

# Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 22 1991

Overlevelse af specifikke  
mikroorganismer i  
akvatiske miljøer

Miljøministeriet **Miljøstyrelsen**

Strandgade 29, 1401 København K, tlf. 31 57 83 10

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, nr. 22/1991

Overlevelse af specifikke  
mikroorganismer i  
akvatiske miljøer

Ole Nybroe, Kirsten Christoffersen og  
Bo Riemann, Vandkvalitetsinstituttet

MILJØSTYRELSEN  
BIBLIOTEKET  
Strandgade 29  
1401 København K

Miljøministeriet  
Miljøstyrelsen

Miljøstyrelsen vil, når lejlighed gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling.

Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter.

Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

## INDHOLDSFORTEGNELSE

0.	RESUMÉ.....	ii
1.	INDLEDNING.....	1
2.	PROBLEMSTILLING.....	2
3.	BAGGRUND.....	5
3.1	Mikroorganismers tilpasning til akvatiske miljøer .....	5
3.2	Detektionsmetoder til påvisning af mikroorganismer i miljøet.....	8
3.3	Overlevelsesstudier med <u>E.coli</u> .....	11
3.4	Overlevelsesstudier med andre organismer.....	15
3.5	Overlevelse af naturlige bakteriepopulationer.....	15
4.	MATERIALER OG METODER.....	18
4.1	Modelorganisme.....	18
4.2	Detektionsmetoder.....	18
4.3	Modeløkosystemer.....	19
4.4	Feltanalyser.....	22
5.	RESULTATER.....	24
5.1	Indledende laboratorieforsøg.....	24
5.2	Feltforsøg i mesokosmos modeløkosystemer.....	26
5.3	Laboratorieforsøg i mikrokosmos modeløkosystemer..	32
6.	DISKUSSION.....	39
6.1	Modelorganismens overlevelse.....	39
6.2	Økosystemeffekter.....	42
6.3	Moniteringsstrategi.....	45
7.	REFERENCER.....	50
8.	BILAG.....	58

Formålet med nærværende rapport har været: 1) at belyse hvilke typer undersøgelser, der bør indgå i en risikovurdering af genetisk modificerede mikroorganismer, og 2) hvorledes der hensigtsmæssigt kan monitoreres for mikroorganismer, der er udsat eller udledt til miljøet.

I rapporten gives der, baseret på litteraturen, en oversigt over hvilke faktorer, der påvirker bakteriers vækst og overlevelse i vandige miljøer. Med udgangspunkt i en kort omtale af bakteriers fysiologiske tilpasning til sult- og andre stressfaktorer, gøres der rede for, hvilke krav der stilles til de metoder, der anvendes til at påvise bakterier i deres naturlige habitater.

Rapporten omfatter desuden resultater af laboratorie- og feltforsøg med overlevelse af Bacillus licheniformis (typestamme, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) i havvand. Test-organismen er påvist med to antistof-baserede metoder, idet en direkte metode rettet mod alle test-organismens celler blev kombineret med en dyrkningsafhængig metode.

Overlevelsesundersøgelserne er dels gennemført i laboratoriebaserede mikrokosmos modeløkosystemer og dels i mesokosmos modeløkosystemer etableret i felten. Resultaterne viser, at den anvendte stamme af Bacillus licheniformis overlever dårligt i havvand. De fysisk-kemiske faktorer i modelsystemerne har ikke tilladt vækst af test-organismen, men der synes at have forekommet egentlig celledød i form af cellelysis. Desuden har predation af protozoer været medvirkende til at reducere test-organismens populationsstørrelse.

En sammenligning af resultater opnået i mikrokosmos og mesokosmos modelsystemer viser, at systemerne ikke er direkte sammenlignelige og at laboratoriebaserede undersøgelser bør suppleres med feltafprøvninger.

De anvendte detektionsmetoder og test-koncepter er velegnede til at vurdere genetisk modificerede organismers overlevelse i et akvatisk miljø. På baggrund af disse erfaringer stilles forslag til hvordan risikovurdering af en genetisk modificeret organisme mest hensigtsmæssigt foretages.

Dette projekt er et led i en række projekter, der sigter mod at forbedre det videnskabelige grundlag for at foretage risikovurderinger af genetisk modificerede mikroorganismer. Vandkvalitetsinstituttet (VKI) har i 1989 udført et projekt for Miljøstyrelsen (MST) vedrørende "Immunkemisk detektion af mikroorganismer i miljøprøver". I nærværende projekt er disse metoder anvendt sammen med modeløkosystemer til at følge skæbnen af en modelorganisme udsat i miljøet.

Projektets formål er at belyse: 1) hvilke typer af undersøgelser, der bør indgå i en risikovurdering af genetisk manipulerede mikroorganismer, og 2) hvorledes man hensigtsmæssigt kan monitorere organismer, der er udsat eller udsluppet til miljøet.

De overordnede overvejelser om hvordan en mikroorganismes skæbne i miljøet måles og tolkes er uafhængig af, hvorvidt mikroorganismen er gensplejset eller ikke. Af praktiske grunde er nærværende undersøgelse gennemført med en testorganisme, der ikke er genetisk modificeret. Det oprindelige udgangspunkt for projektet var et ønske om at monitorere tilstedeværelsen af en produktionsorganisme efter længere tids udledning til et kystnært, marint miljø. Dette lod sig imidlertid ikke gennemføre, idet den relevante virksomhed ikke ønskede at stille organismen til rådighed. Det var som følge heraf ikke muligt at etablere en specifik detektionsmetode rettet mod produktionsorganismen. Projektet blev derfor omformuleret til et udsætningsforsøg, hvor produktionsorganismens skæbne i et mesokosmosmodeløkosystem kunne undersøges i et tæt samarbejde med virksomheden. Det var dog stadig ikke muligt at få produktionsorganismen stillet til rådighed. Som konsekvens heraf blev der gennemført et projekt omhandlende udsætningsforsøg med typestammen af Bacillus licheniformis: DSM 13 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen). Denne art er relevant for industriel produktion. Under et tidligere projekt for MST er der udviklet en antistof-baseret detektionsmetode for DSM 13, som her er afprøvet på et marint miljø.

I projektet har udstyr og materialer til etablering af feltbaserede mesokosmos modeløkosystemer været stillet til rådighed af et igangværende EF-projekt: "Structure and Function of Coastal Ecosystems" (SAFE), som udføres af VKI. Denne kobling har desuden gjort det muligt at undersøge modelorganismens overlevelse i et velkarakteriseret økosystem. Under projektets gang viste det sig hensigtsmæssigt at supplere undersøgelserne i mesokosmossystemet med overlevelsesstudier i laboratoriebaserede mikrokosmos modeløkosystemer.

Rapporten omfatter resultaterne af overlevelsesundersøgelser foretaget i de anvendte modeløkosystemer. Resultaterne sammenlignes med lignende forsøg udført med andre bakterier. Desuden vurderes de anvendte metoders generelle anvendelighed for risikovurdering og monitorering af genetisk modificerede mikroorganismer.

## 2. PROBLEMSTILLING

Anvendelse af genetisk modificerede mikroorganismer (GMO) har mange lovende muligheder, f.eks. inden for den bioteknologiske industri samt inden for landbrugs- og miljøområdet.

Foreløbig er anvendelsen af GMOs blevet begrænset af hensyn til miljøet. De kontrollerende myndigheder har imidlertid manglet analyser af, hvilke konsekvenser anvendelsen af disse organismer kan have på det ydre miljø. Hidtil er der foretaget risikovurderinger "case by case" og "step by step". Der har således ikke været nogen fast strategi for risikovurdering af GMO før deres anvendelse eller ved monitorering af organismen under og efter anvendelsen.

Overordnet set falder anvendelsen af GMO i to væsensforskellige kategorier: 1) anvendelse af GMO som produktionsorganismer ved bioteknologisk produktion af rekombinante genprodukter f.eks. enzymer, hormoner og vækstfaktorer 2) anvendelse af GMO til at løse specifikke opgaver efter udsætning i miljøet. Det kan for eksempel dreje sig om organismer, der fungerer som biologiske pesticider eller som kan nedbryde svært

omsættelige xenobiotiske stoffer.

En eventuel udledning af produktionsorganismer til miljøet søges begrænset ved fysiske indeslutningsforanstaltninger, som dog næppe kan forventes at være 100% effektive til enhver tid. Hvad angår produktionsorganismer, tilstræbes det at anvende organismer, der er tilpassede vækstkravene i produktionsanlægget. Organismerne vil dermed ikke forventes at være tilpasset betingelserne i det ydre miljø. Udledning af produktionsorganismer til akvatiske miljøer kan dels ske som en kontinuerlig tilførsel af små mængder af organismen med spildevandet; dels som kortvarige men store udledninger i forbindelse med et eventuelt sammenbrud af de fysiske indeslutningsforanstaltninger.

GMO, der skal løse specifikke opgaver efter udsætning, er designet til at overleve i miljøet i kortere eller længere tid og frembyder derfor intuitivt en større miljørisiko end produktionsorganismer. Desuden udsættes de typisk i høj koncentration på en begrænset lokalitet. Det kan muligvis betyde, at populationens størrelse lettere når den kritiske værdi, der er nødvendig for permanent etablering.

Før der kan gives tilladelse til anvendelse af en genetisk modificeret mikroorganisme, skal der ifølge eksisterende lovgivning gennemføres en risikovurdering. En risikovurdering må tage sit udgangspunkt i et indgående kendskab til den modificerede organisme og den vildtype, den er skabt fra. For eksempel vil det være problematisk at anvende sygdomsfremkaldende organismer eller organismer, som indgår i symbiose med andre arter.

Dernæst er det nødvendigt at kende organismens vækstkrav og evne til at overleve i naturen. For øjeblikket har man kun et begrænset og overordnet kendskab til, hvilke faktorer der regulerer naturligt forekommende bakteriers vækst og overlevelse. Man ved endnu mindre om, hvorledes populationer af genetisk modificerede mikroorganismer reguleres.

En vurdering af det rekombinante gens evne til at spredes fra en GMO til den naturlige bakteriepopulation indgår i risikoenalysen. Man ved allerede, at genudveksling foregår i naturlige miljøer; men kendskab til hvilke faktorer, der påvirker genoverførsel stammer stort set fra laboratorieforsøg.



Udledning af en GMO kan forventes at påvirke det økosystem hvortil udledningen foregår. Det vil derfor være ønskeligt at kende organismens påvirkning af populationssammensætningen i systemet og af stof-flowet igennem systemet.

En gennemførelse af risikovurderinger af GMOs er således en særdeles omfattende opgave. Områdets kompleksitet øges ved, at mange forskellige arter kan forventes at blive værter for forskellige gensystemer, og ved at gensplejsede mikroorganismer tænkes anvendt i vidt forskellige miljøer. Derfor kan risikovurderinger med vor nuværende viden kun foretages gennem "case-by-case" og "step by step" vurderinger, hvor hver enkelt organisme analyseres nøje.

En vigtig forudsætning for at kunne foretage en risikoanalyse er, at man råder over følsomme og pålidelige metoder til at påvise såvel organismen som det rekombinante gen i naturen. Traditionelt er påvisning af mikroorganismer foregået ved pladespredningsteknikker, som har krævet et dyrkningstrin i laboratoriet. En stor del af de bakterier, som lever i miljøet findes imidlertid i en "viable but not culturable" tilstandsform. Da disse ikke-dyrkbare bakterier er økologisk relevante, har man udviklet detektionsmetoder, som kan påvise test-organismen direkte, uden opdyrkning i laboratoriet. Detektionsmetoderne kan enten være rettet mod fænotyper baseret på antistof-antigen genkendelse (antistof-prober) eller mod genotyper baseret på DNA-DNA genkendelse (DNA-prober). Det tilstræbes at gøre metoderne så følsomme, at de kan spore selv ganske små populationer.

Med disse metoder kan en testorganismes og/eller et testgens skæbne følges i et såkaldt modeløkosystem. Når der arbejdes med en genetisk modificeret organisme med ukendte egenskaber, må forsøgene gennemføres i et indesluttet modelsystem, som eventuelt kan destrueres efter forsøget. I relation til risikovurdering (som beskrevet i OECD (1990)) kan indledende overlevelses-eksperimenter foretages som laboratorieforsøg i mikrokosmos-modeløkosystemer. Efterfølgende kan der foretages feltafprøvninger i større skala, for eksempel ved anvendelse af mesokosmos-modeløkosystemer, der så vidt muligt skal hindre spredning af modelorganismen.

Anvendelsen af modeløkosystemer kan ikke simulere alle tænkelige naturlige miljøer. Derfor må risikovurderinger baseret på en tilsyneladende dårlig overlevelse i et enkelt system tolkes med forsigtighed. Der er imidlertid ingen tvivl, om at kombinationen af specifikke detektionsmetoder og velkarakteriserede modeløkosystemer er den mest farbare vej mod en forståelse af gensplejsede mikroorganismers økologi.

### 3. BAGGRUND

#### 3.1 Mikroorganismers tilpasning til livet i akvatiske miljøer

I naturlige miljøer stilles bakterier overfor livsforhold, der radikalt afviger fra de laboratorieforhold, hvorunder mikrobiologer traditionelt har studeret bakteriel vækst og overlevelse. Mikrobiologiske vækstmedier indeholder tilstrækkelige substrater og næringssalte, og bakterier dyrkes oftest under konstante og velkarakteriserede forhold. I modsætning hertil indeholder naturlige akvatiske miljøer ofte kun begrænsede mængder af energikilder og næringssalte, samtidig at med disse varierer i tid og rum afhængigt af biotiske og abiotiske faktorer. Det er derfor ikke muligt at definere en normalt tilstand for miljølevende bakterier, men man kan konstatere, at de fremherskende vækstbetingelser formodentlig er suboptimale (Roszak and Colwell, 1987; Kjelleberg et al., 1987).

Bakterier har aktive kontrolmekanismer, som gør dem i stand til at tilpasse sig næringsfattige forhold. Disse mekanismer er især undersøgt for bakterier, som forekommer i, eller er udsat til marine miljøer. Når bakteriestammer, som ikke naturligt forekommer i havet, inkuberes i næringsfattigt havvand, ses en tendens til at alle cellebestanddele som protein, RNA og muligvis DNA metaboliseres, således at deres mængde i cellen aftager. Desuden kan der syntetiseres sult-specifikke celleoverfladeproteiner.

Der er dog betydelig forskel mellem de undersøgte stammer, og man kan ikke generalisere, hvad angår sammenhængen mellem

specifikke cellebestanddele og sult. Derimod er det generelt, at evnen til at overleve sult-tilstanden afhænger af bakteriens evne til at nedsætte metabolismen (Kjelleberg et al., 1987).

Hos naturligt forekommende marine bakterier er sult-betingede overlevelsesmekanismer specielt godt undersøgt hos *Vibrio* sp., hvor sult-responset er sammensat af to faser. I den første fase, hvis længde varierer med forsøgsomstændighederne, sker der en kraftig øgning af respirationen og et tilsvarende hurtigt fald i cellens oplagsstoffer. Samtidig sker en ændring af celleoverfladens protein- og (formodentlig) kulhydratsammensætning (Albertson et al., 1987; Kjelleberg et al., 1987) ligesom cellerne kan fragmentere til "ultramikroceller" < ca. 0,3 µm, hvilket er ensbetydende med et øget celletal (Kjelleberg et al., 1987; Morita, 1988). Den anden fase kendetegnes af en ekstremt lav metabolisme og langsomt faldende koncentrationer af DNA, RNA, protein m.v. I denne fase er cellernes morfologi ret konstant. Resultatet af sult-tilpasningen er, at cellerne kan bevare et målbart stofskifte (og altså være i live) i flere år.

Indenfor mikrobiologien defineres vækst som en øgning i celleantal eller som en ordnet stigning af biomasse (Stanier et al. 1988; Morita, 1988). Forudsætningen for at anvende disse vækst mål er, at der foregår en balanceret vækst, hvor stigningen i biomasse er sammenlignelig med stigningen i alle andre målbare vækstparametre for den undersøgte population (Stanier et al. 1988).

Vækst i naturlige miljøer er ikke balanceret (Morita, 1988), således at vækstperioder afløses af perioder med ikke-vækst eller sult. Generationstiden i marine miljøer er meget lang, ofte dage op til uger (Roszak and Colwell, 1988). Yderligere er det kun en lille procentdel af bakteriepopulationen, der på et givent tidspunkt er i aktiv vækst. Disse forhold besværliggør traditionelle vækstmålinger, ligesom cellefragmentation ved sult ikke repræsenterer vækst i traditionel forstand. Grænsen mellem vækst og ikke-vækst er derfor flydende. En meningsfuld bestemmelse af en miljølevende bakteries vækst kræver typisk, at der anvendes mere end ét vækst mål.

Begrebet "viability" er defineret ved at en "viable" celle

er en celle, der er i stand til at dele sig under optimale vækstforhold (Postgate, 1976), og er således tæt knyttet til den traditionelle opfattelse af vækst som celledeling. Indtil for ca. 10 år siden blev en bakteries overlevelse ofte undersøgt ved at følge organismens evne til at vokse på/i diverse vækstmedier. Man kan sige at "viability" er blevet identificeret ved "culturability".

For miljølevende bakterier bryder denne definition sammen, idet man har vist at bakterier kan findes i en "viable but not culturable" tilstand (Grimes et al., 1986). Sådanne celler kan være "viable" derved at de er aktivt respirerende eller udviser aktiv indbygning af tilsatte substrater (Xu et al., 1981; Grimes et al., 1986). Disse celler kan dog ikke opdyrkes på traditionelle meget næringsrige medier. "Culturability", eller dyrkbarhed kan til tider fremmes ved at indføre et resuscitations-trin, hvor cellerne inkuberes i et fortyndet, letomsætteligt medie uden selektionspres, før de udsættes for de relevante selektive dyrkningsomstændigheder (Roszak and Colwell, 1987). Den altovervejende procentdel af miljølevende bakterier findes som "viable but not culturable" celler og er yderligere økologisk relevante derved, at de som nævnt deltager i stofomsætninger i deres habitat (Roszak and Colwell, 1987). Der synes at være en vis sammenhæng mellem "ultramicroceller" og "viable but not culturable" celler, se Morita (1988).

Da det er svært nøjagtigt at definere, hvad der forstås ved en levende bakterie, er det ligeledes svært at definere et dødkriterium. I denne rapport vil følgende definitioner blive anvendt:

- |                  |   |
|------------------|---|
| Levende celler:  | celler, som udviser en eller anden form for målelig metabolisk aktivitet.                                     |
| Døde celler:     | celler, hvor der ikke kan påvises metabolisk aktivitet og/eller hvor cellens morfologiske integritet er tabt. |
| Dyrkbare celler: | celler, som er i stand til at dele sig på definerede vækstmedier.   |

Bakterier i miljøet kan som nævnt ovenfor findes i forskellige fysiologiske tilstandsformer. Derfor er resultatet af "overlevelsesforsøg" stærkt afhængigt af hvilken metode, der anvendes til at påvise organismen.

Dyrkningsmetoder, der kræver at test-organismen kan dele sig under laboratorieforhold har været den eneste anvendte detektionsmetode i mange overlevelsesstudier for diverse mikroorganismer (Fujioka et al., 1981; Evison, 1988; Awong et al., 1990; Chao and Feng, 1990). Den mest anvendte dyrkningsmetode er at udplade organismen på generelt eller selektivt medie og dernæst opgøre antallet af fremvoksede kolonier. Valget af dyrkningsmedie kan påvirke resultatet af et overlevelsesstudie. I nogle studier opnåes samme resultater ved anvendelse af generelt og selektivt medie (Awong et al., 1990), andre opnår færre kolonier på selektivt - end på generelt medie (Chaundhry et al., 1989), og atter andre får flest kolonier på selektivt medie (Amy and Hiatt, 1989).

Most Probable Number (MPN) metoder er et alternativ til udpladningsteknikker når dyrkbare mikroorganismer skal påvises. Metoden bygger på, at en prøve ved gentagne fortyndinger fortyndes til udslukningspunktet, hvorefter en statistisk analyse kan bestemme antallet af bakterier i den oprindelige prøve (Atlas og Bartha, 1987) .

Den væsentligste anke ved anvendelse af dyrkningsmetoder er at man anvender "dyrkbarhed" som livskriterie og derved ignorerer "viable but not culturable" bakterier. Til gengæld har metoderne en høj følsomhed, typiske 10 dyrkbare celler (colony forming units, cfu) ml<sup>-1</sup>, som yderligere kan øges ved at opkoncentrere prøvematerialet ved filtrering.

I de senere år er der sket en udvikling af molekylærbiologiske detektionsmetoder til påvisning af specifikke mikroorganismer i miljøet. Den mulige anvendelse af GMOs har især fremmet brugen af metoder, der anvender DNA-prober til at påvise en specifik genotype. Hvad angår en detaljeret beskrivelse af

disse detektionsmetoder og deres anvendelse til at spore gensplejse mikroorganismer i miljøet henvises til Jain et al. (1988), Atlas et al. (1989) og Trevors and van Elsas (1989). Metodernes anvendelsesmuligheder vil dog kort blive omtalt herunder.

Udpladningsmetoder kan kombineres med molekylære detektionsmetoder. De fremvoksede koloniers molekylære identitet kan således klarlægges ved enten en gen-probe (Sayler et al., 1985) eller ved et antistof (Olsen and Rice, 1989) i den såkaldte koloniblotting-metode. Steffan et al. (1989) sammenlignede resultatet af at benytte selektiv kontra generel udpladning efterfulgt af DNA-koloniblotting. De fandt, at den generelle udpladning-koloniblotting metode havde problemer med at påvise test-organismen når den udgjorde  $< 0,1\%$  af den samlede dyrkbare population i et ferskvands modeløkosystem. Følsomheden af den generelle udpladnings-koloniblotting metode faldt derved til ca.  $10^4$  cfu/ml. Det var nødvendigt, at specificiteten af metoden blev defineret af gen-proben, idet der kom kolonier af ikke-test-organismer på såvel generelt som selektivt medie (Stefan et al., 1989). Samme erfaringer rapporteres af Amy and Hiatt (1989). Steffan et al. (1989) sammenlignede yderligere udpladning-koloniblotting med en MPN-metode, hvor positive prøver blev identificeret gennem positiv reaktion med DNA-proben. MPN-metoden gav resultater, som var sammenlignelige med selektiv udpladning-koloniblot, men resultaterne var mere variable.

Genprobe-baserede metoder er blevet anvendt til direkte påvisning af genotyper i miljøprøver. Ved anvendelse af sådanne metoder er det nødvendigt først at oprense DNA fra prøven. I vandige miljøer sker dette lettest ved at koncentrere mikroorganismerne på et membranfilter, lysere dem med en stærk anionisk detergent og derefter oprense DNA fra lysatet ved traditionelle molekylær-biologiske metoder (Fuhrman et al., 1988; Somerville et al., 1989). Mængden af testorganismens DNA i prøven kan derefter kvantiteres ved en Slot-blot metode (Stefan et al., 1989; Knight et al. 1990; Morgan et al., 1989; Chaundhry et al., 1989). Følsomheden for disse metoder er fra ca.  $10^3$  celler  $\text{ml}^{-1}$  til ca.  $10^6$  celler  $\text{ml}^{-1}$ , afhængig af DNA-probens egenskaber, men

kan forbedres til ca. 1 celle ml<sup>-1</sup> ved at øge kopitallet af test-DNA ved hjælp af polymerase chain reaction (PCR; Stefan and Atlas, 1988; Bej et al., 1990). For øjeblikket er PCR ikke en fuldt kvantitativ metode, men den kan formodentlig gøres kvantitativ ved at udvikle en MPN-metode, hvor genproben benyttes til at påvise positive prøver.

Detektionsmetoder baseret på antistoffer kan ligeledes anvendes til direkte påvisning af mikroorganismer i miljøet. Antistofferne bestemmer metodens specificitet, og der er et enkelt eksempel på, at antistoffer mod et rekombinant genprodukt, i dette tilfælde et enzym, er blevet anvendt til at påvise en GMO (Morgan et al., 1989). Oftest er metoderne dog anvendt til at påvise naturligt forekommende arter eller stammer. Ofte har man kunnet opnå tilstrækkelig specificitet ved anvendelse af polyklonale antistoffer, se Nybroe (1990). Monoklonale antistoffer kan give endnu bedre specificitet. De har dog i visse tilfælde vist sig uegnede til at påvise testorganismen i miljøet, selv om de var velegnede til klinisk brug (Vickers, et al., 1990). Årsagen kan for eksempel være sult-betingede ændringer i test-bakteriens overfladestruktur, og observation understreger vigtigheden af at afprøve såvel antistoffets specificitet som stabiliteten af den antistofbetingede genkendelse.

Den hidtil mest anvendte immunkemiske detektionsmetode er immunfluorescensmikroskopi (Bohlool, 1980). Ved denne metode visualiseres antigen-positive celler ved hjælp af en fluorescerede markør og kan optælles ved mikroskopering. Metoden er derfor tidskrævende, og den har en følsomhed på ca. 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> celler ml<sup>-1</sup> afhængig af prøvetypen. Nyere, og potentielt mere følsomme metoder som DOT-blot og ELISA (se Nybroe, 1990) er endnu kun anvendt i begrænset omfang til påvisning af naturligt forekommende - eller genetisk modificerede bakterier (Kemp et al., 1988, Arredondo et al., 1989; Morgan et al., 1989; Nybroe, et al., 1990). Et betydeligt udviklingsarbejde er stadig påkrævet for at forøge følsomheden af disse metoder, som i dag ligger på ca. 10<sup>4</sup> celler ml<sup>-1</sup>.

Hvor dyrkningsmetoder kan påvise dyrkbare celler, påviser gen-probe- og antistofbaserede teknikker geno- eller fænotyper

så længe den struktur, som de genkender er intakt. De kan derfor påvise såvel levende som døde celler.

Immunfluorescensmikroskopi kan imidlertid kombineres med målinger af enkelte cellers aktivitet. Dette kan enten ske ved at identificere antigen-positive cellers volumenforøgelse efter næringstilsætning under omstændigheder hvor celledeling er hæmmet (Direct Viable Count Method, DVC; se Brayton and Colwell, 1987). En anden mulighed er at identificere antigen-positive celler som har et aktivt elektrontransport system identificeret ved deres evne til at omsætte en specifik redox-indikator, INT. Disse kombinerede detektions- og aktivitetsbestemmelser er formodentlig noget af det tætteste, man kan komme på en vurdering af specifikke cellers livstilstand (Roszak and Collwell, 1988).

### 3.3 Overlevelsesstudier med Escherichia coli

Skæbnen af bakterier, som er tilført et miljø, hvor de ikke naturligt forekommer, er kun systematisk undersøgt for ganske få arter. Størst kendskab har man til miljøfaktoreres effekt på humane patogener som Salmonella sp. eller på indikatorbakterier for fækal forurening som E. coli eller gruppen fækale coliforme.

Effekten af forskellige miljøfaktorer på E. colis overlevelse opridses i det følgende. Hovedparten af undersøgelserne er foretaget som modelforsøg i laboratoriet og med "culturability", d.v.s. synlig fremvækst på medier, som kriterie for overlevelse. Resultaterne bliver her brugt til at indkredse nogle parametre, som potentielt kan påvirke en model-bakteries vækst og overlevelse. Jvf. afsnit 3.1 kan man dog ikke generalisere, hvad angår forskellige bakteriers respons på miljøfaktorer.

Med mindre andet er nævnt foregår de refererede forsøg med fysisk/kemiske parametre med 0,2 µm filtreret vand eller kunstigt havvand for at eliminere effekten af predation. I forsøgene med 0,2 µm filtreret vand ændres det totale antal bakterier målt ved direkte metoder som regel ikke. Der er derfor alene ændringer i dyrkbarhed eller aktivitet, der sammenfattes herunder.

Lys. Lys er en betydningsfuld regulator af E. coli's



overlevelse målt på flere forskellige måder. Fujioka et al. (1981) viste, at sollys nedsatte overlevelse (= dyrkbarhed) målt som  $T_{90}$  i havvand fra flere dage i mørke til 30-90 minutter i lys.  $T_{90}$  er et udtryk for den tidsperiode der går, før 90% af de undersøgte celler ikke længere kan påvises ved dyrkning. Forfatterne bemærkede, at lysets inaktiverende effekt bl.a. kunne gennemtrænge 3,3 m havvand og tilskrev den derfor primært synligt lys. Ved brug af kunstigt lys fandt Evison (1988) tilsvarende en  $T_{90}$  på 60-120 minutter i havvand og på 80-200 minutter i ferskvand. Endelig har Barcina et al. (1989; 1990) undersøgt effekten af synligt lys, på E. coli's overlevelse. I belyste prøver forsvandt E. coli's dyrkbarhed praktisk taget i løbet af 4 døgn i ferskvand, mens kolonier ikke længere kunne påvises efter 2 døgn i havvand. I de tilsvarende forsøg udført i mørke kunne der ikke konstateres et fald i antallet af dyrkbare E. coli.

Barcina et al. (1989; 1990) målte ligeledes E. coli's elektron transport aktivitet og  $^{14}\text{C}$ -glucoseindbygning i lys og i mørke. De to aktivitetsmål var konstante gennem 2-4 døgn i mørke, men faldt dramatisk ved lyspåvirkning. Aktivitetsmålene udviste derved ændringer, som stemte overens med dyrkbarheden.

Salinitet. E. coli's overlevelse synes at være bedre i ferskvand end i havvand, men det er svært at generalisere - oftest fordi de vandprøver, der anvendes til overlevelsesforsøg sjældent karakteriseres med hensyn til salinitet m.v., men blot benævnes ferskvand eller havvand.

Flere undersøgelser finder stabile plate-count værdier for rekombinante E. coli i søvand fra 7 dage (Amy and Hiatt, 1989; Chao and Feng, 1990) og op til adskillige måneder (Flint, 1987). Derimod finder Chaundhry et al. (1989), at dyrkbarheden for en rekombinant E. coli forsvinder efter 5-10 døgn, afhængig af hvilket dyrkningsmedie, der benyttes til udpladning. I denne undersøgelse følges model-organismens genotype ved en genprobe-PCR teknik, der giver positive signaler længe efter, at dyrkbare organismer er forsvundet.

I et studie af bl.a. E. coli's overlevelse i syntetisk havvand påviste Xu et al. (1982) en dårligere overlevelse ved

25 o/oo end ved 5 o/oo gennem en forsøgsperiode på 96 timer, og Evison (1988) fandt optimal overlevelse ved 8,5 o/oo. Xu et al. benyttede ikke blot dyrkningsteknikker til at vurdere overlevelse, men også DVC-metoden. Det viste sig, at en significant del af E. coli populationen var levedygtig målt ved DVC (Direct Viable Count Method), men ikke dyrkbar. Dermed var Xu et al. (1982) med til at danne konceptet om "viable, but not culturable" bakterier i miljøet.

Længerevarende overlevelsesstudier med to forskellige stammer af E. coli viste, at dyrkbarheden bevaredes i 6 henholdsvis 21 dage i 35 o/oo syntetisk havvand (Byrd and Colwell, 1990).

Når overlevelse af E. coli direkte sammenlignes i belyste systemer, synes den at være bedst i ferskvand, mens tilsvarende direkte sammenligninger i mørke giver det modsatte resultat (Evison, 1988; Barcina, et al., 1990).

Temperatur. Generelt synes overlevelsen af E. coli at være bedst ved lave temperaturer. For eksempel fandt Awong et al. (1990) at såvel en vildtype som en rekombinant E. coli overlevede bedre ved 15°C end ved 25°C og 30°C i diffusionskamre ophængt i et mikrokosmosmodelsystem med ferskvand.

Evison (1988) undersøgte overlevelse i ferskvand og havvand ved temperaturer fra 2-25°C og fandt  $T_{90}$  værdier på 70-80 timer ved 25°C gradvist stigende til 600-750 timer ved 2°C. Flint (1987) fandt også generelt højere overlevelse ved lavere temperaturer.

Disse resultater stemmer overens med den observation, at bakteriers evne til at overleve i miljøet afhænger af deres evne til at nedsætte deres stofskifte (Kjelleberg et al., 1987).

Næring. Overlevelsesforsøg foretaget med havvandsprøver på forskellige årstider, men ellers foretaget under sammenlignelige forhold, viste at antallet af dyrkbare celler faldt hurtigere i januar end i maj (Fiksdal et al., 1989). Årsagen kunne være en højere mængde tilgængeligt organisk stof i maj end i januar, og resultatet understrejer, at det langt fra er ligegyldigt, på

hvilken årstid overlevelseseksperimenter foretages. Tilsætning af næringsstoffer medfører som hovedregel en øget overlevelse, men sammenhængen mellem overlevelse målt som dyrkbarhed og næringskoncentration synes at være non-linear (Evison, 1988; Fiksdal et al., 1989).

Predation- og konkurrence. En række studier har sammenlignet overlevelse i filtreret og ikke-filtreret vand. Såvel i ufiltreret fersk- som i havvand finder man, at E. coli elimineres i løbet af 3-20 dage (Amy and Hiatt, 1989; Martinez et al., 1989; Awong et al., 1990; Chao and Feng, 1990).

Ved at udføre en yderligere filtrering fandt Amy and Hiatt (1989), at E. coli's overlevelse i 0,8  $\mu\text{m}$  filtreret vand lå imellem overlevelsen i ufiltreret og i 0,2  $\mu\text{m}$  filtreret vand, mens Martinez et al. (1989) rapporterede, at den partikulære fraktion der lå mellem 2  $\mu\text{m}$  og 0,2  $\mu\text{m}$  var den væsentligste årsag til E. coli's mortalitet i havvand. Ingen af disse forfattere kunne dog afklare, om mortaliteten var forårsaget af predation af f. eks. mikroflagellater eller af konkurrence med den endogene bakteriepopulation.

Andre faktorer Blandt andre årsager til, at E. coli kan forsvinde fra en given vandmasse er adsorption til partikler og efterfølgende sedimentation (Grimes et al., 1986). Bakterierne vil i dette tilfælde blive registreret som "døde" ved gængse metoder, men kan teoretisk overleve i mere næringsrige sedimenter, og blive resuspenderet efter fysisk eller biologisk forstyrrelse af sedimentet.

Bakterier, som er tilknyttet overflader ved adsorption eller adhæsion har ofte højere vækstrater end fritlevende bakterier, specielt i miljøer med lave koncentrationer af organisk stof (Iriberry et al., 1990; van Loosdrecht et al., 1990). Det er et diskussionspunkt, hvorvidt naturlige marine bakteriepopulationer hovedsaglig findes som fritlevende celler eller associeret til overflader (Kjelleberg et al., 1987). I kunstige indelukker øges det overfladeareal pr. volumen, der er til rådighed for bakteriel kolonisation, og undersøgelser af

bakteriers overlevelse bør tage højde herfor.

### 3.4 Overlevelsesstudier med andre bakterier

Udover af E. coli er det hovedsagligt andre Gram-negative bakterier, som Alcaligenes og Pseudomonas, der er anvendt i overlevelsesforsøg i mikrokosmos modeløkosystemer.

Det almindeligste resultat af denne type undersøgelser er, at antallet af modelorganismer reduceres i løbet af forsøgsperioden. For eksempel finder Steffan et al. (1989) et langsomt aftagende antal af Alcaligenes og Pseudomonas udsat i et ferskvandsmikrokosmossystem tilsat næring. Faldet blev iagttaget med såvel dyrkningsmetoder som direkte metoder. Tilsvarende tendens blev iagttaget for en 3-klorobenzoat nedbrydende Alcaligenes introduceret i et ferskvands/sediment modeløkosystem uden selektionspres (Fulthorpe and Wyndham, 1989). Langt bedre overlevelse på over 1 år er observeret for Pseudomonas og Klebsiella inkuberet i markafvandingsvand i en lys/mørke cyklus på 16/8 timer ved 16-20°C (Trevors et al., 1989). I dette forsøg fandt forfatterne, at organismernes overlevelse var reguleret af næringsmængde, tilstedeværelse af ilt og af konkurrence fra den endogene mikroflora.

Hvad angår Gram-positive bakterier er der såvidt vides kun foretaget overlevelsesforsøg med sporer af Bacillus thuringensis (Menon and de Mestral, 1985; Oham et al., 1987), som er svære at sammenligne med de overlevelsesforsøg med vegetative celler, som er refereret herover.

### 3.5 Overlevelse af naturlige bakteriepopulationer.

Abiotiske faktorer. En række fysiske og kemiske faktorer kan direkte og indirekte påvirke naturlige bakteriepopulationers vækst i akvatiske miljøer.

Lys er en kritisk faktor for fytoplanktonets opbygning af organisk stof via fotosyntesen samt bestemmende for visse heterotrofe organismers (cladoceer og rotatorier) adfærd og døgnrytme. Væksten af naturlige bakteriepopulationer synes deri-

mod i ringe grad at være påvirket af lys, idet in situ forsøg har vist, at optagelsen af mærket glukose er uafhængig af lys og mørke (Azam and Holm-Hansen 1973). Høje lysintensiteter i overfladevand kan imidlertid virke hæmmende for visse arter af fytoplankton og bakterier. Ultraviolet lys har især at være hæmmende, men også andre bølgelængder kan være skadelige. Fletcher (1979) nævner (i Lynch and Poole (1979)), at lys i det blå område kan hæmme nitrifikationen hos Nitrobacter. Undersøgelser af bakteriepopulationers døgnvariation i forskellige naturlige systemer har samstemmende vist, at biomasse og aktivitet er relativt konstant over døgnet (Riemann and Søndergaard, 1984).

Temperaturen er vækstregulerende for naturlige bakteriepopulationer i tempererede områder. Bakterienettoproduktionen, målt som indbygning af  $^3\text{H}$ -thymidin, stiger med temperaturen indtil ca.  $10^\circ\text{C}$ , mens produktionen ved højere temperaturer er konstant (Scavia and Laird, 1987). Tilsvarende fandt Hagström et al. (1979) at forholdet mellem delingsraten og temperatur hos naturlige marine bakteriepopulationer var eksponentielt stigende indtil ca.  $10^\circ\text{C}$ .

Salinitet og pH og er normalt ikke regulerende for naturlige bakteriepopulationer, idet disse faktorer oftest varierer indenfor et relativt snævert spektrum, hvortil bakterierne er tilpasset. Det er dog sandsynligt, at store salinitetsgradienter i fjordområder med ferskvandstilførsler påvirker bakteriernes aktivitet.

Biotiske faktorer. En lang række faktorer som uorganiske og organiske næringsstoffer, ilt, biologisk struktur samt mængden af bakterivorer er potentielle regulatorer af bakteriepopulationer. I denne sammenhæng fokuseres specielt på substratmængden og predation.

I litteraturen diskuteres det intensivt, hvorvidt naturlige bakteriepopulationer begrænses af fosfat eller af kulstof. En teori peger på, at bakterierne via deres effektive optagelsessystem regulerer tilførslen af fosfat til fytoplanktonet og at fytoplanktonet regulerer kulstofftilførslen til bakterierne (Currie and Kalff, 1984). En anden teori peger på, at bakterierne

på trods af deres effektive optagelse af fosfat (halvmætningskonstanten for fosfatoptagelse er en størrelsesorden lavere for bakterier end for fytoplankton (Vadstein and Olsen, 1989), kan være begrænsede af fosfat, fordi deres muligheder for lagring af fosfat er ringere end for fytoplanktonet (Morris, 1990). Denne sidste teori støttes af direkte målinger med tilsætning af fosfat til naturlige bakteriepopulationer. Udskillelse af organiske substrater fra fotosyntetiserende fytoplanktonpopulationer samt lysisprodukter fra døende populationer er en væsentlig substratkilde for bakterierne (Riemann and Søndergaard, 1986). Fytoplanktonet frigiver 5-35% af den indbyggede kulstofmængde, hvilket kan optages af den bakterielle biomasse i løbet af få timer. Andre substratkilder frigives som spildprodukter og ekskretion fra større organismer (zooplankton og fisk) samt gennem den mikrobielle nedbrydning af partikulære fraktioner (Jumars et al., 1989). Der er således størst bakteriel vækst i systemer med stor autotrof og heterotrof produktion (næringsrige systemer), og i perioder med stor aktivitet (forår og sommer).

Predation er formodentlig den væsentligste regulator af bakteriel biomasse. Bakterieceller konsumeres primært af protozoer. Heterotrofe nanoflagellater forekommer i højt antal ( $10^3$ - $10^4$  ml<sup>-1</sup>) i de fleste akvatiske systemer, og kan effektivt filtrere partikler omkring 1 µm i diameter. Ciliater er ligeledes almindeligt forekommende og en del arter er i stand til at ernære sig af bakterier, om end ciliater er mindre effektive filtratorer end flagellater. Gonzalez et al. (1990) fandt, at filtreringsraten hos marine flagellater var større på de største bakterieceller, og at flagellaterne ikke selekterede på baggrund af form og smag. Derimod viste det sig, at ciliaters filtreringsrate var mindre afhængig af bakteriecellernes størrelse, men at ciliaterne var selektive overfor gram-positive bakteriestammer. En række nyere marine planktonstudier har vist, at populationer af nanoflagellater og bakterier udviser koblede svingninger, hvilket indikerer, at bakteriernes vækst kan være reguleret af protozoer (Andersen and Sørensen, 1986; Bjørnsen et al., 1989; Riemann et al., 1990). Større heterotrofe organismer som crustacéer er generelt ringe filtratorer af bakterieplankton. Der er dog

undtagelser, idet cladocéer har et bredt filtreringsspektrum, der gør disse i stand til af tilbageholde selv små partikler. I ferskvandssystemer, hvor cladocéer ofte dominerer, har det vist sig, at disse i perioder af vækstsæsonen kan konsumere hele bakterieproduktionen (Riemann, 1985; Christoffersen et al., 1990).

Hvorvidt tilstedeværelsen af virus påvirker bakteriers vækst og overlevelse er uklart, idet der kun eksisterer ganske få kvantitative opgørelser af virus betydning for bakteriepopulationer. Disse peger imidlertid på, at virus findes i havvand i koncentrationer på  $10^7$  -  $10^8$  per ml samt at antallet kan ændres meget hurtigt, hvilket sandsynliggør at virus kan være betydende for naturlige bakteriepopulationers mortalitet (Bergh et al., 1989; Proctor and Fuhrman, 1990; Børsheim et al., 1990).

#### 4. Materialer og metoder.

##### 4.1 Modelorganisme

Ved denne undersøgelse er typestammen for Bacillus licheniformis DSM 13, blevet anvendt som modelorganisme. Valget blev truffet på baggrund af et udtalt ønske fra Miljøstyrelsen om at anvende en organisme af relevans for industriel produktion. DSM 13 er ikke selv en produktionsstamme, men anvendes, da en egentlig produktionsstamme af B. Licheniformis ikke kunne fremskaffes fra den relevante virksomhed. Bakterien blev indledningsvis dyrket i nutrient broth. Til brug ved inokulation af model-økosystemer blev DSM 13 dyrket til tidlig stationær fase i LB-medie ved 20°C under kraftig omrystning.

##### 4.2 Detektionsmetoder

Immunkemiske metoder. Specifik påvisning af B. licheniformis DSM 13 blev foretaget ved hjælp af immunkemiske detektionsmetoder. Disse metoder er baserede på et polyklonalt kaninantistof mod hele, varmedenaturerede celler fremstillet som

beskrevet i Nybroe (1990). Specificiteten af dette antistof er ligeledes beskrevet i Nybroe (1990). På grund af den stramme tidsplan for projektet, var det en forudsætning for projektets gennemførelse, at et brugbart antistof var til rådighed ved projektets start.

Påvisning af DSM 13 direkte i vand-, sediment- og biofilm-prøver foregik ved immunfluorescensmikroskopi som beskrevet i bilag I. Dyrkbare DSM 13 blev påvist ved en koloniblotmetode, se bilag II. Efter udpladning af en fortyndingsserie af prøvematerialet på Nutrient Agar, blev pladerne inkuberet ved 20°C i 3 dage. Efter optælling af kolonier (antallet af dyrkbare bakterier) blev der fremstillet replikaer af plader med mellem 20 og 200 kolonier. Disse replikater blev processet som immunoblot, se Nybroe (1990), med anvendelse af anti DSM 13 fortyndet 1:400. Herefter blev antallet af dyrkbare DSM 13 bestemt ved optælling af antallet af kolonier, der reagerede med antistoffet.

Acridin Orange Total Counts (AOTC). Direkte optælling af det totale antal bakterier foregik ved epifluorescensmikroskopi efter farvning af nukleinsyrer med akridin orange (Hobbie et al., 1977), se bilag III.

#### 4.3 Modeløkosystemer

I nærværende projekt indgår anvendelse af to typer modeløkosystemer. Disse omfatter 1) mikrokosmos på ca. 0,5 liter der etableres i laboratoriet, og 2) mesokosmos på 5-6000 liter der etableres på en åben marin station.

Mikrokosmos. Mikrokosmos modelsystemer blev etableret i 500 ml fladbundede glaskolber, der var vasket og autoklaveret før brug. Kolberne blev fyldt med 400 ml ufiltreret eller 0,2 µm filtreret havvand. Eksperiment 1 blev udført med vand udtaget fra Knebel Vig d. 18/9 1990. Dette vand havde følgende sammensætning: Salinitet 20 o/oo, NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub>-N 45 µg l<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>-N 20 µg l<sup>-1</sup> og PO<sub>4</sub>-P 8 µg l<sup>-1</sup>. Eksperiment 2 blev udført med vand fra Øresund ved Rungsted udtaget d. 30/10 1990. Vandet havde følgende sam-



mensætning: Salinitet 10 o/oo,  $\text{NO}_2+\text{NO}_3\text{-N}$   $45 \mu\text{g l}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N}$   $34 \mu\text{g l}^{-1}$  og  $\text{PO}_4\text{-P}$   $20\text{-}30 \mu\text{g l}^{-1}$  kolberne blev lukket med løstsiddende låg og anbragt ved  $20^\circ\text{C}$  i mørke med svag omrystning i 5 - 8 dage.

Mesokosmos. Disse omfattede store plastcylindre (1,5 m i diameter; 4-5 m lange) der fastnes til en pontonbro (Fig. 4.3.1). Selve broen er fastgjort med glidebeslag på lange jernrør, der rammes 3-4 m ned i bunden. Det anvendte plastmateriale er 0.14 mm klar PVC, der er svejset med løbegange til stabiliserende ringe. Tidligere testforsøg har vist, at dette materiale ikke har lethale eller sublethale effekter på zooplanktonpopulationer. To typer plastindhegninger blev anvendt i nærværende projekt: dels systemer der er lukkede mod bunden og dels systemer, der blev forankret i bunden med en metalkrave (Fig. 4.3.1). Sidstnævnte blev desuden monteret med et selvregulerende system til justering af plastindhegningernes højde i relation til tidevandsændringer. Plastindhegningerne fyldtes med vand, idet disse i sammenfoldet tilstand blev trukket ned på 3-4 m's dybde og herfra langsomt trukket mod overfladen og til slut fastgjort på pontonbroen. Kontravægte (ca.  $4 \times 10 \text{ kg}$ ) blev anbragt på plastindhegninger med bundkontakt. Selve montagen af plastindhegninger blev udført med assistance af professionelle dykkere. Vandet i plastindhegningerne blev holdet i cirkulation af mekaniske vindmøller, der skabte en jævn og konstant vandbevægelse ved både lave hurtige vindhastigheder. Der blev opsat ialt 4 indhegninger uden bundkontakt, hvoraf 2 blev tilsat DSM 13 og 2 fungerede som kontrol. Derudover blev 2 indhegninger med bundkontakt opsat, som hvoraf 1 blev tilsat DSM 13. Indhegningen uden DSM 13 blev imidlertid ødelagt efter 1. forsøgsdag.

Inokulering. Mikrokosmos: DSM13 blev tilsat til en slutkoncentration på  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ . Den tilsatte mængde celler blev udregnet ud fra måling af kulturens  $A_{600}$ , idet 1 ml kultur med  $A_{600} = 0,1$  indeholder ca.  $6 \times 10^7$  celler. DSM 13 blev tilsat enten som råkultur (uvaskede celler), eller som celler, der 2 gange var centrifugeret ved  $6000 \times g$  i 10 min og resuspenderet i isotont saltvand (vaskede celler). Mesokosmos: DSM 13 kulturer

(ca. 3-6 liter) blev tilsat indhegningerne under omrøring. Slutkoncentrationen af DSM 13 var ca.  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , som blev opnået ud fra aflæsning af  $A_{600}$  og under antagelse af at hver indhegning indeholdt 6200 l vand.

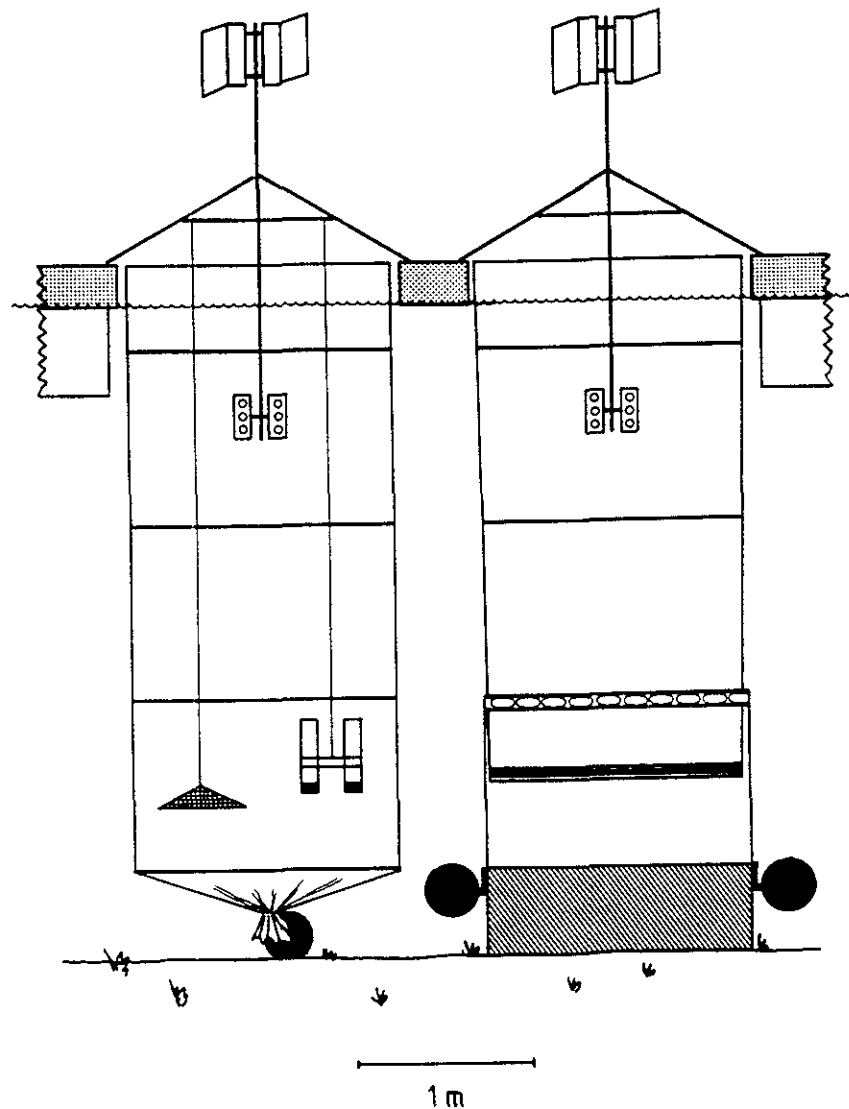


Fig. 4.3.1. Model af de to typer mesokosmos der blev anvendt i forsøget.

Prøvetagning. Mikrokosmos: Prøver på 5 ml til bestemmelse af det totale antal bakterier, det totale antal DSM 13, samt af antallet af dyrkbare bakterier blev udtaget med 1 - 2 dages

mellemlum. I ét forsøg blev antallet af heterotrofe flagellater ligeledes fulgt (se bilag VII). Mesokosmos: Det blev antaget, at opblandingen af hele vandsøjlen var total cirka 1 time efter tilsætningen af DSM 13, hvorefter en integreret vandprøve blev udtaget med en klar vandhenter til bestemmelse af total antal bakterier og antal DSM 13. Vandprøver blev ved hver prøvetagningsdag udtaget fra 3 dybder og mixet til én vandprøve, hvorfra delprøver blev udtaget til de enkelte analyser.

Prøver til bestemmelse af bakteriel begroning på biofilm blev indsamlet ved at afklippe ca. 1 cm<sup>2</sup> plast fra udhængte strimler. Disse blev opbevaret i partikelfrit vand tilsat 1% formalin.

Sedimentprøver blev udtaget ved hjælp af en specialkonstrueret prøvetager og opbevaret i glasvials tilsat 1% formalin. Prøver fra biofilm og sediment blev desuden forbehandlet med henholdsvis 8 min ultralydsbehandling og 3 min homogenisering (bilag IV og V) før videre analyser.

Vand- og sedimentprøver til bestemmelse af dyrkbare organismer blev transporteret til laboratoriet med bil/fly i nedkølet tilstand (4°C).

#### 4.4 Feltanalyser

Parametre, analysefrekvens og de anvendte metoder i forbindelse med feltanalyserne er opsummeret i Tab. 4.4.1. De enkelte analysemetoder er kort gennemgået i det følgende.

Uorganisk fosfat og ammoniak blev analyseret ifølge Murphy and Riley (1962) og Crosby (1967). Prøver til bestemmelse af ammoniak blev tilsat reagenser i felten.

Vandprøver til bestemmelse af klorofyl *a* blev filtreret på 25 mm Whatman GF/C filter, som blev ekstraheret i 96% ethanol i ca. 24 timer (Jespersen and Christoffersen 1987). Klorofylkoncentrationen blev målt med HPLC-udstyr.

Fytoplanktonets totale primærproduktion blev bestemt ved en modifikation af den traditionelle <sup>14</sup>C-metode. Vandprøver (50 ml) tilsat 4 µCi NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> blev inkuberet i felten fra sand middag til solnedgang. I laboratoriet blev 50 ml vandprøve overført til en glasvial og derefter tilsat 100 µl 0,5 N HCl. Prøverne blev

herefter hensat i stinkskab i 24 timer til afgangning af uorganisk  $^{14}\text{CO}_2$ . Prøverne blev til sidst tilsat scintillationsvæske og mængden af organisk bundet  $^{14}\text{C}$  (partikulært og opløst) blev målt i scintillationstæller.

**Table 4.4.1. Frekvens og analysemetoder for fysisk-kemiske og biologiske parametre i felteksperimentet.**

Parameter	Frekvens	Analysemetode
Ilt	Hver 3. dag	Sensor
Temperatur	Hver 3. dag	Sensor
Fosfat	Hver 3. dag	Spektrofotometrisk
Ammoniak	Hver 3. dag	Spektrofotometrisk
Klorofyl	Hver 3. dag	HPLC
Fytoplankton sammensætning	Hver 7. dag	Omvendt mikroskopi
Fytoplankton produktion	Hver 3. dag	$^{14}\text{C}$ -indbygning
Bakterie antal	Dagligt	Epifluorescens
Bakterieproduktion	Dagligt	$^3\text{H}$ -indbygning
Bakterier på biofilm	Hver 3. dag	Epifluorescens
Bakterier i sediment	Hver 3. dag	Epifluorescens
Flagellat antal	Dagligt	Epifluorescens
Ciliat antal	Hver 7. dag	Omvendt mikroskopi
Mesozooplankton antal	Hver 3. dag	Stereo mikroskopi

Fytoplanktonets artssammensætning blev bestemt på Lugol-fixerede prøver i omvendt mikroskop.

Antallet af den totale mængde af bakterier i vandfasen, på biofilm og i sedimentet blev opgjort med standardprocedure (bilag III) der omfatter farvning med acridin-orange (Hobbie et al. 1977). Specifik bestemmelse af antallet af DSM 13 i henholdsvis vandfase, på biofilm og i sediment fulgte metoderne beskrevet under laboratorieforsøg.

Bakteriernes nettoproduktion (bilag VI) blev bestemt ud fra inkorporering af  $^3\text{H}$ -thymidin (Fuhrman and Azam 1980) under anvendelse af empirisk bestemte omregningsfaktorer (Riemann and Bell, 1980). Heterotrofe nano-flagellater blev optalt i epifluorescensmikroskop på proflavinfarvede præparater (bilag VII, Haas 1982). Ciliater og mesozooplankton blev artsbestemt og optalt i omvendt mikroskop på Lugol-fixerede prøver.

5.1. Indledende laboratorieforsøg

Dyrkning og transport. De anvendte mesokosmos-systemer på ca. 6000 liter skulle inokuleres med DSM 13 i tæthed på  $1 \times 10^6$  celler  $\text{ml}^{-1}$ . Da det var ønskeligt, at inokulum udgjorde så lille et volumen som muligt, blev det af betydning at kunne dyrke organismen op til en høj celletæthed. Det blev tilstræbt, at inokulum ikke måtte udgøre mere end 1 o/oo af modelsystemets totalvolumen (ca. 6 l), hvoraf følger, at inokulationskulturen skulle indeholde ca  $1 \times 10^9$  celler  $\text{ml}^{-1}$ .

Ved opdyrkning af DSM 13 i et vækstmedie (Nutrient Broth) som bliver anbefalet af DSM var det ikke muligt at opnå celletætheder over ca.  $1 \times 10^8$  celler  $\text{ml}^{-1}$ . Desuden tenderede DSM 13 til at aggregere i dette vækstmedie, hvilket gjorde det svært at dosere en bestemt mængde celler. Ved at skifte til LB-medie var det muligt at opnå de ønskede celletætheder, ligesom tendensen til at klumpe var mindre udtalt. Uanset hvilket medie, der blev benyttet, var det erfaringen, at DSM 13 skulle dyrkes med kraftig omrystning - formodentlig for at sikre en tilstrækkelig iltning af mediet. Kulturer, der henstod uden omrystning ved stuetemperatur, lyserede efter få timer.

I forbindelse med inokulation af mesokosmos-systemet i Knebel Vig, blev 24 l kultur af DSM 13 indeholdende ca.  $1 \times 10^9$  celler  $\text{ml}^{-1}$  transporteret fra Hørsholm til Knebel. Transporten foregik med bil/færge og varede ca. 4 timer. På grund af organismens tendens til at lysere, blev der fremstillet AOTC præparater af kulturerne umiddelbart før udsætningen. Der blev ikke fundet visuelle tegn på cellelysis. Det var ikke muligt at bestemme cellernes dyrkbarhed umiddelbart før udsætning.

Specificitet af det anvendte antistof. Det anvendte antistof var fremstillet mod vegetative celler af DSM 13. Under de indledende forsøg viste det sig imidlertid, at antistoffet også reagerede med sporer af DSM 13.

Som omtalt i Nybroe (1990) krydsreagerede antistoffet med

andre isolater af B. licheniformis. Det blev søgt at fjerne disse krydsreaktioner ved absorbtion; men dette var ikke muligt uden samtidig at fjerne antistoffets reaktion med DSM 13. På trods af dette problem kunne antistoffet stadigvæk anvendes til specifik påvisning af DSM 13 under forudsætning af, at det ikke krydsreagerede med bakterier, der naturligt forekom i vand eller sediment fra Knebel Vig.

Analyser af vand- og sedimentprøver fra Knebel Vig ved immunfluorescensmikroskopi viste, at det var muligt specifikt at påvise DSM 13 omend mod en høj baggrund på grund af antistoffets krydsreaktion med den naturlige bakterieflora. Tilsvarende viste koloniblotmetoden, at der var en vis baggrund af krydsreagerende kolonier i materialet fra Knebel Vig, men at kolonier af DSM 13 ikke desto mindre kunne identificeres gennem deres kraftigere reaktion med antistoffet, og gennem deres karakteristiske kolonimorfologi (Fig. 5.1.1).

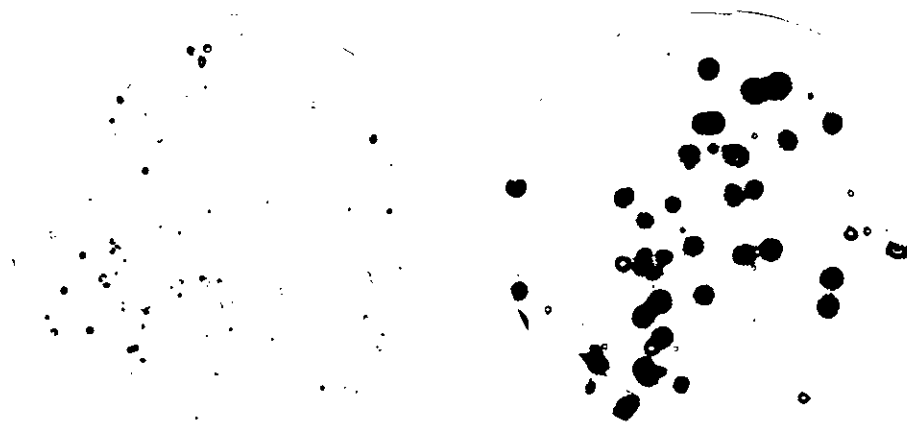


Fig. 5.1.1. Koloniblot af bakterier opdyrket fra Knebel vig (til venstre) og af en renkultur af DSM 13 (til højre). Anti DSM 13 antistoffet blev anvendt i fortyndingen 1:400.

I de følgende resultatafsnit omtales DSM 13 påvist ved immunfluorescensmikroskopi som total DSM 13 og DSM 13 påvist ved udpladning-koloniblotting som dyrkbare DSM 13. Antallet af bakterier påvist ved AOTC-metoden omtales som total antal/mængde bakterier.

Bakterieantal og -produktion.

Den totale mængde registrerede bakterier i vandfasen samt mængden af den tilsatte organisme er illustreret i Fig. 5.2.1.

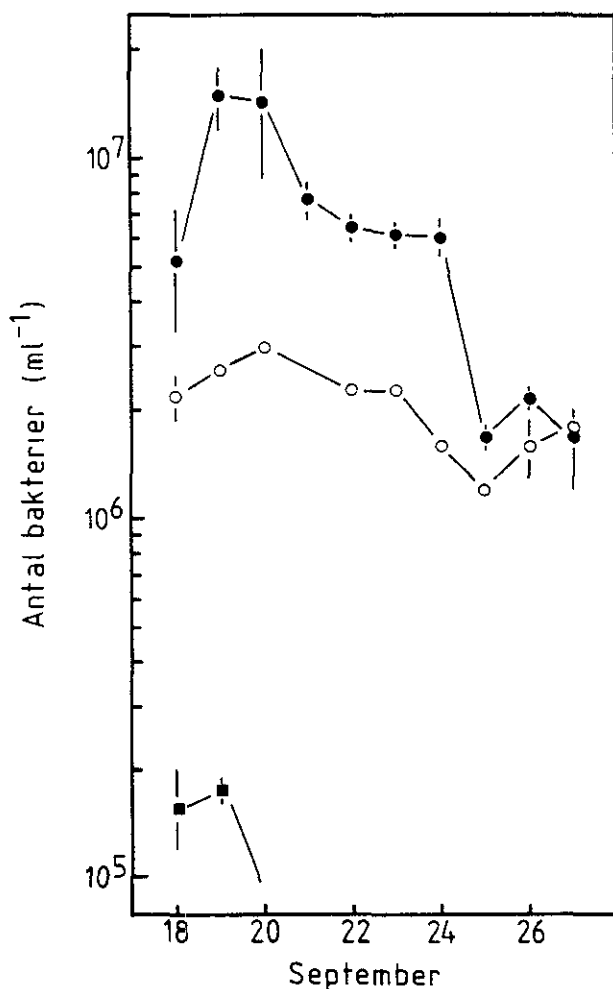


Fig. 5.2.1. Total antal bakterier i kontrolindhegninger (hvide cirkler) og i indhegninger tilsat DSM 13 (sorte cirkler) samt antallet af DSM 13 (sorte firkanter). Værdierne angiver gennemsnittet af to ens behandlede indhegninger og bjælker angiver de respektive minimum- og maksimumværdier.

Det totale antal bakterier er  $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  i indhegninger med DSM 13 ved forsøgets start, mod ca.  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  i kontrolindhegninger. Antallet stiger i begge typer systemer gennem de følgende 2 dage. Tilvæksten er en faktor 2,7 i indhegninger med DSM 13 og 1,4 i indhegninger uden DSM 13. Efter 3 dage begynder det totale antal af falde i begge typer indhegninger, dog kraftigst i indhegninger tilsat DSM 13, og er efter 8 dage ca.  $1 \times 10^6$  celler  $\text{ml}^{-1}$ . Tilstedeværelsen af DSM 13 kunne registreres ved immunofluorescensmikroskopi gennem forsøgets første 2 dage i et antal på  $1,6-1,8 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ . Optælling af DSM 13 med AOTC metoden på dag 0 viste, at der var tilsat ca.  $7 \times 10^5$  DSM 13  $\text{ml}^{-1}$  (se endvidere note i afsnit 5.3). Herefter var det ikke muligt at påvise organismen i målbare koncentrationer. Allerede dag 0 kunne der konstateres et betydeligt antal lyserede DSM 13. Disse "ghosts" blev ikke optalt som DSM 13. Det totale antal dyrkbare bakterier var  $2,5 \times 10^5 \text{ cfu ml}^{-1}$  umiddelbart efter udsætning af DSM 13 og faldt i løbet af forsøgsperioden til ca.  $4,2 \times 10^2 \text{ cfu ml}^{-1}$ . Antallet af dyrkbare celler blev ikke fulgt kontinuert i kontrolindhegningerne, men to bestemmelser i løbet af forsøgsperioden gav henholdsvis  $5,4$  og  $3,2 \times 10^2 \text{ cfu ml}^{-1}$ . Dyrkbare DSM 13 kunne kun påvises den første forsøgsdag i et antal på  $1,8 \times 10^4 \text{ cfu ml}^{-1}$ . På forsøgets sidste dag blev det, udover almindelig udpladning-koloniblotning, forsøgt at påvise DSM 13 efter sporeaktivering. Der kunne dog ikke på denne måde påvises levedygtige sporer af DSM 13 i nogen af prøverne.

Biofilmen indeholdt totalt  $10^5-10^6$  bakterier  $\text{cm}^{-2}$  i indhegninger tilsat DSM 13, men uden en registrerbar tilstedeværelse af den specifikke organisme (Tabel 5.2.1).

**Tabel 5.2.1. Total antal bakterier og antal af specifik organisme per  $\text{cm}^2$  biofilm i indhegninger tilsat DSM 13. Værdierne angiver gennemsnittet af to ens behandlede indhegninger. Den totale variation er angivet i parentes.**

	Forsøgets 2. dag	Forsøgets 5. dag
Total antal	$0,76 \times 10^6$ ( $0,12 \times 10^6$ )	$3,68 \times 10^5$ ( $1,38 \times 10^5$ )
DSM 13	0	0



Det totale antal bakterier på biofilmen faldt med ca. 50% fra dag 2 til dag 5. Det var nødvendigt at anvende ultralydsbehandling (se materialer og metoder) for at frigøre bakteriefilmen fra plastikstrimlen. Den anvendte metodik gav 132-323% (gennemsnit: 240%) flere bakterier end ved ubehandlede prøver (Tabel 5.2.2).

**Tabel 5.2.2. Total antal bakterier før og efter ultralydsbehandling af biofilm efter varierende eskponering (1-10 dage) i begge typer indhegninger.**

	Før sonificering	Efter sonificering	Forøgelse
Prøve 1	$3,13 \times 10^5$	$8,77 \times 10^5$	280 %
Prøve 2	$3,01 \times 10^5$	$6,70 \times 10^5$	223 %
Prøve 3	$2,51 \times 10^5$	$3,31 \times 10^5$	132 %
Prøve 4	$1.88 \times 10^5$	$6.08 \times 10^5$	323 %

Sedimentet indeholdt gennem hele perioden ca.  $4 \times 10^9$  bakterier  $g^{-1}$ . Antallet af dyrkbare bakterier var ca.  $5 \times 10^4$   $g^{-1}$ . Denne mængde var ens for indhegninger tilsat DSM 13 og kontrolindhegninger. Det var ikke muligt at spore en forekomst af DSM 13 i sedimentet hvor disse var udsat.

Den bakterielle nettoproduktionen i vandfasen (Fig. 5.2.2) i indhegninger tilsat DSM 13 var ca. 20 gange større end i kontrolindhegningerne umiddelbart efter udsætningen, men aftog i løbet af 4 dage til det samme niveau som i indhegninger uden DSM 13 ( $3 \times 10^7$  celler  $l^{-1}$   $time^{-1}$ ). I den resterende forsøgsperiode sås en faldende nettoproduktion i begge systemer.

Temperatur og ilt. Temperaturen var  $14,3^{\circ}C$  ved forsøgets start og  $11,2^{\circ}C$  ved forsøget afslutning. Der var ingen forskel i vandtemperaturen i indhegningerne og i det omgivende vand. Iltindholdet varierede i perioden fra 7,2 til 9,6 mg  $O_2$  i alle indhegninger (Fig 5.2.3).

Lys og salinitet. Lysindstrålingen blev målt over land og varierede i perioden mellem 23 og 90 MJ  $m^{-2}$   $dag^{-1}$ , hvilket er normalt for årstiden. Saliniteten var 20-30 o/oo.

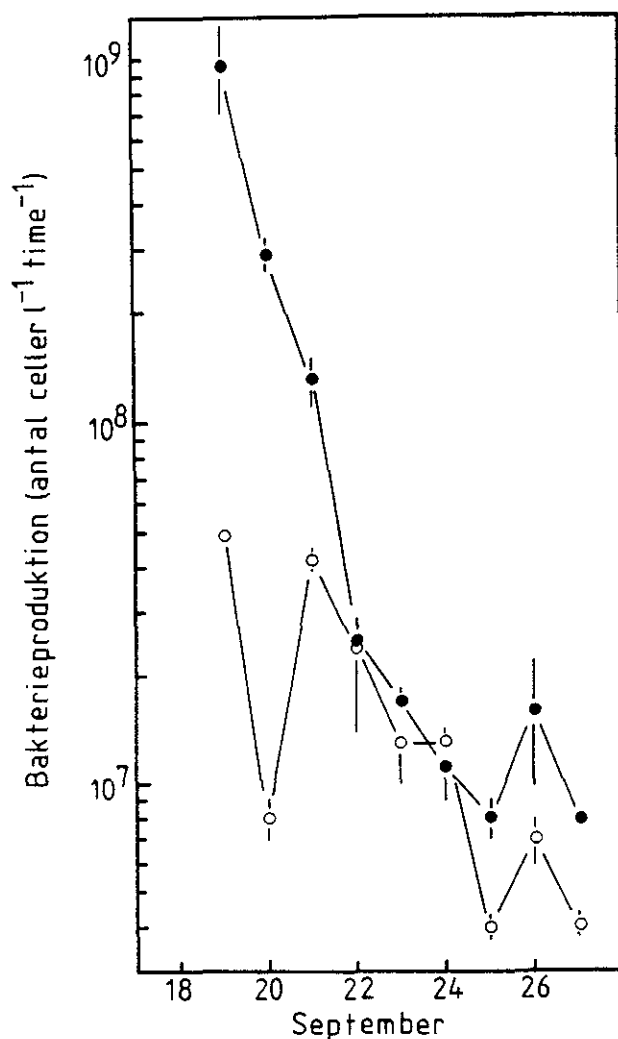


Fig. 5.2.2. Den totale bakterieproduktion i indhegninger tilsat DSM 13 (sorte cirkler) og i kontrolindhegninger (hvide cirkler). Værdierne angiver gennemsnittet af to ens behandlede indhegninger og bjælker angiver de respektive minimum- og maksimumværdier.

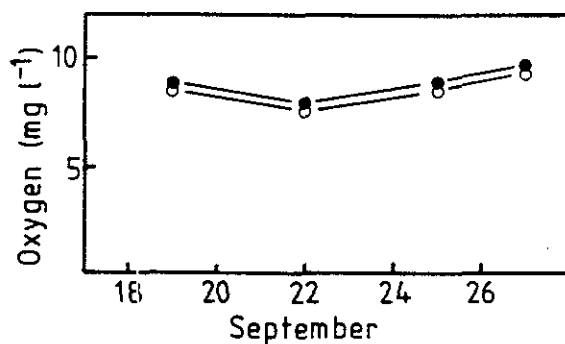


Fig. 5.2.3. Oxygenindhold i indhegninger tilsat DSM 13 (sorte cirkler) og i kontrolindhegninger (hvide cirkler). Værdierne angiver gennemsnittet af to ens behandlede indhegninger og bjælker angiver de respektive minimum- og maksimumværdier.

Næringsalte. I indhegninger med DSM 13 målttes til 6-8  $\mu\text{g PO}_4\text{-P l}^{-1}$  gennem hele perioden (Fig 5.2.4). Tilsvarende niveau findes ved forsøgets start i indhegninger uden DSM 13, men med en faldende tendens gennem forsøgsperioden. Ved forsøgets afslutning registreres  $< 2 \mu\text{g PO}_4\text{-P l}^{-1}$ . Ammonium fandtes i meget høje koncentrationer (ca. 300  $\mu\text{g NH}_4\text{-N l}^{-1}$ ) ved forsøgets start i indhegninger tilsat DSM 13, men aftog efter 2 dage til 10  $\mu\text{g NH}_4\text{-N l}^{-1}$  og efter 9 dage til under 1  $\mu\text{g NH}_4\text{-N l}^{-1}$  (Fig. 5.2.4). Ammoniumindholdet indhegninger uden DSM 13 var ved forsøgets start omkring 20  $\mu\text{g NH}_4\text{-N l}^{-1}$  og aftog ligedes til værdier under 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

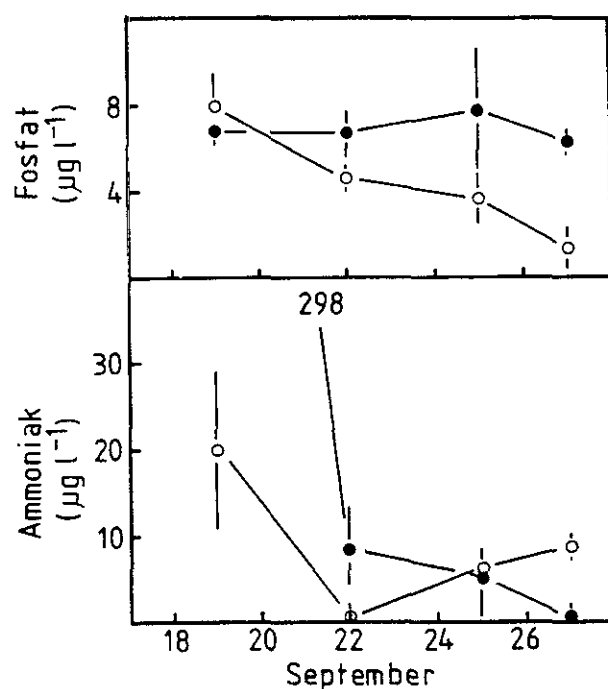


Fig. 5.2.4. Fosfat og ammoniak i indhegninger tilsat DSM 13 (sorte cirkler) og i kontrolindhegninger (hvide cirkler). Værdierne angiver gennemsnittet af to ens behandlede indhegninger og bjælker angiver de respektive minimum- og maksimumværdier.

Fytoplankton. Fytoplanktonets biomasse, bestemt som mængden af klorofyl *a*, var højere i indhegninger tilsat DSM 13 (2-5  $\mu\text{g klorofyl l}^{-1}$ ) end i de respektive kontrolindhegninger (1,5-2,5  $\mu\text{g klorofyl l}^{-1}$ ) (Fig. 5.2.5). Fytoplanktonets produktivitet, målt som den totale inkorporation af uorganisk  $^{14}\text{C}$ , var 8-41  $\text{mg C m}^{-2} \text{dag}^{-1}$  i indhegninger tilsat DSM 13 og 7-23  $\text{mg C m}^{-2} \text{dag}^{-1}$  uden DSM 13 (Fig. 5.2.5). Fytoplanktonet var sammensat af

en lang række arter i begge typer indhegninger med dominans af forskellige Chaetoceros-arter.

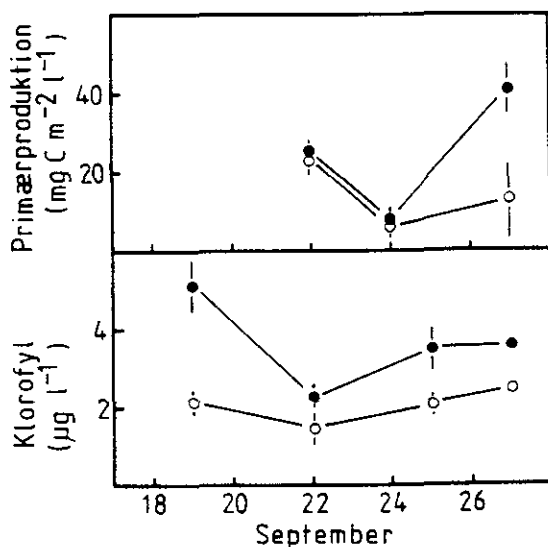


Fig. 5.2.5. Klorofyl og primærproduktion i indhegninger tilsat DSM 13 (sorte cirkler) og i kontrolindhegninger (hvide cirkler). Værdierne angiver gennemsnittet af to ens behandlede indhegninger og bjælker angiver de respektive minimum- og maksimumværdier.

Flagellater. Antallet af heterotrofe nanoflagellater varierer mellem  $1,8$  og  $3,3 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  med en stigende tendens 2-6 dage efter tilsætningen af DSM 13 (Fig. 5.2.6). Niveaueet i indhegninger uden DSM 13 var lavere ( $0,5$  til  $1,5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) men udviste ligeledes en stigende tendens gennem forsøgsperioden.

Ciliater. Antallet af ciliater er faldende gennem periode i begge systemer og udgjorde  $3,5$ - $3,0 \times 10^3 \text{ l}^{-1}$  i indhegninger med DSM 13 og  $3,0$ - $1,5 \times 10^3 \text{ l}^{-1}$  i kontrolindhegningerne (Fig. 5.2.6). Ciliatsamfundet er domineret af Strombidium og Mesodinium.

Mesozooplankton. Antallet af mesozooplanktonorganismer varierede fra 5 til 12 individer  $\text{l}^{-1}$ . Indhegninger tilsat DSM 13 udviste en stigende tendens i antallet gennem perioden (Fig. 5.2.16). Mesozooplanktonet bestod foruden copepoder (Oithona, Paracalanus og Acartia) af sneglelarver, muslingelarver, polychaetlarver, rurlarver samt tunicater.

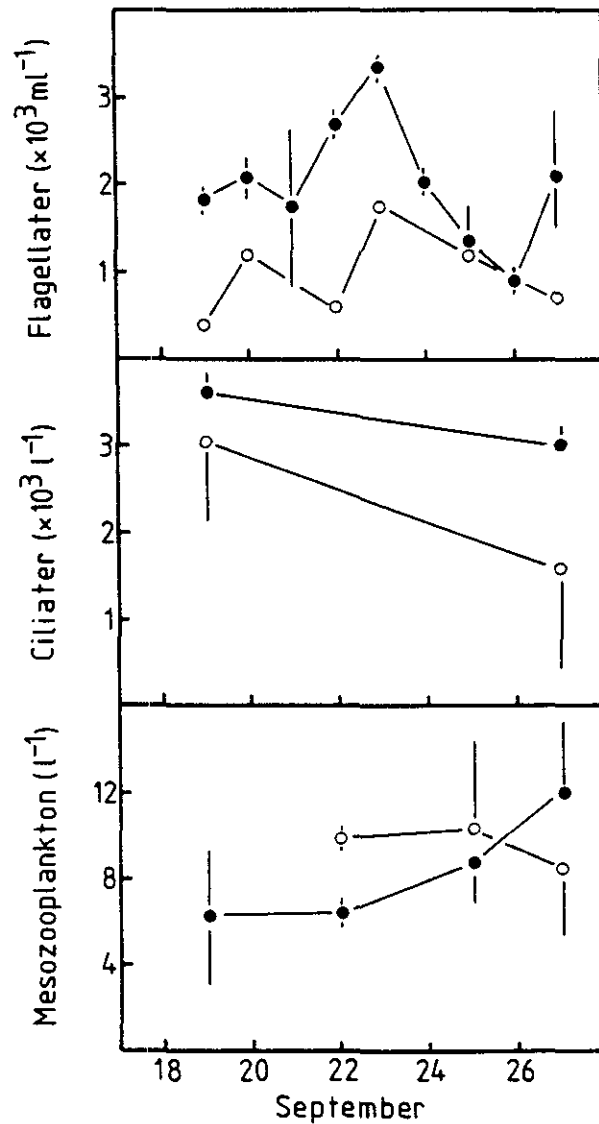


Fig. 5.2.6. Heterotrofe flagellater, ciliater og mesozooplankton i indhegninger tilsat DSM 13 (sorte cirkler) og i kontrolindhegninger (hvide cirkler). Værdierne angiver gennemsnittet af to ens behandlede indhegninger og bjælker angiver de respektive minimum- og maksimumværdier.

### 5.3. Laboratorieforsøg i mikrokosmos

For at kunne analysere effekter af enkelte fysisk-kemiske eller biologiske parametre, som kunne påvirke overlevelsen af DSM 13 blev der gennemført undersøgelser i mikrokosmos-modeløkosystemer i laboratoriet.

I et indledende eksperiment blev skæbnen af DSM 13 fulgt

over 5 dage i henholdsvis 0,2  $\mu\text{m}$ -filtreret og ufiltreret havvand fra Knebel Vig (se afsnit 4.3). I 0,2  $\mu\text{m}$  filtreret vand observeredes, efter en lag-fase på 1 dag, en stigning i det totale antal bakterier fra  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  til  $3 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  i løbet af forsøgsperioden (Fig. 5.3.1.A). Totalantallet af DSM 13 målt med immunfluorescens teknik steg fra  $3 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  dag 0 til  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  dag 1.

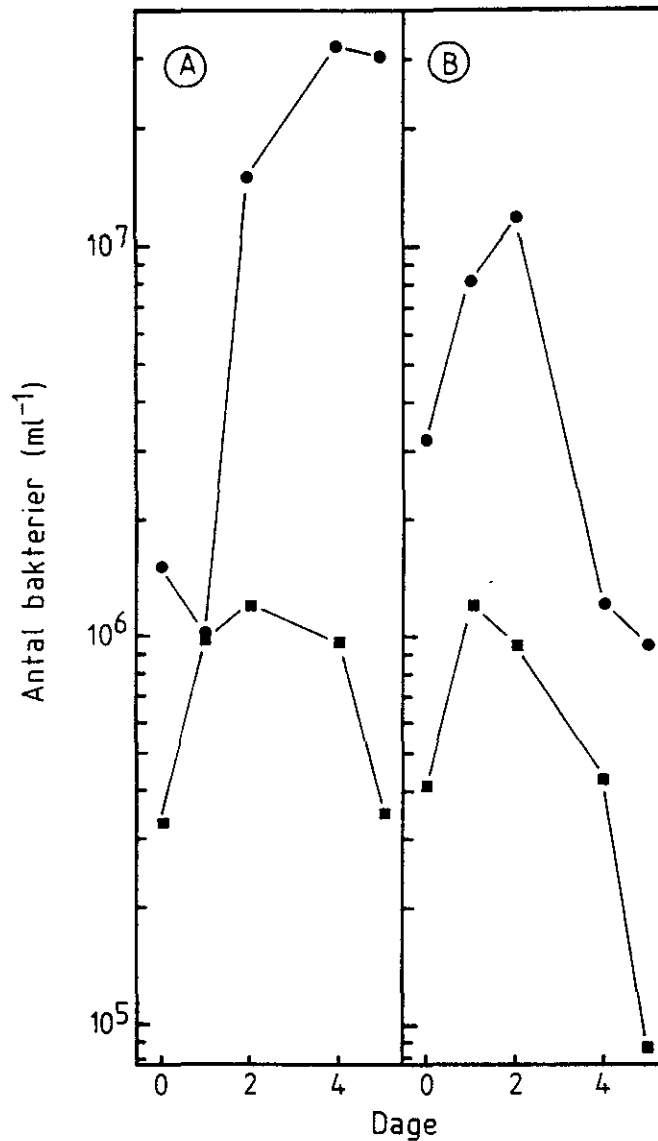


Fig. 5.3.1. Populationsændringer af bakterier i 0,2  $\mu\text{m}$  filtreret havvand (A) og i ufiltreret havvand (B) målt med direkte tælling. Sorte cirkler angiver den totale bakteriepopulation og sorte firkanter angiver DSM 13.

Det bør dog bemærkes, at en optælling af tilsatte DSM 13 celler med AOTC-metoden<sup>1</sup> dag 0 gav  $1 \times 10^6$  celler  $\text{ml}^{-1}$ , og at antallet dyrkbare DSM 13 var  $8 \times 10^5$  cfu  $\text{ml}^{-1}$ . Disse resultater antyder, at der virkelig var tilsat de forventede ca  $10^6$  celler  $\text{ml}^{-1}$ . Den tilsyneladende stigning af DSM 13 fra dag 0 til dag 1 kan derfor være et artefakt forårsaget af en ændring af bakteriens antigene struktur. Fra dag 1 til dag 5 faldt det totale antal DSM 13 fra  $1 \times 10^6$   $\text{ml}^{-1}$  til  $3 \times 10^5$   $\text{ml}^{-1}$ . Tilsvarende faldt antallet af dyrkbare DSM 13 til under detektionsgrænsen på 10 cfu  $\text{ml}^{-1}$  i løbet af forsøgsperioden (Tabel 5.3.1).

Tabel 5.3.1. Ændringer i total antal dyrkbare og antal dyrkbare DSM 13 efter 5 dages inkubation i havvand.

	0,2 $\mu\text{m}$ filtreret vand		Ufiltreret vand	
	start	slut	start	slut
Dyrkbare total	$1,2 \times 10^6$	<10	$1,1 \times 10^6$	<10
Dyrkbare DSM 13	$7,5 \times 10^5$	<10	$7,2 \times 10^5$	<10

I ufiltreret havvand steg antallet af totale bakterier de første 2 dage fra  $5 \times 10^6$   $\text{ml}^{-1}$  til  $2 \times 10^7$   $\text{ml}^{-1}$  hvorefter der skete et fald på ca 10 gange i resten af perioden (Fig. 5.3.1.B). For DSM 13 blev der igen iagttaget et meget lavt celletal dag 0, som omtalt ovenfor. Hvis der tages højde for denne usikkerhed, faldt antallet af DSM 13 fra  $1 \times 10^6$   $\text{ml}^{-1}$  til  $9 \times 10^4$   $\text{ml}^{-1}$  i løbet af forsøgsperioden (Fig. 5.3.1.B). Antallet faldt således hurtigere end i forsøget med 0,2  $\mu\text{m}$ -filtreret vand. Antallet af dyrkbare DSM 13 faldt til under detektionsgrænsen (Tabel 4.3.1).

I et andet og mere omfattende laboratorieforsøg blev skæbnen af DSM 13 fulgt gennem en periode på 8 dage i henholdsvis 0,2  $\mu\text{m}$  filtreret og ufiltreret vand udtaget fra Øresund. Laboratorieforsøget omfattede desuden en analyse af antallet af heterotrofe flagellater.

I felteksperimentet var det af praktiske grunde nødvendigt

<sup>1</sup> DSM 13 kan identificeres som værende væsentlig større end den naturlige bakteriepopulation.

at tilsætte DSM 13 direkte som en kultur i vækstmedie. Den næringstilsætning, som derved blev foretaget, kunne have betydning for organismens overlevelse. Denne effekt blev undersøgt i laboratorieeksperimentet ved at tilsætte henholdsvis rå kultur af DSM 13 (u-vaskede celler) og vaskede celler til mikrokosmossystemerne.

Populationsdynamikken i mikrokosmossystemer indeholdende  $0,2 \mu\text{m}$  filtreret havvand ses i Fig. 5.3.2.

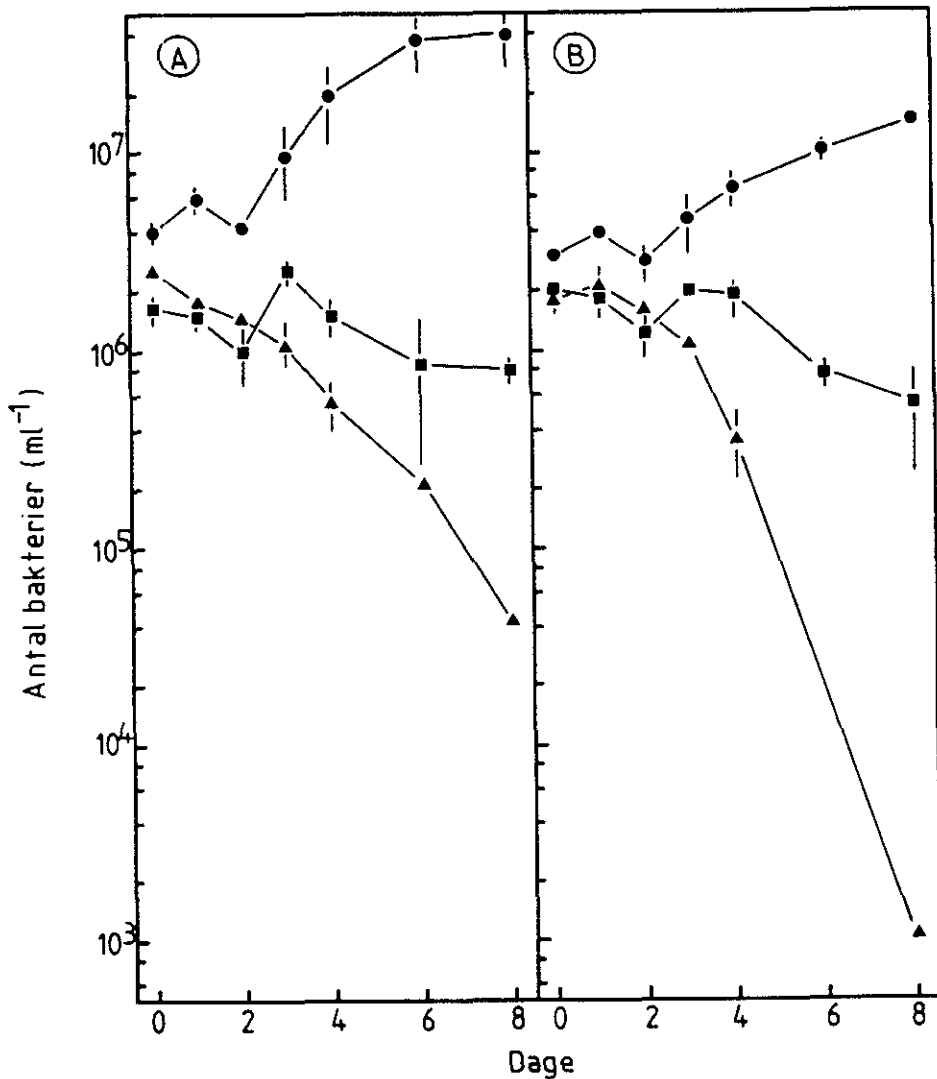


Fig. 5.3.2. Populationsændringer af bakterier i  $0,2 \mu\text{m}$  filtreret havvand tilsat uvaskede celler af DSM 13 (A) eller vaskede celler (B). Sorte cirkler angiver den totale bakteriepopulation, sorte firkanter angiver DSM 13 og sorte trekantede angiver DSM 13 målt ved udpladning-koloniblotning.



I systemer tilsat u-vaskede celler steg det totale bakterieantal langsomt fra  $4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  til  $4 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ . Antallet af totale DSM 13 var derimod ret konstant på  $1 - 2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , mens antallet af dyrkbare DSM 13 faldt ca. 2 dekader fra udgangspunktet på  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  (Fig. 5.3.2.A). En sekvens af koloniblots fra et modelsystem med  $0,2 \mu\text{m}$ -filtreret vand er vist i fig 5.3.3.A.

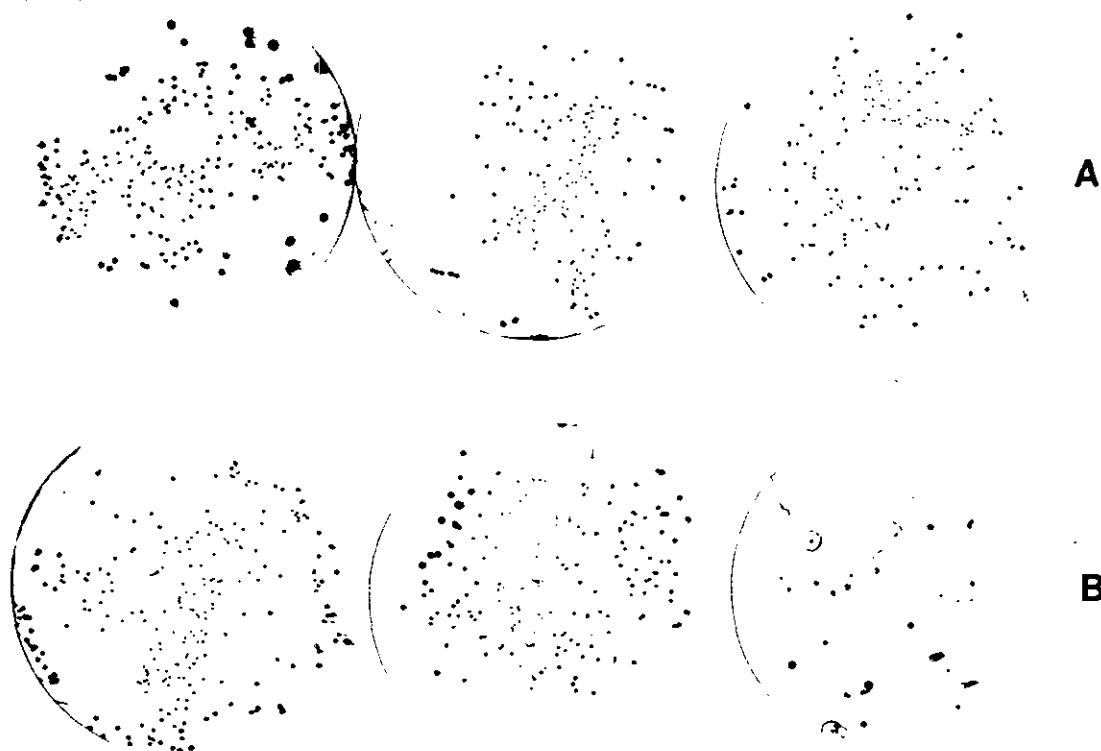


Fig. 5.3.3. Koloniblots af DSM 13 inkuberet i  $0,2 \mu\text{m}$  filtreret havvand (A) eller i ufiltreret havvand (B). De viste blots er fra dag 0, 1 og 2 (alle er taget fra udpladninger i fortyndingen  $10^{-3}$ ).

Systemerne med  $0,2 \mu\text{m}$ -filtreret vand tilsat vaskede celler udviste en mindre stigning af det totale bakterieantal fra  $3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  til  $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ . Det totale antal DSM 13 faldt svagt, og dyrkbare DSM 13 faldt ca 3 dekader, begge fra et udgangspunkt på  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  (Fig. 5.3.2.B). Kontroltællinger af flagellater dag 0 og dag 8 viste, at disse organismer ikke fandtes i systemerne med filtreret vand.

Resultaterne fra modelsystemer med u-filtreret havvand er vist i Fig. 5.3.4. Systemer med u-vaskede celler udviste en stigning af det totale antal bakterier fra  $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  til  $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$  i løbet af det første døgn. Fra dag 1 til dag 2 skete

der et tilsvarende fald, hvorefter antallet stabiliseredes (Fig. 5.3.4.A). Antallet af DSM 13 syntes at stige fra dag 0 til dag 1, men faldt derefter fra  $6 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  til  $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$  i løbet af de næste 7 dage. Parallelt hermed faldt antallet af dyrkbare DSM 13 fra  $2 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  til under detektionsgrænsen på 8 dage (Fig. 5.3.4.A).

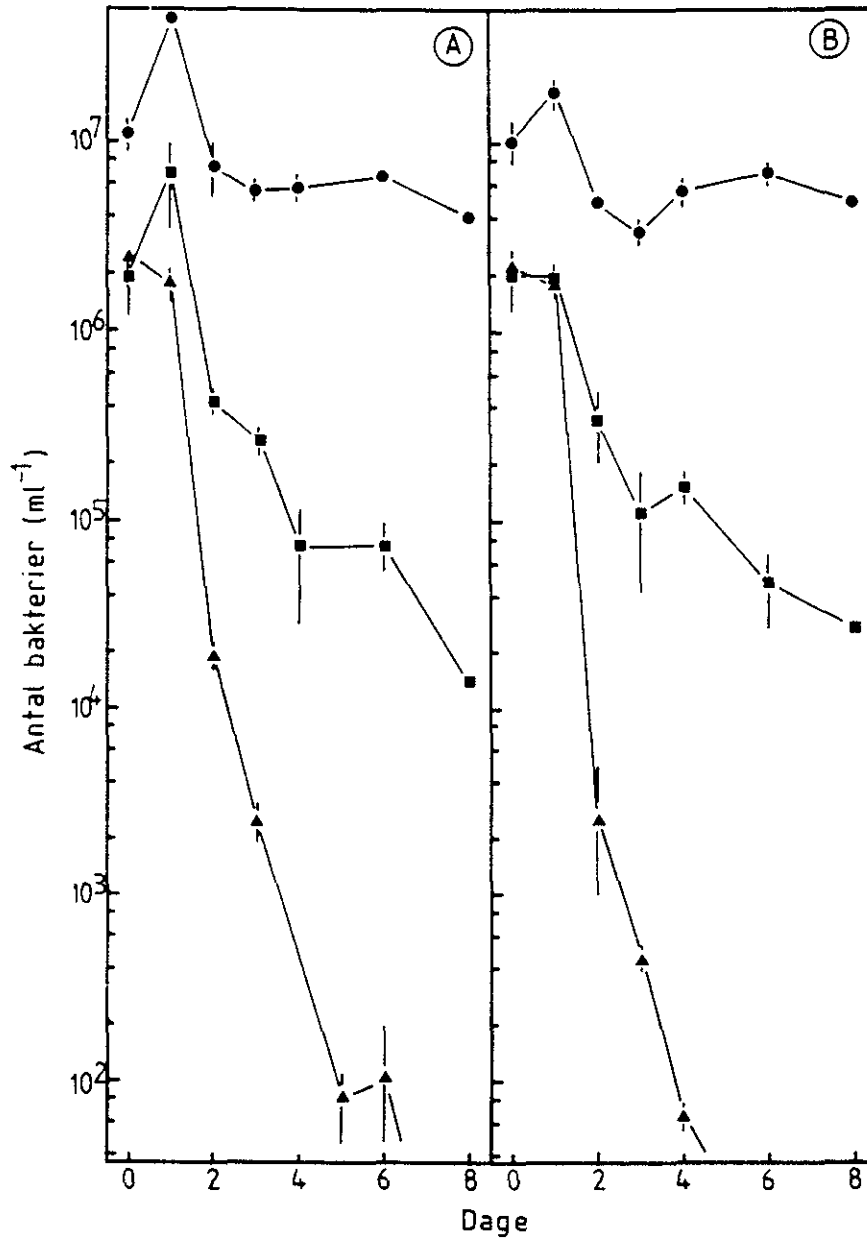


Fig. 5.3.4. Populationsændringer af bakterier i ufiltreret havvand tilsat uvaskede celler af DSM 13 (A) eller vaskede celler (B). Sorte cirkler angiver den totale bakteriepopulation, sorte firkanter angiver DSM 13 og sorte trekanter angiver DSM 13 målt ved udpladning-koloniblotting.

En sekvens af koloniblots fra et system med u-filtreret vand er vist i Fig. 5.3.3.B. I dette system steg antallet af heterotrofe flagellater fra  $4 \times 10^2 \text{ ml}^{-1}$  til  $2 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  i løbet af de første to dage, hvorefter antallet faldt ned mod udgangspunktet i den resterende periode (Fig. 5.3.5).

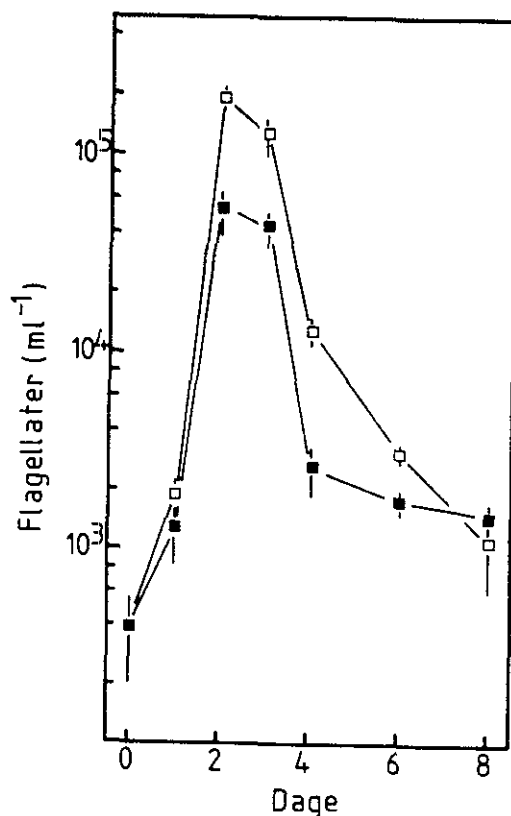


Fig. 5.3.5. Populationsændringer af heterotrofe flagellater i havvand tilsat vaskede (sorte firkanter) eller uvaskede (hvide firkanter) celler af DSM 13.

For modelsystemer tilsat vaskede celler blev der observeret tilsvarende tendenser som nævnt ovenfor for de u-vaskede celler (Fig. 5.3.4.B og 5.3.5). Dog var den initielle stigning i antallet af totale bakterier, og den følgende stigning af heterotrofe flagellater mindre. Henfaldskurven for totale DSM 13 var ens i de to systemer, og der kunne i begge tilfælde iagttages lyserede celler fra dag 3. Dyrkbarheden af DSM 13 aftog lidt hurtigere i systemer tilsat vaskede celler.

## 6. DISKUSSION

### 6.1 Testorganismens overlevelse.

Undersøgelsen af B. licheniformis DSM 13's overlevelse i havvand blev dels gennemført i et mesokosmos modeløkosystem etableret i Knebel Vig, dels i laboratoriebaserede mikrokosmos modeløkosystemer. I det indledende laboratorieforsøg blev mikrokosmos etableret med vand fra Knebel Vig, udtaget ved felteksperimentets start. Et efterfølgende, og mere omfattende laboratorieforsøg, blev gennemført med vand fra Øresund ved Rungsted.

I laboratorieeksperimentet med 0,2 µm-filtreret vand fra Knebel Vig falder det totale antal DSM 13 gennem forsøgsperioden, og dyrkbare DSM 13 forsvinder hurtigere end 4 dage. Henfaldsforløbet for såvel totale som dyrkbare DSM 13 antyder, at alene de fysisk-kemiske faktorer har været særdeles ugunstige for organismen. Det observerede fald i dyrkbarhed er større end det, der er fundet for E. coli ved inkubation i kunstigt havvand i laboratoriet under sammenlignelige forsøgsbetingelser (Xu et al., 1982; Evison, 1988; Byrd and Colwell, 1990). Tilsvarende rapporterer Livsdal et al. (1989) en  $T_{90}$  for E. coli på ca. 5 dage i UV-bestrålet, 0,2 µm-filtreret havvand. Det er ydermere påfaldende, at der i vore forsøg er konstateret et faldende celletal af DSM 13, mens de ovenfor citerede overlevelsesforsøg med E. coli observerer et uændret antal totale E. coli. Det faldende celletal understøttes af observationen af lyserede DSM 13, og antyder at der hurtigt forekommer egentlig celledød i systemet.

Da felteksperimentet kun kunne gennemføres ved at tilsætte DSM 13 som rå kultur inklusiv vækstmedium, blev der gennemført endnu et laboratorieeksperiment, hvor effekten af næringsmediet blev sammenholdt med effekten af tilsatte vaskede celler. Dette forsøg blev gennemført med vand fra Øresund, som havde lavere salinitet og højere næringsindhold end vandet fra Knebel Vig. DSM 13 overlevede bedre i dette end i det forrige eksperiment, både når der blev tilsat vaskede og uvaskede celler.  $T_{90}$  var ca. 4 -

5 døgn i 0,2 µm-filtreret vand, hvilket dog stadigvæk er udtryk for en dårlig overlevelse og af samme størrelsesorden som for E. coli i havvand (Xu et al., 1982; Evison, 1988; Fiksdal et al., 1989). Det er ikke muligt at bedømme, hvorvidt det er den lavere salinitet og/eller det højere næringsindhold, der betinger DSM 13s bedre overlevelse i vand fra Øresund.

Sammenlignes DSM 13's skæbne efter tilsætning som vaskede henholdsvis uvaskede celler kan det konkluderes, at næringstilsætningen alene påvirker DSM 13's overlevelse i 0,2 µm-filtreret vand. Effekten er dog marginal og mindre end det er set for E. coli i tilsvarende forsøg (Xu et al., 1982; Fiksdal et al., 1989).

Hvad angår den naturlige bakteriepopulation ses i alle forsøgene med 0,2 µm-filtreret vand en fremvækst ud fra celler < 0,2 µm i løbet af forsøgsperioden. Dette ses ofte i denne type laboratorieforsøg og tilskrives dels en pulje af opløste organiske stoffer i vandet og dels en frigivelse af næringsstoffer til vandet på grund af filtrering og anden manipulation (Ferguson et al., 1984). I nærværende forsøg spiller tilsætningen af DSM 13 henholdsvis med og uden næringsmedie naturligvis også en rolle. Som konsekvens af fremvæksten ud fra den naturlige bakteriepopulation kan det ikke udelukkes, at DSM 13's skæbne er påvirket af konkurrence fra denne bakteriepopulation. Det kan have givet en dårligere overlevelse, end man ville have observeret i et kunstigt medie.

I laboratorieforsøg med ufiltreret vand forsvinder dyrkbare DSM 13 i løbet af 4 - 6 dage. Totalantallet af DSM 13 falder til et niveau 10 - 100 gange lavere end i forsøgene med 0,2 µm-filtreret vand. Også i forsøgene med ufiltreret vand, overlever DSM 13 bedst i vand fra Øresund, ligesom medietilsætningen i sig selv kun marginalt påvirker henfaldskurverne.

Hvad angår totalpopulationen af bakterier, sker der et kraftigt fald i celletal efter den første dag. Denne fjernelse af bakterieceller kan formodentlig tilskrives predation. I "Øresund-eksperimentet" blev ændringerne i mængden af heterotrofe flagellater fulgt. Tilsætning af DSM 13 inducerede en stigning i antallet af flagellater, dog med en tidsforskydning

på 1 - 2 døgn i forhold til stigningen i bakterietal. Efter 2 dage er flagellatantallet  $10^4 - 10^5 \text{ ml}^{-1}$  og kan under antagelse af en clearance rate på  $5 \text{ nl individ}^{-1} \text{ time}^{-1}$  (Riemann et al., 1990) fjerne 5-25% af bakterierne i forsøget med vaskede celler og 20-100% af bakterierne i forsøget med uvaskede celler. Da DSM 13 ikke vokser i systemet, vil den kunne fjernes fra vandet i løbet af få dage, hvilket stemmer overens med de faktiske observationer. Væsentlig lavere værdier (1-10%) blev estimeret før og efter flagellat-maksimaet.

I felteksperimentet, som bedst sammenlignes med laboratorieforsøget med ufiltreret vand fra Knebel Vig, ses et endnu hurtigere fald i antallet af totale og dyrkbare DSM 13 end det blev set i laboratoriet<sup>2</sup>. En væsentlig forskel mellem laboratorieforsøgene og feltforsøget er lysforholdene, idet laboratorieforsøgene blev udført i mørke, mens feltforsøget blev udført i naturligt lys. I andre laboratorieundersøgelser nedsætter lys E.colis overlevelse (Fujioka et al., 1981; Evison, 1988; Barcina et al., 1989; Barcina et al., 1990). Feltforsøg med diffusionskamre ophængt i et eustuarie viser dog mindre forskel på E.colis overlevelse i lys og mørke (Lessard and Sieburth, 1983). Det er dog muligt at diffusionskammerets plastvæg ikke har tilladt tilstrækkeligt lys at trænge igennem. I nærværende forsøg med DSM 13 synes det rimeligt at antage, at lyspåvirkningen i felten har nedsat testorganismens overlevelse.

Ud over at analysere vandfasen i modeløkosystemet for DSM 13, blev der også foretaget analyser af sedimentet og af biofilm på plastoverfladerne i systemet, idet det er velkendt, at nogle bakterier kan ændre deres adhæsivitet som led i deres overlevelsesstrategi under sult (Kjelleberg et al., 1987). En tæt associering til en overflade kan beskytte mod predation, ligesom der kan findes højere koncentrationer af næringsstoffer i

---

<sup>2</sup> Hvad angår påvisning af dyrkbare DSM 13 skal det bemærkes, at udpladninger først fandt sted efter transport af prøven til Hørsholm. Selv om prøven blev opbevaret ved  $4^{\circ}\text{C}$  under transport, er DSM 13s reelle opholdstid længere end angivet i teksten, idet disse angivelser relaterer til prøvetagningstidspunktet. Ved fremtidige feltundersøgelser må det derfor anbefales, at der oprettes et mikrobiologisk laboratorium i felten.

grænselaget tæt ved en overflade - og i sediment (Enger et al., 1990; van Loosdrecht et al., 1990). Selv om der var en stor population af bakterier i sedimentet og i biofilmen kunne tilstedeværelse af DSM 13 ikke påvises. Detektionsgrænsen for påvisningsmetoderne var således, at DSM 13 ville være blevet påvist, hvis den havde udgjort ca 1 - 10% af den samlede bakteriepopulation.

Den samlede konklusion på undersøgelsen er, at DSM 13 har en dårlig overlevelse i det undersøgte miljø. Der bør dog knyttes visse forbehold til denne konklusion. DSM 13 har haft den uheldige egenskab, at de(t) antigen(er), som påvises med det anvendte antistof, ikke udtrykkes stabilt under alle vækstbetingelser (Nybroe, 1990). Antigenets varierende ekspression synes at være årsagen til, at den immunkemiske metode har undervurderet antallet af DSM 13 umiddelbart efter tilsætning i eksperimenterne med vand fra Knebel Vig. (Eksperimentet med vand fra Øresund viste en langt bedre overensstemmelse mellem AOTC metoden og den immunkemiske metode.) Det er derfor muligt, at antallet af totale DSM 13 kan være undervurderet, mens problemet ikke er relevant for påvisning af dyrkbare DSM 13.

Denne undersøgelse er foretaget med en sporedannende bakterie. Den anvendte antistofbaserede detektionsmetode genkender såvel vegetative celler som sporer i kulturer af DSM 13, men det har ikke været muligt at vurdere stabiliteten af spore-genkendelsen. Det kan derfor ikke udelukkes, at sporer har været til stede i havvandet, men ikke har kunnet påvises. Herimod taler dog det resultat, at sporer heller ikke har kunnet påvises ved dyrkningsteknikker.

## 6.2                    Økosystemeffekter.

I feltstudiet blev mesokosmos modeløkosystemer anvendt som testsystem ved udsætning af B. licheniformis til et kystnært, marint miljø. En række danske undersøgelser af interaktioner mellem naturlige planktonpopulationer i relation til nærings-saltpåvirkning og trofisk struktur har været baseret på mesokosmos-eksperimenter. Disse studier i både ferske (Riemann og

Søndergaard, 1984; Riemann 1985; Søndergaard et al., 1987; Christoffersen et al. 1990) og marine områder (Riemann et al., 1988; Bjørnsen et al., 1989; Riemann et al., 1990) har bidraget til et detaljeret videngrundlag for anvendelse af modeløkosystemer. Fælles for alle eksperimenterne er, at de integrerede resultater har kunnet anvendes i beskrivelser af stofomsætningen i de frie vandmasser, samt kunnet bidrage med vurderinger af væsentlige regulerende faktorer. I nogle af de nævnte eksperimenter har sedimentet været inddraget, idet oxygenbalance og næringsstoffregenerering er relateret til processer i overgangen mellem vand og sediment.

Tilsætningen af DSM 13 til de anvendte mesokosmos modeløkosystemer medførte en forøget biomasse og produktion af den samlede bakteriepopulation. Indenfor det første døgn var biomasseforøgelsen en faktor 39 i modeløkosystemer tilsat DSM 13 og en faktor 2 i systemer uden tilsætning af DSM 13. Bakteriernes nettoproduktion blev ikke målt umiddelbart efter tilsætningen af DSM 13, men ét døgn efter blev der konstateret en 20 gange høje produktion i modeløkosystemer tilsat DSM 13. Disse forhold blev tilskrevet en næringsberigelse, der hidrørte fra udsætningen af DSM 13-kulturen. Det organiske kulstofindhold i startkulturens næringsmediet udgjorde  $6,4 \text{ g l}^{-1}$ , hvoraf en del (ca. 30%) antages at være respireret under vækstforløbet, mens det resterende tilføres i modeløkosystemerne i partikulær og opløst form. Herved formodes den eksisterende kulstofmængde ( $1-2 \text{ mg l}^{-1}$ ) at være fordoblet. Naturlige bakteriepopulationers produktion kan være næringsstoffbegrænset (jvnf. afsnit 3.5) og de er hurtigt i stand til at respondere på et ændret substratgrundlag. Tilsætningen af DSM 13 medførte desuden en kraftig forøget ammoniumkoncentration men ingen ændring i fosfatkoncentrationen. Lysering af DSM 13 populationen i løbet af de første dage efter udsætningen (se afsnit 6.1) har medført et højere næringsgrundlag og dermed en højere biomasse og produktion af den naturlige bakteriepopulation i modeløkosystemer tilsat DSM 13. Den øgede bakterielle omsætning medførte ingen reduktion i iltmængden. Ved forsøgets afslutning var der ingen nævneværdig forskel i bakteriebiomasse og -produktion i de to typer systemer, hvilket tilskrives, at den



tilførte næringsmængde er respireret og dels transformeret til energi for andre led i fødenettet.

Biomasse og produktion af de autotrofe komponenter (fytoplankton) tenderede ligeledes til et højere niveau i modeløkosystemer med DSM 13. Det er sandsynligt, at både fosfat og kvælstof er begrænsende for fytoplanktonets vækst i kontrolsystemerne gennem forsøgsperioden, og at tilførslen af næringsstoffer med DSM 13 mediet delvist ophæver denne begrænsning.

Ovennævnte ændringer skaber et forøget fødegrundlag for flagellater, ciliater og mesozooplankton i systemer med DSM 13. Således konstateres en kraftigere stigning i antallet af heterotrofe flagellater i modeløkosystemer med tilsætning af DSM 13 sammenlignet med kontrolsystemer. Antallet af heterotrofe flagellater stiger således fra  $1,8 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  til  $3,4 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  fra dag 1 til dag 5 i systemer med DSM 13 modeløkosystemerne mod et fluktuerende antal omkring  $1,4 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  i systemer uden DSM 13. Tilsvarende forskelle, om end mindre markante, observeres i antallet af ciliater. Mængden af ciliater i modeløkosystemer tilsat DSM 13 er højere og aftog mindre end i de respektive kontrolsystemer uden DSM 13. Endelig ses en tendens til stigning i antallet af mesozooplankton mod slutning af forsøgsperioden. Disses langsommere respons skyldes en længere generationstid for mesozooplanktonpopulationen (uger) end for flagellater og ciliater (<1 dag).

Stigningen i antallet af heterotrofe flagellater medfører et potentielt større predationstryk i modeløkosystemer med DSM 13. Under antagelse af, at alle heterotrofe flagellater og 50% af ciliaterne (vurderet ud fra kvantitative opgørelser af de enkelte arter) er bakteriovorere med filtrationsrater på henholdsvis  $0,005 \mu\text{l ind}^{-1} \text{ time}^{-1}$  (Riemann et al. 1990) og  $200 \mu\text{l ind}^{-1} \text{ time}^{-1}$  (Gonzalez et al. 1990) blev predationstrykket (som gennemsnit for hele perioden) på den samlede bakteriepopulation beregnet (Tabel 6.2.1). Det fremgår heraf, at predationstrykket, som gennemsnit for perioden var væsentligt højere i systemer tilført DSM 13 og sandsynliggjorde, at dette var en medvirkende årsag til det kraftige fald i bakteriepopulationen. De antagede individuelle filtrationsrater er estimeret i feltstudier i en

dansk fjord (Riemann et al., 1990) og understøttes af litteraturen. Både produktion og biomasse er væsentlig højere i systemerne, hvor DSM 13 er tilsat. I både kontrolsystemerne og i systemerne tilsat DSM 13 er bakterieproduktionens størrelse reguleret af substratpuljens størrelse og sammensætning, hvorimod bakteriebiomasserne er kontrolleret af predation.

Tabel 6.2.1. Beregning af filtrationspotentialiet ( $\text{ml l}^{-1} \text{time}^{-1}$ ) og predationstrykket (% af bakteriebiomasse døgn $^{-1}$ ) af heterotrofe flagellater og ciliater i modeløkosystemer tilsat DSM 13 og systemer uden DSM 13.

	Filtrationsrate		Predation
	Flagellater	Ciliater	Samlet
Tilsat DSM 13	10,0	0,66	26
Uden DSM 13	4,9	0,46	13

### 6.3                    Moniteringsstrategi

Anvendelse af genetisk modificerede mikroorganismer falder i to grupper: 1) organismer beregnet til at udføre specifikke opgaver efter en udsætning til miljøet og 2) organismer bestemt for indesluttet bioteknologisk produktion.

For så vidt angår den indesluttede anvendelse, påhviler det blandt andet den godkendende myndighed at foretage en samlet risikovurdering af organismens virkning på miljøet. Desuden skal den kontrollerende myndighed tilse, at sikkerhedsprocedurer ved affaldshåndtering og ved et eventuelt udslip af organismen er tilstrækkelige (EF-Direktiv 219, 1990).

Ved planlagte udsætninger af en genetisk modificeret mikroorganisme skal den godkendende myndighed blandt andet vurdere risici ved udsætningen og om nødvendigt udføre prøver eller foretage tilsyn, som måtte være nødvendige til kontrolformål (EF-Direktiv 220, 1990). I direktivet lægges der vægt på,

at der bør foretages en vurdering af risikoen for miljøet før hver udsætning, og at det er nødvendigt at opstille harmoniserede procedurer og kriterier for vurdering af de mulige risici.

Implementeringen af de to ovennævnte direktiver nødvendiggør, som allerede beskrevet i Lov af 4. juni 1986 om miljø- og genteknik, at den godkendende myndighed råder over et beredskab, der omfatter mulighed for at:

- \* føre tilsyn med at udledninger af genetisk modificerede organismer er i overensstemmelse med vilkår i givne miljøgodkendelser
- \* følge skæbnen af en genetisk modificeret organisme som følge en udledning og/eller efter en faktisk udsætning.

Heraf følger, at den tilsynsførende myndighed har rådighed over følsomme metoder til specifikt at påvise den relevante genetisk modificerede organisme. Disse metoder kan være rettet mod det aktuelle rekombinante gen, eller mod værtsorganismen. Da gener kan spredes i miljøet uafhængigt af værtsorganismen, vil det være hensigtsmæssigt at anvende såvel detektionsmetoder rettet mod det rekombinante gen som mod værtsorganismen. Grundet den nedsættelse af værtsorganismens dyrkbarhed, som ofte iagttages efter udledning/udsætning til miljøet, er det vigtigt at supplere dyrkningsbetingede påvisningsmetoder med metoder, der kan påvise testgenet eller testorganismen direkte i miljøet, se iøvrigt afsnit 3.2.

Anvendelse af akvatiske modeløkosystemer, hvor testorganismens skæbne kan studeres under kontrollerede og eventuelt indesluttede forhold, er et vigtigt redskab for risikovurderinger. De egenskaber ved testorganismen, som bør belyses ved forsøg i modelsystemer, er vækst og overlevelse, evne til at spredes og til at overføre genetisk materiale til andre organismer og endelig følsomhed for struktur og funktion af det økosystem, hvortil organismen udsættes/udledes (Tiedje et al., 1989; EF-Direktiv 220, 1990; OECD, 1990).

Vurderingen af risici ved udsætning af genetisk modificerede mikroorganismer til miljøet skal ske trinvist. Fra trin til trin skal indeslutningsgraden begrænses og udsætningens omfang øges,

under forudsætning af at resultaterne fra det tidligere trin siger god herfor (EF-Direktiv 220, 1990). I praksis betyder dette, at de tidlige faser af en risikovurdering udføres som laboratorieeksperimenter, mens senere faser udføres som felt-eksperimenter (Tiedje et al., 1989; OECD, 1990).

I relation til risikovurdering af genetisk modificerede mikroorganismer er både mikrokosmos modeløkosystemer og mesokosmos modeløkosystemer relevante. Mikrokosmossystemer kan anvendes til indledende vurderinger af testorganismens respons på fysisk-kemiske parametre og dens egenskaber som bytte for predatorer. Systemerne er lette at holde indesluttede, men resultaterne lader sig dog dårligt overføre til naturlige forhold. På senere trin er feltbaserede mesokosmossystemer, hvori testorganismen ligeledes kan indesluttet, velegnede. Disse systemer er fleksible derved, at de kan etableres i alle typer akvatiske miljøer, men kan samtidig repræsentere et harmoniseret testkoncept. Systemer med en relativt lille vandvolumen (100 til 1.000 liter) kan benyttes til korttidsundersøgelser (7 til 14 dage) af testorganismers skæbne efter udsætning. Større systemer (1.000 - 6.000 liter) kan anvendes til vurderinger af testorganismens skæbne og af de økologiske effekter af såvel udsætning som af udledning over en længere tidshorisont (2 til 5 uger). Dette er en vigtig egenskab, idet den måde, hvorpå en testorganisme tilføres miljøet, forventes at påvirke dens muligheder for at etablere sig i naturen (OECD, 1990). En organismes fitness i et givet miljø kan øges ved adaptation, og dette fænomen forventes at være mest betydningsfuldt i miljøer med lange generationstider som i havet, se Tiedje et al. (1989). Undersøgelser i mesokosmos modeløkosystemer giver endvidere mulighed for at undersøge organismens spredningskapacitet, for eksempel ved adhæsion til krebsdyr og fisk etc.

Mesokosmossystemer er mere naturlignende end mikrokosmossystemer, idet systemets størrelse nedsætter den relative betydning af en eventuel "væg-effekt" ligesom systemets placering i naturlige omgivelser sikrer, at de væsentligste fysisk-kemiske og biologiske faktorer ikke ændres radikalt af forsøgsopstillingen. Der kan dog ikke på kort sigt opnås fuld sikkerhed for at en or-

ganisme, der er fundet ufarlig ved en sekvens af udsætningsforsøg, ikke repræsenterer en risiko for miljøet. Monitoringsstrategien må derfor søge at etablere et test-koncept, der er dækkende hvad angår antallet af undersøgte miljøer, og antallet af eksperimenter per miljø. Vurderinger heraf, samt af hvor længe de enkelte overlevelseseksperimenter skal gennemføres, kan kun foretages ved at sammenholde erfaringer med de aktuelle organismer, doseringsmåden og erfaringer med feltbaserede modeløkosystemer.

Det arbejde, der skal udføres for at forbedre det videnskabelige grundlag for at gennemføre risikovurderinger af genetisk modificerede mikroorganismer, involverer et tværfagligt samarbejde mellem mikrobiologer, molekylær biologer og mikrobielle økologer. På denne baggrund kan nærværende rapport udmunde i følgende anbefalinger:

- \* Udviklingen af mere følsomme detektionsmetoder til påvisning af såvel genotyper som fænotyper direkte i miljøet foreslås fortsat.
- \* Undersøgelser af bakteriers vækst og metabolisme under miljølignende forhold foreslås udbygget, for at øge forståelsen af de overlevelsesstrategier, som bakterier benytter sig af i naturlige miljøer.
- \* Undersøgelser af faktorer, der påvirker genoverførsel mellem bakterier i naturlige miljøer, foreslås styrket.
- \* Feltstudier der omfatter anvendelse af modeløkosystemer, koblet med anvendelse af detektionsmetoder og fysiologiske undersøgelser foreslås videreført med henblik på at etablere et optimalt test-koncept.
- \* En status af danske og udenlandske erfaringer med feltbaserede modeløkosystemer foreslås, med henblik på at afklare fordele og ulemper ved at anvende modeløkosystemer som et led i en monitoringsstrategi.

På det overordnede plan anses det for yderst relevant, at fremtidige målrettede projekter i Miljøstyrelsens regi med hensyn til risikovurdering af genetisk modificerede organismer udnytter metodefællesskab og fælles testorganismer med de grundvidenskabelige risikovurderingsprojekter der gennemføres i Danmark, samt at der med hensyn til feltbaserede testning udvikles et standardiseret test-koncept.

- Amy P.S. and H.D. Hiatt (1989)  
Survival and detection of bacteria in an aquatic environment.  
Appl. Environ. Microbiol. 55, 788-793.
- Albertson N.H., G.W. Jones and S. Kjelleberg (1987)  
The detection of starvation-specific antigens in two marine bacteria.  
J. Gen. Microbiol. 133, 2225-2231.
- Andersen, P. og H.M. Sørensen (1986)  
Population dynamics and trophic coupling in pelagic microorganism in eutrophic coastal waters.  
Mar. Ecol. Prog. Ser. 33, 99-109.
- Arredondo R. and C.A. Jerez (1989)  
Specific DOT-immunobinding assay for detection and enumeration of Thiobacillus ferrooxidans.  
Appl. Environ. Microbiol. 55, 2025-2029.
- Atlas R.M. and R. Bartha (1987)  
Microbial ecology: fundamentals and applications.  
Benjamin/Cummings Publishing Compagny, Menlo Park.
- Atlas R.M., A.K. Bej, R.J. Steffan and M.H. Perlin (1989)  
Approaches for monitoring and containing genetically engeneered microorganisms released into the environment.  
Hazardous Waste & Hazardous Materials 6, 135-144.
- Awong J., G. Bitton, and G.R. Chaudhry (1990)  
Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments.  
Appl. Environ. Microbiol. 56, 977-983.
- Azam F., and O. Holm-Hansen (1973)  
Use of tritiated sobstrates in the study of heterotrophy in seawater.  
Mar. Biol. 23, 191-196.
- Barcina I., J.M. González, J. Iriberry, and L. Egea (1989)  
Effect of visible light on progressive dormancy of Escherichia coli cells during the survival process in natural fresh water.  
Appl. Environ. Microbiol. 55, 246-251.
- Barcina I., J.M. González, J. Iriberry, and L. Egea (1990)  
Survival strategy of Escherichia coli and Enterococcus faecalis in illuminated fresh and marine systems.  
J. Appl. Bacteriol. 68, 189-198.

- Bej A.K., R.J. Steffan, J. DiCesare, L. Haff and R.M. Atlas (1990)  
 Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes.  
 Appl. Environ. Microbiol. 56, 307-314.
- Bergh Ø., K.Y. Børsheim, G. Bratbak and M. Heldal (1989)  
 High abundance of viruses found in aquatic environments.  
 Nature 340, 476-478.
- Bjørnsen, P.K., B. Riemann, J. Pock-Steen, T.G. Nielsen and S.J. Horsted (1989)  
 Regulation of bacterioplankton production and cell volume in a eutrophic estuary.  
 Appl. Environ. Microbiol. 55, 1512-1518.
- Bjørnsen, P.K., B. Riemann, S.J. Horsted, T.G. Nielsen and J. Pock-Steen (1988)  
 Trophic interactions between heterotrophic nanoflagellates and bacterioplankton in manipulated seawater enclosures.  
 Limnol. Oceanogr. 33, 409-420.
- Brayton P.R. and R.R. Colwell (1987)  
 Fluorescent antibody staining method for enumeration of viable environmental Vibrio cholerae O1.  
 J. Microbiol. Methods 6, 309-314.
- Byrd J.J. and R.R. Colwell (1990)  
 Maintenance of plasmids pBR322 and pUC8 in nonculturable Escherichia coli in the marine environment.  
 Appl. Environ. Microbiol. 56, 2104-2107.
- Børsheim, K.Y., G. Bratbak and M. Heldal (1990)  
 Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy.  
 Appl. Environ. Microbiol. 56, 352-356.
- Chao W.L. and R.L. Feng (1990)  
 Survival of genetically engineered Escherichia coli in natural soil and river water.  
 J. Appl. Bacteriol. 63, 319-325.
- Chaudhry G.R., G.A. Toranzos, and A.R. Bhatti (1989)  
 Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment.  
 Appl. Environ. Microbiol. 55, 1301-1304.
- Christoffersen, K., B. Riemann, L.R. Hansen, A. Klusner, H.B. Sørensen (1990)  
 Qualitative importance of the microbial loop and plankton community structure in a eutrophic lake during a bloom of cyanobacteria.  
 Microb. Ecol. 20: 253-272



- Crosby, N.T. (1967)  
The determination of nitrite in water using Cleves's acid.  
1-naphtylamin-7-sulphonic acid.  
Proc. Soc. Wat. Treat. Exam. 16, 51.
- Currie D.J. and J. Kalff (1984)  
A comparison of the abilities of freshwater algae and  
bacteria to acquire and retain phosphorus.  
Limnol. Oceanogr. 29, 298-310.
- EF-Direktiv 219 (1990)  
Rådets direktiv om indesluttet anvendelse af genetisk  
modificerede mikroorganismer.
- EF-Direktiv 220 (1990)  
Rådets direktiv om udsætning i miljøet af genetisk  
modificerede organismer.
- Enger Ø., K.A. Hoff, G.H. Schei and I. Dundas (1990)  
Starvation survival of the fish pathogenic bacteria Vibrio  
anguillarum and Vibrio salmonicida in marine environments.  
FEMS Microbiology Ecology 74, 215-220.
- Evison L.M. (1989)  
Comparative studies on the survival of indicator organisms  
and pathogens in fresh and sea water.  
Wat. Sci. Tech. 20, 309-315.
- Ferguson R.L., E.N. Buckley and A.Y. Palumbo (1984)  
Response of marine bacterioplankton to differential  
filtration and confinement.  
Appl. Environ. Microbiol. 47, 49-55.
- Fiksdal L., M. Pommepuy, A. Derrien, and M. Cormier (1989)  
Production of 4-methylumbelliferyl heptanoate hydrolase by  
Escherichia coli exposed to seawater.  
Appl. Environ. Microbiol. 55, 2424-2427.
- Fletcher, M. (1979)  
The aquatic environment. I: J.M. Lynch and N.J. Poole  
(Eds.) Microbial Ecology. A conceptual approach. Blackwell  
Scientific Publication.
- Flint K.P. (1987)  
The long-term survival of Escherichia coli in river water.  
J. Appl. Bacteriol., 63, 261-270.
- Fuhrman, J.A. and F. Azam (1980)  
Bacterioplankton secondary production estimates for coastal  
water of British Columbia, Antarctica, and California.  
Appl. Environ. Microbiol. 39, 1085-1095.
- Fuhrman J.A., D.E. Comeau, Å. Hagström and A.M. Chan (1988)  
Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA  
suitable for molecular biological studies.  
Appl. Environ. Microbiol. 54, 1426-1429.

- Fujioka R.S., H.H. Hashimoto, E.B. Siwak, and R. H. F. Young (1981)  
Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater.  
Appl. Environ. Microbiol. 41, 690-696.
- Gonzalez, J.M., E.B. Sherr and B.F. Sherr (1990)  
Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates.  
App. Environ. Microbiol. 56, 583-589.
- Grimes D.J., R.W. Atwell, P.R. Brayton, L.M. Palmer, D.M. Rollins, D.B. Roszak, F.L. Singleton, M.L. Tamplin, and R.R. Colwell (1986)  
The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments.  
Microbiol. Sci. 3, 324-329.
- Haas, L. W. (1982)  
Improved epifluorescence microscopy for observing planktonic microorganisms. *Annls Inst. océanogr.* 58, 261-266.
- Hagström, A., U. Larsson, P. Horstedt and S. Normark (1979)  
Frequency of dividing cells, a new approach to determination of bacterial growth rates in aquatic environments.  
Appl. Environ. Microbiol. 37, 805-812.
- Hobbie, J.E., E.J. Daley and S. Jasper (1977)  
Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy.  
Appl. Environ. Microbiol. 33, 1225-1228.
- Iriberry J., M. Unanue, B. Ayo, I. Barcina and L. Egea (1990)  
Attached and free-living dividing bacteria in two aquatic systems.  
Lett. Appl. Microbiol. 11, 87-89.
- Jain R.K., R.S. Burlage and G.S. Sailer (1988)  
Methods for detecting recombinant DNA in the environment.  
CRC Critical Reviews in Biotechnology 8, 33-84.
- Jespersen, A-M. and K. Christoffersen, K. (1987)  
Measurements of chlorophyll-a from phytoplankton using ethanol as extraction solvent.  
Arch. Hydrobiol. 109, 445-454.
- Jumars, P.A., D.L. Penry, J.A. Baross, M.J. Perry and B.W Frost (1989)  
Closing the microbial loop: dissolved carbon pathway to heterotrophic bacteria from incomplete ingestion, digestion and absorption in animals.  
Deep Sea Res. 4, 483-495.

- Kemp H.A., D.B. Archer and M.R.A. Morgan (1988)  
 Enzyme-linked immunosorbent assays for the specific and sensitive quantification of Methanosarcina mazei and Methanobacterium bryantii.  
 Appl. Environ. Microbiol. 54, 1003-1008.
- Kjelleberg S., M. Hermansson and P. Mårdén (1987)  
 The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment.  
 Ann. Rev. Microbiol. 41, 25-49
- Knight I.T., S. Scults, C.W. Kaspar and R.R. Colwell (1990)  
 Direct detection of Salmonella spp. in estuaries by using a DNA probe.  
 Appl. Environ. Microbiol. 56, 1059-1066.
- Lessard E.J. and J.M. Sieburth (1983)  
 Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environments.  
 Appl. Environ. Microbiol., 45, 950-959.
- Martinez J., J. Garcia-Lara, and J. Vives-Rego (1989)  
 Estimation of Escherichia coli mortality in seawater by the decrease in <sup>3</sup>H-label and electron transport system activity.  
 Microb. Ecol., 17, 219-225.
- Menon A.S. and J. de Mestral (1985)  
 Survival of Bacillus thurengensis var. kurstaki in waters.  
 Water, Air and Soil Pollution 25, 265-274.
- Morgan J.A.W., C. Winstanley, R.W. Pickup, J. G. Jones and J.R. Saunders (1989)  
 Direct phenotypic and genotypic detection of a recombinant pseudomonad population released into lake water.  
 Appl. Environ. Microbiol. 55, 2537-2544.
- Morita R. (1988)  
 Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature.  
 Can. J. Microbiol. 34, 436-441.
- Morris D.P. (1990) Regulation of bacterioplankton production in Lake Dillon, Colorado.  
 Ph.D. Thesis, pp. 209. University of Colorado, USA.
- Murphy, I. and T.P. Riley (1962)  
 A modified method for the determination of phosphate in natural waters.  
 Analytica chim. Acta 27, 21-26.
- Nybroe O., A. Johansen and M. Laake (1990).  
 Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Pseudomonas fluorescens in sediment samples.  
 Letters in Applied Microbiology 11, 293-296.

- Nybroe O. (1990)  
 Immunkemisk detektion af mikroorganismer i miljøprøver.  
 Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen Nr. 25.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD  
 (1990)  
 Good development practices for small scale field research  
 with genetically modified plants and microorganisms - A  
 discussion document.
- Ohana B., J. Margalit and Z. Barak (1987)  
 Fate of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis under  
 simulated field conditions.  
 Appl. Environ. Microbiol. 53, 828-832.
- Olsen P.E. and Rice W.A. (1989)  
Rhizobium strain identification and quantification in  
 commercial inoculants by immunoblot analysis.  
 Appl. Environ. Microbiol. 55, 520-522.
- Postgate J.R. (1976)  
 Death in macrobes and microbes.  
 I " The survival of vegetative microbes", T.R.G. Gray and  
 J.R. Postgate (eds.), pp. 1-19, Cambridge University Press,  
 Cambridge.
- Proctor, L.M. and Fuhrman. J. A. (1990)  
 Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria.  
 Nature 343, 60-62.
- Riemann, B. (1985)  
 Potential importance of fish predation and zooplankton  
 grazing on natural populations of freshwater bacteria.  
 Appl. Environ. Microbiol. 50: 187-193
- Riemann, B. and R.T. Bell (1990)  
 Advances in estimating bacterial biomass and growth in  
 aquatic systems.  
 Arch. Hydrobiol. 118: 385-302
- Riemann, B., T.G. Nielsen, S.J. Horsted, P.K. Bjørnsen and J.  
 Pock-Steen (1988)  
 Regulation of phytoplankton biomass in eustarine enclosur-  
 es.  
 Mar. Ecol. Prog. Ser. 48: 205-215
- Riemann, B. and M. Søndergaard (1984)  
 Measurements of diel rates of bacterial secondary produc-  
 tion in aquatic environments.  
 Appl. Environ. Microbiol. 47: 632-638
- Riemann, B. and M. Søndergaard (1986)  
 Bacteria, pp. 127-198, I: B. Riemann og M. Søndergaard  
 (Eds.) Carbon dynamics in eutrophic, temperate lakes.  
 Elsevier.

- Riemann, B., H.M. Sørensen, P.K. Bjørnsen, S.J. Horsted, L.M. Jensen, T.G. Nielsen, and M. Søndergaard (1990)  
Carbon budgets of the microbial food web in estuarine enclosures.  
Mar. Ecol. Prog. Ser. 65, 159-170.
- Roszak D.B. and R.R. Colwell (1987)  
Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev. 51, 365-379.
- Sailer G.S., M.S. Shields, E.T. Tedford, A. Breen, S.W. Hooper, K.M. Sirotkin and J.W. Davis (1985)  
Application of DNA-DNA colony hybridization to the detection of catabolic genotypes in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1295-1303.
- Scavia, D. and G.A. Laird (1987)  
Bacterioplankton in Lake Michigan: Dynamics, controls, and significance to carbon flux.  
Limnol. Oceanogr. 32, 1017-1033.
- Somerville C.C., I.T. Knight, W.L. Straube and R.R. Colwell (1989)  
Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments.  
Appl. Environ. Microbiol. 55, 548-554.
- Stanier R.Y., J.L. Ingraham, M.J. Wheelis and P.R. Painter (1986)  
General microbiology.  
MacMillan Education, London.
- Steffan R.J., A. Breen, R.M. Atlas and G.S. Sayler (1989)  
Application of gene probe methods for monitoring specific microbial populations in freshwater ecosystems.  
Can. J. Microbiol. 35, 681-685.
- Søndergaard, M., B. Riemann, L.M. Jensen, N.O.G. Jørgensen, P.K. Bjørnsen, M. Olesen, J.B. Larsen, O. Geertz-Hansen, J. Hansen, K. Christoffersen, A-M. Jespersen, F. Andersen and S. Bosselman (1987)  
Pelagic food web processes in an oligotrophic lake.  
Hydrobiologia 164, 271-286.
- Tiedje, J.M., R.K. Colwell, Y.L. Grossman, R.E. Hodson, R.E. Lenski, R.N. Mack and P.L. Regal (1989)  
The planned introduction of genetically engineered organism: Ecological considerations and recommendations.  
Ecology 70, 298-315.
- Trevors J.T. and J.D. van Elsas (1989)  
A review of selected methods in environmental microbial genetics.  
Can. J. Microbiol. 35, 895-902.

- Trevors J.T., J.D. van Elsas, M.E. Starodub and L.S. van Overbeek (1989)  
 Survival and plasmid stability in Pseudomonas and Klebsiella spp. introduced into agricultural drainage water.  
 Can. J. Microbiol. 35, 675-680.
- Vadstein O. and Y. Olsen (1989)  
 Chemical composition and phosphate uptake kinetics of limnetic bacterial communities cultured in chemostats under phosphorus limitation.  
 Limnol. Oceanogr. 34, 939-946
- van Loosdrecht M.C.M., J Lyklema, W. Norde and A.J.B. Zehnder (1990)  
 Influence of interfaces on microbial activity.  
 Microbiol. Rev. 54, 75-87.
- van Overbeek L.S., J.D. van Elsas, J.T. Trevors and M.E. Starodub (1990)  
 Long-term survival of and plasmid stability in Pseudomonas and Klebsiella species and appearance of nonculturable cells in agricultural drainage water.  
 Microb. Ecol. 19, 239-249.
- Vickers R.M., J.E. Strout and V.L. Yu (1990)  
 Failure of a diagnostic monoclonal immunofluorescent reagent to detect Legionella pneumophila in environmental samples.  
 Appl. Environ. Microbiol. 56, 2912-2914.
- Xu H.-S., N. Roberts, R.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes, and R.R. Colwell (1982)  
 Survival and viability of nonculturable Escherichia coli and Vibrio cholerae in the estuarine and marine environment  
 Microb. Ecol., 8, 313-323.

Bilag I**DSM 13 Immunfluorescens mikroskopi**

1. Filtrerer prøven gennem et 0,2 µm filter. Brug Nucleoporefilter SN 110656 med Whatman GF/C som underfilter.
2. Vask med 3 x 5 ml immunovaskebuffer. OBS! Alle buffere skal være sterilfiltreret.
3. Tilsæt 400 µl imminoblokeringsbuffer. Inkuber ved 20 min.
4. Vask filtreret med 3 x 5 ml immunobuffer.
5. Tilsæt 400 µl primært antistof fortyndet i immunofortyndingsbuffer. Følgende fortynding anvendes 1:400. Inkuber i minimum 1 time ved stuetemperatur.
6. Vask med 3 x 5 ml immunovaskebuffer.
7. Tilsæt 400 µm sekundært antistof: FITC-konjugeret svine anti-kanin immunoglobulin i fortyndingen 1:20 i PBS. Inkuber 1 time i mørke.
8. Vask med 3 x 5 ml immunovaskebuffer.
9. Ved mikroskopering bruges "Immisions oil" fra OLYMPUS OPTICAL CO. Brug følgende filter: gult-fluorescens barriere-filter 0515. Benyt exciter filtersæt B-G samt ekstra exciter-filter EY 455.

## Bilag II

### **DSM 13 Koloniblotting**

Filter: Milipore eller Schleicher & Schuell  $\varnothing$  82 mm, 0,45  $\mu$ m membranfilter.

1. Filteret placeres op pladen ved hjælp af hansker/pincet. Der må ikke være luftbobler under filteret.
2. Henstår et par min. Filteret følger nu den sædvanlige procedure for dot-blot.



### Bilag III

#### **Acridin Orange Total Counts (AOTC)**

1. 0,5 ml prøve tilsættes 4 dråber 0,2  $\mu$ m filtreret acridinorange (1:1000) og rystes.
2. Efter 2 min henstand filtreres prøven på et sort Unipore-filter 0,2  $\mu$ m med et GF/C filter som underlag. Underfilteret vådes med 0,2  $\mu$ m filtreret dest. vand, inden det sorte filter lægges på. Vakuum etableres (max. 20 cm Hg), og hvis filteret ligger glat uden luftbobler, kan prøven filtreres.
3. Der skylles med 0,2  $\mu$ m filtreret dest. vand, både i glasset og på filteret.
4. Filteret tørres på vandsugende papir i et par min og lægges herefter på et objektglas med immersionsolie under og over filteret. Et dækglas lægges over præparatet. Præparatet mærkes og anbringes i en præparatmappe (mørkt).

## Bilag IV

### **Ultralydsbehandling af biofilm**

1. Biofilmstrimmel opbevares i 20 ml 0.2  $\mu\text{m}$  filtreret dest. vand i glasvials med formalin (slutkonc. 1%)
2. Prøven ultralydsbehandles (Branson model 250/450) i 8 min\* ved indstilling af duty circle på 10 og output control på 1.
3. Prøver udtages til bestemmelse af immunfluorescens og ATOC eftr disses standardmetoder.
4. Biofilmstrimmel opmåles med skydelære og arealet udregnes.

\*Testforsøg med 0, 2, 4, 6, 8 og 10 min ultralydsbehandling viste, at antallet af bakterier er konstant efter 2 min's behandling, og at cellerne ikke disintegrerer efter 10 min's behandling.

## Bilag V

### **Sedimentekstraktion**

Buffere: Homogeniseringsopløsning

Isoton fosfatbuffer pH 7,4      25 mM Na-fosfat

125 mM NaCl

0,1% Tween 20

Buffere skal være sterilfiltreret og glasvarer m.m autoklaveres ved 121°C i 15 min.

1. 10 g sediment udtages sterilt og overføres til homogeniseringsbæger. Der tilsættes 90 ml homogeniseringsopløsning.
2. Prøven homogeniseres i 3 min på is ved "gul hastighed" på MSE Homogenisator.
3. Homogenisatet hensættes til sedimentering i nøjagtig 3 min.
4. Herefter udtages prøver til bestemmelse af total antal bakterier (AOTC) og bestemmelse af kimental på PC-agar eller GYC-agar.
5. Homogenisatet ultralydsbehandles i 3 min på is.
6. De udtagne prøver mikses omhyggeligt før yderligere fortyndinger.

## Bilag IV

### **Bakterienettoproduktion**

1. 5 ml vandprøve pipetteres til glasvials.
2. Blindprøver tilsættes 200  $\mu$ l formalin eller glutataldehyd.
3. Alle prøver tilsættes  $^3\text{H}$ -thymidin og inkuberes i 30 min ved in situ temperatur. Inkubationen stoppes ved at tilsætte 200  $\mu$ l formlin eller glutaraldehyd.
4. Herefter filtreres prøverne på et Sartorius cellulosenitrat filter 0,45  $\mu$ m; 25 mm. Filtrene skal ligge i dest. vand inden brug.
5. Filtreringsrør og glasvial skylles 10 gange med 5% TCA.
6. Filtrene placeres vha. pincet i plastvials og tilsættes 10 ml Ultima Gold.
8. Prøverne rystes 15-20 min og henstår herefter 18 inden tælling i scintillationstæller. De 2 sidste timer skal prøverne stå i tælleren.

Filtreringsrør og TCA skal være kolde (0-5°C)

## Bilag VII

### **Flagellattælling**

1. 2,5 ml vandprøve tilsættes 5 dråber 0,2 µm filtreret proflavin (0,03%).
2. Efter 2 min tilsættes 100 µl glutaraldehyd.
3. Efter 2 min filtreres prøven på et sort Uniporefilter 0,2 µm med et GF/C filter som underfilter. Underfilteret vådes med 0,2 µm filtreret dest. vand, hvorefter det sorte filter placeres ovenpå. Vakuum etableres. Når filteret ligger glat og uden luftbobler filtreres prøven.
4. Filteringsrør og glas skylles med 0,2 µm dest. vand.
5. Filteret fjernes inden det suges helt tørt og lægges på et objektglas med paraffinolie under og over filteret. Et dækglas lægges over og præparatet opbevares i en mappe i køleskab.