

# E.coli i drikkevand – hurtig analyse og lav detektionsgrænse

Den akkrediterede metode til analyse af E.coli i drikkevand kan måle 1 E.coli pr. 100 ml på 18-22 timer. Drikkevandsbranchen efterspørger derfor nye metoder. Der ønskes en metode som er både hurtigere og som har en lavere detektionsgrænse. Måske kan en kombination af flere metoder komme ønsket nærmere og effektivisere overvågningen af drikkevandskvaliteten.

SØREN BASTHOLM, SARA STARCKE &  
MARTIN HESSELSØE

## E.coli i drikkevandet

Når de nuværende akkrediterede metoder detekterer 1 E.coli per 100 ml i drikkevand, anvendes det som en indikation på fækal forurening af vandet. Derfor ringer alle alarmklokker og de berørte forbrugere skal koge vandet inden det kan bruges til fx madlavning eller tandbørstning. Forsyningsselskaberne, der har ansvar for overvågningen af drikkevandets kvalitet, er interesseret i at få et hurtigt svar på E.coli analysen. Det er en forudsætning for at de hurtigt kan gennemføre de nødvendige tiltag, med henblik på at begrænse forureningen så færrest mulige forbrugere bliver berørt.

## Detektionsgrænsen er for høj

Der findes i dag både DNA metoder og enzymatiske metoder, der kan detektere E.coli i drikkevand på bare cirka 30 minutter. Udfordringen med disse metoder er, at detektionsgrænserne er alt for høje i forhold til kravet om, at der altid skal være <1 E.coli per 100 ml i rent drikkevand. Disse metoder er derfor ikke anvendelige i overvågningen, hvis de først kan opdage en forurening, når grænseværdien for længst er overskredet.

Den metode som anvendes i E.coli overvågningen i dag (Colilert fra IDEXX), kan detek-

tere 1 E.coli per 100 ml på 18-22 timer ved opdyrkning af bakterierne. Denne akkrediterede metode har således en detektionsgrænse, som er magen til det aktuelle kvalitetskrav (<1 E.coli per 100 ml). Ved brug af den akkrediterede metode kan man altså ikke følge koncentrationen af E.coli i niveauet under grænseværdien for rent drikkevand. Der er ret unikt for netop E.coli analysen, at detektionsgrænsen er lig med grænseværdien. For de kemiske parametre der måles i drikkevand, er detektionsgrænsen for analyserne væsentligt lavere end grænseværdien.

## Dead-End filtrering

For at kunne overvåge E.coli i koncentrationer under 1/100ml er én mulighed at analysere mange prøver á 100 ml med den akkrediterede metode. Eksempelvis vil 100 prøver kunne vise et gennemsnit på 0,01 E.coli per 100 ml, hvis der detekteres 1 E.coli i én ud af de 100 prøver. Det er selvfølgelig en meget dyr fremgangsmåde for at opnå en lavere detektionsgrænse. I stedet anvender en håndfuld forsyningsselskaber i Danmark Dead-End membranfiltrering til at opkoncentrere bakterier fra drikkevandet. Ved analyse af de bakterier der fanget på filtret opnås også en detektionsgrænse på omkring 0,01 E.coli per 100 ml når 10 liter vand filtreres.

Princippet er at bakterierne fra eksempelvis 10 liter fanges på filteret (se figur 1). Efterfølgende afvaskes bakterierne ved en manuel proces. Nogle gange kan det være nødvendigt

at afvaske bakterierne af flere omgange for at få alle bakterierne til at slippe filteret.

## Genfindning af bakterier ved Dead-End filtrering

Amphi-Bac har udført kontrollerede laboratorieforsøg, der sammenligner antallet af E.coli der detekteres ved den akkrediterede metode hvor 100 ml analyseres direkte, med metoden hvor prøvens bakterier først opkoncentreres på et filter inden analyse. En 300 liter omrørt beholder blev tilsat E.coli. 10 vandprøver á 100 ml blev udtaget og analyseret direkte med Colilert fra IDEXX. Prøverne viste at vandet i beholderen indeholdt  $5,88 \pm 1,29$  E.coli per 100 ml. Til sammenligning blev der udtaget vandprøver på 2 liter til membranfiltrering.

### Faktaboks E.coli:

E. coli tilhører den gruppe af de coliforme bakterier, der lever i varmblodede dyrs og menneskers tarmkanal. E. coli har normalt en kort levetid udenfor tarmkanalen, hvorfor fund af disse i drikkevand tyder på en frisk forurening med spildevand eller afføring fra mennesker/dyr og dermed også risiko for tilstedeværelse af sygdomsfremkaldende mikroorganismer som f.eks. Salmonella, Campylobacter eller virus.

Kilde: Drikkevandsbekendtgørelsen (Miljøministeriets bekendtgørelse nr. 1449 af 11. dec. 2007)



Figur 1: Billedet til venstre viser en Dead-End filtrering foretaget direkte på tappehanen ved et vandværk. Værkets vandtryk bruges til at presse vandet gennem filteret. Billedet til højre viser de bakterier og partikler der er tilbageholdt på filteret.

Nedenstående figur 2 viser den fundne koncentration af E.coli i beholderen ved den direkte metode og når bakterierne fra 2 liter først opkoncentreres på et filter inden analyse. Der er lavet forsøg med to forskellige afvaskningsprocedurer (omrystning og omrøring) og filtre med to forskellige porestørrelser (0,22 og 0,45  $\mu\text{m}$ ).

De fire kombinationer af afvaskningsprocedure og porestørrelser fandt alle signifikant færre E.coli end de 10 direkte prøver. Der kunne ikke vises en signifikant forskel på om der blev brugt omrystning eller omrøring eller hvilket filter der blev anvendt. I gennemsnit kunne der ved Dead-End membranfiltrering genfindes 34 % i forhold til den direkte metode. Årsagen til den relative store forskel, skyldes sandsynligvis den hårdhændede behandling bakterierne udsættes for ved selve filtreringen samt den efterfølgende afvaskning, hvor en del af bakterierne inaktiveres eller dør. Derudover kan årsagen være at levende bakterier kan klumpe sammen i forbindelse med Dead-End filtreringen. En sammenhængende klump af bakterier vil kun tælle som én bakterie med den anvendte analysemetode.

### Cross-Flow filtrering

En hurtigere og mere skånsom metode til at opkoncentrere bakterier fra drikkevand er Cross-Flow filtrering. Amphi-Bac har udviklet og testet en automatiseret måde hvorpå bakterier kan opkoncentreres fra store vandvolumener (op til 100 liter) uden manuel håndtering. For at tilbageholde bakterierne anvendes et loop så vandet med bakterierne recirkuleres hen over filtermembranen igen

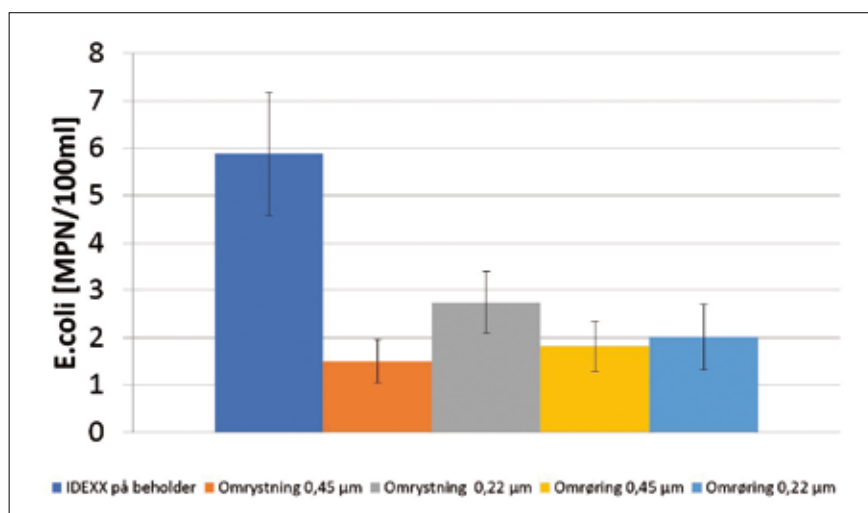
og igen mens det rene vand (permeatet) filtreres fra og koncentrationen af bakterier stiger i koncentratet. I figuren herunder vises forskellen på Dead-End filtrering som anvendes af nogle forsyninger i dag og Cross-Flow filtrering. Anvendelsen af denne filtreringsmetode er patenteret (Pat. DK178664).

For at opnå en høj genfindning af bakterier, er det vigtigt, at bakterierne behandles så skånsom som muligt. Det er bl.a. løst ved at anvende et stort filterareal på 2,3  $\text{m}^2$ . Til sammenligning har det anvendte filter til Dead-End filtrering et filterareal 12  $\text{cm}^2$ , hvilket er omkring 2.000 gange mindre. Det store filterareal bevirker, at det rene vand hurtigt kan fjernes fra store volumener, selv ved et lavt (skånsomt) tryk over membranen (ca. 10

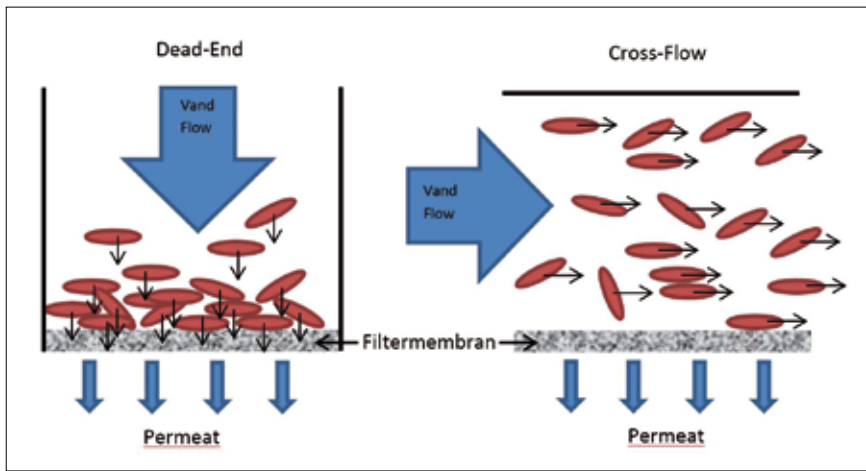
gange lavere end ved Dead-End filtrering). Et højt vand flow bevirker at bakterierne ikke sætter sig så nemt fast på filteret, hvilket begrænser sammenklumpning og muliggør en automatisk, skånsom og effektiv afvaskning fra filteret.

### Genfindning af bakterier ved Cross-Flow filtrering

Tilsvarende forsøgene for Dead-End filtrering er der lavet forsøg, hvor detektion af bakterier ved mange 100 ml prøver sammenholdes med kun én analyse af en opkoncentreret prøve. Ved at bruge Cross-Flow metoden kunne der genfindes op til 87 % sammenlignet med den direkte detektion. Det er en klar forbedring i forhold til Dead-End



Figur 2: "IDEXX på beholder" viser E.coli koncentrationen i blandebeholderen fundet ved analyse af 10 styk 100 ml prøver. De øvrige søjler i figuren viser E.coli koncentrationen fundet ved membranfiltrering med to forskellige filtre (porestørrelse på 0,22 og 0,45  $\mu\text{m}$ ) og efterfølgende to forskellige afvaskningsprocedurer (omrystning og omrøring).



Figurtekst figur 3: Sammenligning af Dead-End filtrering og Cross-Flow filtrering.

metoden. Men den helt store gevinst ligger i den automatiske proces. Med den udviklede metode og udstyr er der ingen tidskrævende håndtering af filteret. Fra apparatets hane kan der tappes 100 ml koncentrat, der indeholder bakterierne fra mellem 10 og 100 liter vand. Prøvetagningen er lige så nem som fra et hvert andet aftapningssted. Således er det muligt at følge E.coli koncentrationen langt under kravværdien, uden at antallet af prøver skal øges.

### Opkoncentrering som forbehandling

Opkoncentrering med Cross-Flow filtrering som forbehandling til forskellige former for biologiske analyser har mange og lovende perspektiver. Allerede nu kan metoden anvendes til at sænke detektionsgrænsen med en faktor 100 eller 1000 for den akkrediterede analysemetode for E.coli (Colilert metode). Der er ikke specielle krav til dem der udfører

analysen, prøven skal bare aftappes efter opkoncentreringen er udført.

I et igangværende projekt "Detection of E. coli bacteria with modular system", der er støttet af Miljø- og Fødevarerministeriets program MUDP, arbejdes der på en ny metode, som kombinerer opkoncentrering af bakterier (Amphi-Bac) med en patenteret molekylærbestemmelse af E. coli vha. DNA (BluSense Diagnostics). DNA-metoden kan på bare cirka 20 minutter detektere E.coli i drikkevandet, men følsomheden på metoden er ikke god nok til at den kan anvendes direkte. Derfor er en kombination af opkoncentreringsmetoden og DNA metoden nødvendig hvis E.coli skal kunne detekteres både hurtigt og med en tilpas lav detektionsgrænse. I projektet skal BluSense Diagnostics og Amphi-Bac udvikle en metode hvorpå bakterier fra over 1.000 liter drikkevand kan opkoncentreres i et slutvolu-

### Faktaboks MUDP projekt:

Detection of E. coli bacteria with modular system  
 Hovedansøger: BluSense Diagnostics Aps  
 Medansøger: Amphi-Bac og Kalundborg Vandforsyning  
 Tilskud fra MUDP: 3.340.560 Kr.  
 Egenfinansiering: 1.611.240 Kr.  
 Varighed: Oktober 2017 til september 2019

men på <10 ml, så en hurtig og følsom molekylærbestemmelse af E. coli vha. DNA bliver mulig. Kalundborg Vandforsyning skal som medansøger afprøve og validere metodens anvendelighed i driftsmæssig sammenhæng.

I forhold til helt andre anvendelser forventes denne teknologi også at være brugbar. Fx er det vist, at Cross Flow filtreringsmetoden i nogle tilfælde også kan opkoncentrere DNA fra vand. Dette er brugbart i forbindelse med natur- og miljøovervågning baseret på eDNA (environmental DNA). Det er sandsynligt at Cross Flow filtreringsteknikken i mange situationer kan sænke detektionsgrænsen, hvis man leder efter lave koncentrationer af eDNA-spør fra organismer i en vandprøve (Find beskyttet vandbille med e-DNA. Vand & Jord, Årg. 24, nr. 2 (2017), S. 74-76).