

DS 2250 – DS 2256 erstatter DS 265.1 – .2 og DS/R 265.3.

*DS 2250 – DS 2256 replaces DS 265.1 – .2 and DS/R 265.3.*

## 1 Orientering og anvendelsesområde

En række sygdomsfremkaldende mikroorganismer kan spredes gennem vand. I den rutinemæssige overvågning af vands hygiejniske tilstand er det ikke praktisk muligt at undersøge for samtlige disse smitstoffer. I stedet anvendes bestemmelser af indikatororganismer, hvorved forstås mikroorganismer, der forudsættes altid at kunne forekomme sammen med sygdomsfremkaldende mikroorganismer, og at være mindst lige så resistente som disse i det vandige miljø. Det er næppe muligt at finde en enkelt mikroorganisme, der under alle forhold vil opfylde det ideelle krav til en indikatororganisme.

Coliforme bakterier omfatter en gruppe af morfologisk og biokemisk nært beslægtede bakterier, hvoraf nogle er vidt udbredt i jord og overfladevand og kan vokse heri, medens andre, specielt **Escherichia coli** (**E. coli**) anses for at være specifikke tarmbakterier hos varmblodede dyr inkl. mennesker, hvorfor de hyppigt betegnes som fækale colibakterier.

Påvisning af **E. coli** i vand og sedimenter indicerer en frisk, fækal forurening. Ved mistanke om fækal forurening af ældre dato kan det være nødvendigt at supplere undersøgelsen for termotolerante coliforme bakterier med undersøgelse for andre indikatororganismer (fx **Clostridium perfringens**).

Der findes ingen hurtige og enkle metoder, der tillader en specifik påvisning af **E. coli**. Ved at udnytte denne bakteries evne til visse biokemiske aktiviteter ved 44 °C kan dog opnås en praktisk anvendelig tilnærmet bestemmelse (presumptive **E. coli**), idet **E. coli** vil udgøre langt den overvejende del af sådanne termotolerante coliforme bakterier.

Den beskrevne metode kan anvendes til undersøgelse af råvand dvs. vand fra brønd eller boring, ledningsvand, badevand, vand fra svømmebassiner, overfladevand, spildevand, slam og sedimenter. Vedrørende marint badevand, henvises til pkt. 6.8.

Det skal bemærkes, at anvendelsen af et galdesalt som selektivt princip i opformeringssubstratet i varierende grad kan hæmme svækkede coliforme bakterier. Dette vil gøre sig gældende specielt i chlorbehandlet vand, hvorfor der ved undersøgelse af sådanne prøver bør benyttes et andet selektivt princip (glutaminsyresubstrat).

## 2 Definitioner

- 2.1 **Coliforme bakterier** defineres i denne standard som stavformede, ikke sporedannende, gramnegative, fakultativt anaerobe bakterier, der kan vokse ved tilstedeværelse af galdesalte, og som er i stand til at danne syre og luft ved forgæring af laktose ved 35 – 37 °C inden for 48 timer.
- 2.2 **Termotolerante coliforme bakterier** defineres i denne standard som coliforme bakterier, som også ved 44 °C er i stand til at forgære laktose under dannelse af syre og luft, og som ved denne temperatur kan danne indol ud fra tryptofan.

### 3 Princip

Passende mængder af prøven eller fortyndinger heraf podes i et flydende selektivt laktoseforgæringssubstrat i parallelrækker i reglen med 5 glas i hver række. Disse primærkulturer inkuberes ved 35 – 37 °C i 48 timer. På grundlag af kombinationen af kulturer med positiv og negativ reaktion, findes det mest sandsynlige antal coliforme bakterier pr. 100 ml ved opslag i en MPN-tabel. Fra positive primærkulturer anlægges sekundærkulturer i selektivt laktoseforgæringssubstrat og i tryptonvand. Sekundærkulturerne inkuberes i vandbad med  $44 \pm 0,2$  °C i indtil 48 timer, hvorefter antallet af kulturer med såvel syre- og luftdannelse som indoldannelse registreres (positive sekundærkulturer). På grundlag af kombinationen af positive og negative kulturer findes det mest sandsynlige antal termotolerante coliforme bakterier pr. 100 ml

### 4 Fortyndingsvæske, dyrkningssubstrater og reagenser

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

#### 4.1 Fortyndingsvæske (phosphatbuffer pH 7,2)

Dikaliumhydrogenphosphat, $K_2HPO_4$	3 g
Kaliumdihydrogenphosphat, $KH_2PO_4$	1 g
Destilleret vand	1000 ml

Opløsningen autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter

#### 4.2 Forgæringssubstrater

##### 4.2.1 *MacConkey bouillon:*

	dobbelt styrke	enkelt styrke
Natriumtaurocholat	10 g	5 g
Laktose	20 g	10 g
Pepton	40 g	20 g
Natriumchlorid, NaCl	10 g	5 g
Destilleret vand ad	1000 ml	1000 ml

Komponenterne blandes og efter opløsning indstilles pH på 7,4. Der tilsættes 2 ml af en 1 % alkoholisk bromcresolpurpuropløsning til substratet af enkeltstyrke (4 ml til substratet af dobbelt styrke).

Substratet fordeles i reagensglas (fx 180 × 18 mm), forsynet med durhamrør med ca. 10 ml i hvert glas. Benyttes 50 ml udsædsdoser afmåles 50 ml substrat i 150 ml flasker forsynet med durhamrør eller i store reagensglas. Det færdige substrat autoklaveres ved 110 °C i 15 minutter. Efter autoklaveringen må der ikke være synlig luft i durhamrøret.

4.2.2 *Glutaminsyresubstrat (Gray's modificerede bouillon):*

	Dobbelt styrke	
Natrium L (+) glutamat	12,7	g
Laktose	20	g
Natrium formiat	0,5	g
L-cystin	0,04	g
L (-) asparaginsyre	0,048	g
L (+) arginin monohydrochlorid	0,04	g
Thiamin	0,002	g
Nikotinsyre	0,002	g
Pantothensyre	0,002	g
Magnesiumsulfat, MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2	g
Ferriammoniumcitrat	0,02	g
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,02	g
Dikaliumhydrogenphosphat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,8	g
Ammoniumchlorid, NH <sub>4</sub> Cl	5	g
Destilleret vand	1000	ml

pH indstilles på 7, der tilsættes 2 ml 1% alkoholisk bromcresolpurpuropløsning, og substratet autoklaveres ved 110 °C i 10 minutter, hvorefter pH vil være 6,7.

Enkelt styrke fremstilles ved at fortynde ovenstående med lige rumfang vand.

Substratet aftappes som angivet for MacConkey's bouillon.

Ligeværdige substrater af tilsvarende sammensætning, som nævnt ovenfor, er tilgængelige i dehydreret form og kan benyttes.

4.3 **Tryptonvand**

Tryptone	10 g
Natriumchlorid, NaCl	5 g
Destilleret vand ad	1000 ml

Efter opløsning indstilles pH på 7,4. Substratet fordeles på reagensglas med ca. 5 ml i hvert glas. Autoklaveres ved 121 °C i 15 minutter.

4.4 **Kovács' indolreagens**

p-Dimethylaminobenzaldehyd	5 g
n-Pentanol	75 ml
Koncentreret saltsyre	25 ml

Det brugsfærdige reagens skal have en gullig farve. Opbevares i køleskab.