man anvendt kalveblod, i Storbritanien hesteblood, mens man i USA og det øvrige Europa har anvendt fåreblod. Tilgængeligheden af kalveblod, som DS 2217 kræver, kan være begrænset, og det kan være meget nemmere at skaffe fåreblod. Anvendelse af fåreblod som alternativ til kalveblod er vurderet af Niels Skovgaard, tidligere professor ved KVL, i et notat fra 2003 til Miljøstyrelsen /5/. Niels Skovgaard forholder sig til hæmolyserne uanset dette princip ikke indgår i DS 2217, og hans konklusion er, at fåreblod er egnet som alternativ til kalveblod ved bestemmelse af kimtal efter DS 2217. Det er Referencelaboratoriets vurdering, at laboratorierne på baggrund af notatet kan have anvendt blodagar med fåreblod i stedet for kalveblod i DS 2217.

DS 2217 refererer til den udgåede standard DS 2250 som standard for prøvetagning, transport og opbevaring; nugældende standard er 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 metoden refererer til udgåede dokumenter.

Sammendrag og anbefalinger

Nærværende notat indeholder en gennemgang af DS 2217 og den internationale standard ISO 6222. Membranfiltreringsteknik og dyrkning af bakterierne på blodagar giver en mindre usikkerhed og bedre mulighed for vækst af potentielt skadevoldende bakterier, hvilket gør DS 2217 bedre egnet end ISO 6222 til bestemmelse af kimtal ved 37 °C i bassinvand. Det er dog uhensigtsmæssigt, at DS 2217 refererer til udgåede dokumenter, og at metoden ikke åbner for at anvende fåreblod som alternativ til kalveblod. Tilgængeligheden af kalveblod er begrænset, og det vurderes derfor, at laboratorierne har anvendt blodagar med fåreblod i stedet for kalveblod. En åbning for anvendelse af fåreblod vil derfor svare til gængs praksis. Det er endvidere referencelaboratoriets vurdering, at fremvækst af kim er uafhængig af oprindelsen af blodet, og ændring i blodtype derfor ikke har betydning for resultaterne af kimtal ved 37 °C bestemt efter DS 2217.

Referencelaboratoriet anbefaler at opretholde DS 2217 som krævet metode for kimtal ved 37 °C i bassinvand med den modifikation, at der åbnes for, at fåreblod kan anvendes som alternativ til kalveblod. Metodekravet findes i metodedatablad MM0012.

Under anvendelsesområde og målemetoder i metodedatablad MM0012 bør der i øvrigt fjernes noter, der er kopi fra DS 2217, og 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 2217:1999 Vandundersøgelse bestemmelse af antal mikroorganismer på blodagar ved 37 °C Membranfiltreringsmetode
- /3/ DS 6222:1999 Water quality – Enumeration of culturable micro-organisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium
- /4/ Bekendtgørelse nr. 918 om svømmebadsanlæg m.v. og disses vandkvalitet, 27. juni 2016.
- /5/ Notat fra Niels Skovgaard til Linda Bagge, Miljøstyrelsen, dateret 10. februar 2003: Vedr. forespørgsel om kalveblod kan erstattes af fåre- eller hesteblood i DS 2217:1999