

Kildeopsporing ved fænotypisk karakterisering af enterokokker

Claus Jørgensen og Hanne Kaas
DHI - Institut for Vand og Miljø

Miljøstyrelsen vil, når lejligheden 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.

Indhold

FORORD	5
SAMMENFATNING OG KONKLUSIONER	7
SUMMARY AND CONCLUSIONS	11
1 INDLEDNING	15
1.1 BAGGRUND	15
1.2 FORMÅL	15
1.3 VANDET SØ	15
2 METODEBESKRIVELSE	17
3 PRØVETAGNING	19
4 RESULTATER OG DISKUSSION	21
4.1 BADEVANDSKONTROLANALYSER	21
4.2 BESTEMMELSE AF <i>ENTEROKOKKER</i> I PRØVER UDTAGET DEN 21. AUGUST OG DEN 10. SEPTEMBER 2003	21
4.3 FÆNOTYPEBESTEMMELSE	23
4.3.1 <i>Indledende analyse af kontrolstammer og "blindprøver"</i>	23
4.3.2 <i>Blindprøver</i>	23
4.3.3 <i>Diversitet</i>	24
4.3.4 <i>ID-niveau for similaritet</i>	24
4.3.5 <i>Similaritet mellem prøver</i>	25
5 KONKLUSIONER	29
6 REFERENCER	33
Bilag A Similaritet mellem populationer	35

Forord

Denne rapport beskriver resultaterne af afprøvning af en metode til opsporing af kilder til forurening af badevand.

Analyserne er udført på prøver udtaget fra badevandsstationen Vandet Sø Østende. Lokaliseringen af potentielle kilder til forureningen er sket i samarbejde med Thisted Kommune. De lokale landmænd har givet adgang til prøvetagning på deres ejendomme og bidraget med værdifulde oplysninger om potentielle kilder.

Thisted Kommune og de lokale landmænd takkes for deres bidrag og velvillige samarbejde.

Sammenfatning og konklusioner

Ifølge Kommissionens forslag til et nyt badevandsdirektiv vil der fremover blive stillet større krav til at forbedre vandkvaliteten på badesteder, der ikke overholder kravene til den hygiejniske kvalitet. De hygiejniske parametre er indikatorbakterierne *E. coli* og fækale *Enterokokker*. For at forbedre vandkvaliteten på et forurenede badested er det nødvendigt at kende kilden til forureningen. Der er derfor behov for at afprøve metoder til bestemmelse af indikatorbakteriernes oprindelse.

En sådan metode er PhPlate rapid. Med denne metode kan man karakterisere bakterier på baggrund af deres fænotypiske egenskaber (engl.: phenotype, heraf navnet ph-plate). En bakteries fænotypiske egenskaber kan defineres som dens synlige fysiske egenskaber eller adfærd, f.eks. hvor hurtigt en bakterie vokser på forskellige substrater under bestemte forhold. Ved at gennemføre en fænotypisk bestemmelse af bakterier, der er isoleret fra en forurenede lokalitet, og bakterier, der er isoleret fra potentielle forureningskilder, og derefter lave en statistisk sammenligning mellem fænotyperne fra de forskellige lokaliteter, kan man identificere den lokalitet, der med størst sandsynlighed er kilden til forureningen.

Det har været dette projekts formål at undersøge, om PhPlate rapid screening for *Enterokokker* kan anvendes til kildeopsporing i badevand samt at anvende PhPlate rapid screening for *Enterokokker* til lokalisering af kilden til forurening i Vandet Sø Østende.

Vandet Sø er valgt som prøvetagningslokalitet, idet der i den østlige ende af søen er konstateret overskridelse af badevandskravene for *E. coli* i en periode. Endvidere er lokaliteten valgt, fordi Thisted Kommune gennem de senere år har undersøgt området og har peget på de mest sandsynlige forureningskilder.

Fra badevandsprøver og prøver fra potentielle forureningskilder er der isoleret *Enterokokker* til fænotypisk karakterisering. Isoleringen er foregået ved dyrkning på m-Enterokok agar og efterfølgende verifikation på galdeæskulin-agar. Det var målet at opnå 24 isolater fra hver af prøverne, undtaget gødningsprøverne, hvor det var målet at isolere 8 *Enterokokker* fra hver prøve. I projektet er der i alt isoleret 238 *Enterokokker*.

I PhPlate rapid screening undersøges *Enterokokkernes* evne til at vokse på forskellige relevante substrater. I en 12 x 8 brønds mikrotitrebakke er der nedlagt 11 tørrede substrater i hver af de 8 rækker. Ved analysens start tilsættes alle brøndene enterokoksubstrat med bromothymolblå som indikator for vækst. En *enterokok*-koloni suspenderes i den første brønd uden tørret substrat. Herfra pipetteres suspensionen ud i de 11 andre brønde. Dette gentages for hver af de 8 rækker. Pladen inkuberes og aflæses på en fladbed-scanner efter 16, 40 og 64 timer. Brønde med gul farveudvikling er positive.

Der er udtaget prøver fra badevandsstationen Vandet Sø Østende og fra potentielle forureningskilder den 21. august 2003 og den 10. september 2003. De undersøgte potentielle kilder var et nedsivningsanlæg, en afvandingskanal,

en lejrskole, en gylletank, kokasser, bundmateriale fra badevandslokaliteten, samt ekskrementer fra fugle.

Inden analyse af prøver fra Vandet Sø Østende, er der blevet gennemført indledende analyser af kontrolstammer. Resultaterne var tilfredsstillende for to af tre kontrolstammer. Den tredje kontrolstamme har variabel fænotype, og analyseresultaterne for denne stamme varierede mere end forventet. Analyse af blindprøver viste, at der ind imellem sker en utilsigtet forurening i brøndene, hvilket medfører en vis usikkerhed. Analyse af referencestammer og dobbelt-analyse af udvalgte stammer fra prøverne viste, at variationen var på et acceptabelt niveau. På baggrund af den observerede variation er similaritetsgrænsen, hvorover bakterieisolater anses for at være ens, bestemt til 0,965.

Resultatet af de obligatoriske badevandsanalyser fra Vandet Sø Østende viste, at der i 2003 er sket en overskridelse af kvalitetskravene. Badevandsanalyserne stemte godt overens med analyserne af *Enterokokker*, som er udført i dette projekt.

Indholdet af *Enterokokker* i vandprøven, som var synligt påvirket af måger, var lavt. Det betyder, at forurening af prøven med fuglekatter ikke nødvendigvis giver anledning til enkeltstående forhøjede koncentrationer af *Enterokokker* i forbindelse med badevandsovervågning.

Similariteten mellem to prøver bestemmes på baggrund af den parvise similaritet mellem *Enterokokker* fra de to prøver. Den beregnes som antallet af par med similaritet større end 0,965 divideret med det samlede antal mulige par. For eksempel er similariteten mellem isolaterne i badevandsprøven og prøven udtaget i pumpekanalen den 21. august 0,367. Det betyder, at ud af de 420 mulige similaritetspar har 36,7% (= 154 par) en similaritet, der er større end 0,965. En similaritet på 1 betyder, at alle isolater i to prøver, der sammenlignes, er fænotypisk identiske. En similaritet på 0 betyder, at ingen af isolaterne i de to prøver har en similaritet over 0,965.

Undersøgelsens resultater viste, at similariteten mellem de tre badevandsprøver og prøven fra pumpekanalen var høj, idet 35-37% af isolaterne er fænotypisk identiske. Det kan tolkes som om, at pumpekanalen har været kilden til forurening. De lokale beboere har imidlertid oplyst, at pumpestationen ikke har været i drift hele sommeren, og inspektion af pumpestationen har vist, at vandstrømmen var fra søen og ind i pumpekanalen. Det er således mest sandsynligt, at søen er kilde til forurening i pumpekanalen og ikke omvendt.

Similariteten mellem badevandsprøverne udtaget den 21. august og den 10. september er høj og indikerer, at kilden til forureningen på badevandsstationen er den samme de to dage.

Derimod er similariteten mellem de øvrige potentielle kilder og badevandsprøverne ikke så entydige, at man kan pege på en forureningskilde med sikkerhed. Blandt de analyserede prøver er det kokasserne, der har størst similaritet med badevandsprøverne. Det er derfor kvæget, der med størst sandsynlighed er kilde til forureningen. Det blev dog fundet, at antallet af *Enterokokker* umiddelbart tæt på kvægvandingsstedet var lavt og fænotypisk var de helt forskellige fra *Enterokokkene* i badevandsprøverne. Derfor er der usikkerhed omkring konklusionen, og det foreslås, at der gennemføres en

supplerende undersøgelse, hvor der udtages et antal prøver hen over badesæsonen for at bekræfte resultatet.

Kildesporingsmetoden kunne eftervise sammenhænge mellem badevandsstationen og pumpekanalen og kokasserne. Metoden viser imidlertid andre høje, men mindre forklarlige ligheder mellem prøver fra de andre lokaliteter, f.eks. mellem prøven fra nedsivningsanlægget (21. august) og prøven udtaget i gylletanken.

På baggrund af denne pilotundersøgelse kan det konkluderes, at PhPlate metoden kan påvise ligheder og forskelle mellem de fænotyper, der forekommer i badevandsprøverne og i potentielle forureningskilder. Metoden er dermed en lovende teknik til kildesporing.

Resultaterne indikerede, at metoden i nogle tilfælde er behæftet med nogen usikkerhed. Metoden kræver en vis routine for at opnå optimale resultater.

Summary and conclusions

The Proposal for Directive of the European Parliament and of the Council concerning the quality of bathing water (COM/2002/0581 final) put more focus on the improvement of the hygienic bathing water quality than previously. In the proposal, legally binding limit values are proposed for the hygienic indicators *E. coli* and *Enterococci*. To improve the hygienic water quality on non-complying locations, it is necessary to know the source of the contamination. Therefore there is a need to test and apply methods to track the origin of the hygienic indicators.

PhPlate Rapid is a screening method for microbial source tracking, which enables you to characterise bacteria on the basis of their phenotypic properties. The phenotypic properties of a bacterium can be defined as "the visible physical characteristics or behaviours" of the bacterium, e.g. its growth rates on different substrates under specified conditions. In order to use PhPlate Rapid, bacteria are isolated from a contaminated bathing water location and from the potential sources of the contamination and phenotyped. A subsequent statistical analysis can then show which of the potential sources is most probably causing the contamination.

It was the aim of this project to evaluate PhPlate Rapid for *Enterococci* as a tool to track the sources of hygienic contamination in bathing water, and specifically to track the source of contamination in the eastern part of Lake Vandet (Vandet Sø Østende).

Lake Vandet was chosen because the concentration of *E. coli* exceeds the accepted limits every summer, and because the Municipality of Thisted has examined the area within the last few years and identified the most likely sources of contamination.

Samples were taken from the bathing water location and from the potential sources of contamination. From these samples, *Enterococci* were isolated by cultivation on m-*Enterococcus* agar and subsequent verification on bile-aesculine-azide agar and characterised phenotypically by PhPlate Rapid. It was the aim to achieve 24 isolates from each sample except from the faeces samples, for which 8 isolates were the aim. In the project, a total of 238 *Enterococci* were isolated.

In the PhPlate Rapid method, the ability of *Enterococci* to grow on different relevant substrates is examined. Eleven dried substrates have been added to each row of an 8 times 12 well microtitre tray. At the start of the analysis, enterococ-medium containing bromothymol blue as an indicator of growth is added to all the wells of the PhPlate microtitre tray. An *Enterococ*-colony is suspended in the medium of the first well, which does not contain a dried substrate. From the first well, the *Enterococ*-suspension is pipetted into the remaining 11 wells. This procedure is repeated for the remaining 7 rows of the PhPlate microtitre tray. The PhPlate is then incubated and read on a flatbed-scanner after 16, 40 and 64 hours. Wells developing a yellow colour are positive.

Samples were taken from the bathing water location at the eastern part of Lake Vandet and from the potential sources of contamination on 21 August and 10 September 2003. The potential sources of contamination were a sewage infiltration plant, a drainage canal, a summer camp facility, pig slurry, cattle faeces, sedimented material and gulls' faeces.

Prior to the analysis of the samples from the eastern part of Lake Vandet, a number of preliminary analyses were carried out on control strains. The results were acceptable for two of three control strains whereas the third control strain had a variable phenotype and showed a higher variation than expected. Analysis of blinds (sterile water) showed that unintended contamination might occur leading to unwanted variation. The analysis of control strains and double analyses showed that the variation as a whole was acceptable. Based on the observed variation, the limit, above which two isolates are considered to be of the same phenotype, was determined to be 0.965.

The 2003 results of the obligatory analyses of the bathing water from the eastern part of Lake Vandet failed to meet the hygienic standards. The results of our analyses agreed with the obligatory bathing water analyses.

In the water samples with gulls' faeces, the concentration of *Enterococci* was low. This indicates that contamination of bathing water samples with faeces from gulls does not necessarily lead to an elevated concentration and non-compliance with the regulations.

The similarity between two samples is determined on the basis of the similarity between pairs of *Enterococcal* isolates from the two samples. The similarity between samples is calculated as the number of pairs with a similarity above 0.965 divided by the total number of possible pairs. For example, the similarity between the isolates from the bathing water sample and the sample from the drainage canal taken on 21 August is 0.367. This means that of 420 possible pairs, 36.7% (=154 pairs) have a similarity above 0.965. A similarity of 1 means that all isolates from two samples are of the same phenotype. Similarities of 0 means that none of the isolates from the two samples have a similarity above 0.965.

The similarities between the three bathing water samples and the sample from the drainage canal were between 0.35 and 0.37, which is relatively high. This indicates that the contamination of the bathing water originates from the drainage canal. However, the local farmers told us that the pumping station had been out of service during the summer season, and an inspection of the pumping station showed that the direction of the water flow was from the lake into the drainage canal. The consequence of this is that the most probable explanation of the high similarity is that the lake is the source of contamination in the drainage canal.

The similarity between the bathing water samples from 21 August and 10 September 2003 was high, indicating that the source of contamination is the same on both occasions.

The similarity between the samples from the other potential sources of contamination and the bathing water does not clearly point out the source of contamination. Among the analysed samples, the samples of cattle faeces have the highest similarity to the bathing water samples. Therefore, the cattle faeces

are considered to be the most likely source of contamination. However, in water samples taken close to the cattle watering location, the concentration of *Enterococci* was low, and their phenotype was completely different from the phenotypes found in the bathing water samples. Therefore, the conclusion is subject to uncertainty. It is suggested that a supplementary investigation, in which samples are collected throughout the bathing water season, is carried out to confirm or reject the results of this investigation.

The PhPlate Rapid method could identify relations between the bathing water location, the drainage canal and the cattle faeces. However, other less explainable results were also obtained such as high similarity between the sewage infiltration plant and the pig slurry.

Based on the pilot investigation, it can be concluded that the PhPlate Rapid method can show similarities and differences between the phenotypes of the *Enterococci* from the bathing water location and the potential sources of contamination. The method is thus a promising technique for microbial source tracking.

The results indicated that the method in some cases is subject to uncertainty. The method requires experienced laboratory technicians to obtain optimal results.

1 Indledning

1.1 Baggrund

Ifølge Kommissionens forslag til et nyt badevandsdirektiv (KOM (2002) 581 Endeligt) vil der fremover blive stillet større krav til at forbedre den hygiejniske kvalitet på badesteder, der ikke overholder kravene. For at forbedre kvaliteten er det nødvendigt at kende kilden til forureningen. Der er derfor behov for at afprøve metoder til bestemmelse af indikatorbakteriernes oprindelse (*E. coli* og intestinale *Enterokokker*, som er de nye parametre i forslaget til et badevandsdirektiv).

En sådan metode er PhPlate rapid screening. Med denne metode kan man karakterisere bakterier på baggrund af deres fænotypiske egenskaber. En bakteries fænotypiske egenskaber kan defineres som dens synlige fysiske egenskaber eller adfærd. F.eks. hvor hurtigt en bakterie vokser på forskellige substrater under bestemte forhold. Ved at gennemføre en fænotypisk bestemmelse af bakterier, der er isoleret fra en foruren lokalitet, og bakterier, der er isoleret fra potentielle forureningskilder, og derefter lave en statistisk sammenligning mellem fænotyperne fra de forskellige lokaliteter, kan man identificere den lokalitet, der med størst sandsynlighed er kilden til forureningen.

1.2 Formål

Det er projektets formål:

- at undersøge om PhPlate rapid screening for *Enterokokker* kan anvendes til kildeopsporing i badevand
- at anvende PhPlate rapid screening for *Enterokokker* til lokalisering af kilden til forurening i Vandet Sø Østende

1.3 Vandet Sø

Vandet Sø er valgt som prøvetagningslokalitet, idet der i den østlige ende er konstateret overskridelse af badevandskravene for *E. coli* i en periode. Søen er ca. 2,7 km lang og 2,5 km bred og ligger 10 km nordvest for Thisted. I den østlige ende findes et lavvandet område, som anvendes af mange uerfarne surfer. Af hensyn til surferne er adgangsforholdene til søen forbedret, idet der er anlagt en parkeringsplads. I søens vestlige ende overholdes badevandskravene.

Endvidere er lokaliteten valgt, fordi Thisted Kommune gennem de senere år har undersøgt området og har peget på de mest sandsynlige forureningskilder som et nedslivningsanlæg, en lejrskole nord for badevandsstationen, kvæg, der græsser ved og drikker vand af søen, en afvandingskanal, der sænker vandstanden i området øst for, og gylletanke. Endvidere findes en spejderhytte og et toilet, der eventuelt kan være kilder. De lokale beboere henviser i øvrigt til, at problemet stammer fra surferne. Endelig ophobes der afrevet og delvist

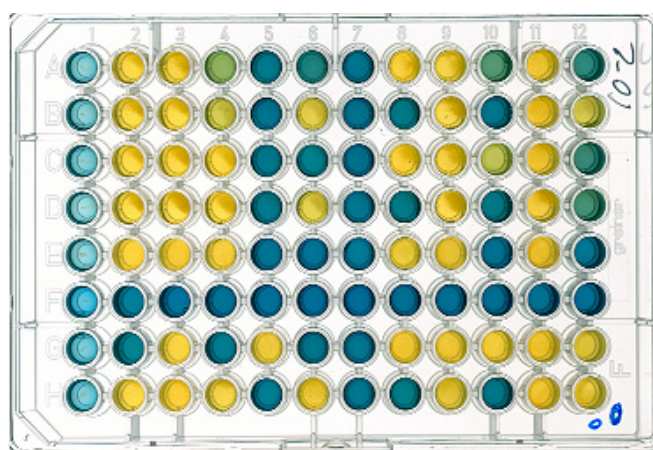
nedbrudt grøde i rørsumpen, i små volde på stranden og i et lag på bunden, som muligvis kan forbedre overlevelsesmulighederne for bakterierne.

2 Metodebeskrivelse

Phplate RF er udviklet af PhPlate Microplate Techniques AB, Stockholm. (www.phplate.se). Med metoden bestemmer man *Enterokokkers* evne til at vokse på 11 relevante substrater. Den anvendte procedure følger anvisningerne fra PhPlate Microplate Techniques AB og er suppleret med oplysninger fra Thor Axel Stenström, Smittsskyddsinstitutet, og Inger Kuhn, Karolinska Institutet (Pers. com. 2003). Inger Kuhn udviklede metoden sammen med Thor Axel Stenström i starten af 1990'erne (Kuhn et al. 1991)

Vandprøver filtreres og dyrkes ved 37°C i 48 timer på m-Enterokok agar. Faste prøver suspenderes i buffer og spredes på m-Enterokok agar. Suspekter kolonier verificeres på galdeæskulin-agar ved 44°C.

I en 12 x 8 brønds mikrotitrebakke er der nedlagt 11 tørrede substrater i hver af de 8 rækker. Ved analysens start tilsættes alle brøndene enterokoksubstrat med bromothymolblå som indikator for vækst. En *enterokok*-koloni suspenderes i den første brønd uden tørret substrat. Dette gentages for hver af de 8 rækker. Herfra pipetteres suspensionen ud i de andre 11 brønde med en 8 kanalers multipipette. Pladen inkuberes ved 37°C og aflæses på en flatbed-scanner (HP4700) efter 16, 40 og 64 timer. Figur 2.1 viser et eksempel på en plade, der har været inkuberet i 64 timer. De gule brønde er positive. Ved aflæsningen af pladen bestemmes intensiteten af den gule farve.



Figur 2.1
PhPlate RF der har været inkuberet ved 37°C i 64 timer

Resultaterne behandles i et program, phpwin, der er udviklet af Phplate. Programmet kan beregne similaritet mellem isolater, optegne dendogrammer, bestemme similaritet mellem populationer og identificere de mest typiske isolater blandt de fundne fænotyper.

3 Prøvetagning

Prøvetagningslokaliteterne er vist på figur 3.1. Der blev udtaget prøver to gange, den 21. august og den 10. september 2003.

Den 21. august blev der udtaget prøver på lokaliteterne 1-7.

Den 10. september blev der udtaget dobbeltprøve på lokalitet 2 og enkeltprøver på lokalitet 1, 4, 8, 9 og 10. Pumpestationen blev inspiceret. Det blev observeret, at vandet strømmede fra søen ind i pumpekanalen. Ifølge de lokale landmænd har pumpen ikke kørt hele sommeren.

Ved prøvetagningen den 10. september blev der pløjet på marken syd for pumpekanalen. Ploven blev fulgt af en stor flok måger, som med jævne mellemrum slog sig ned i søen og dermed kunne give anledning til forurening.

For at kunne skelne mellem prøverne, der er udtaget fra nedsivningsanlægget og på badevandsstationen, på de to prøvetagningsdage, er prøverne udtaget den 21. august mærket med (1), og prøverne udtaget den 10. september mærket med (2).

Prøvetagningen blev udført af Claus Jørgensen. Prøvetagningen var på forhånd aftalt med Jan Salomonsen og David Gill, Thisted Kommune, som også var tilstede ved prøvetagningen.



Figur 3.1

Prøvetagningsstationer. 1: Nedsivningsanlæg, 2: Badevandsstation, 3: Kvægvanding, 4: Pumpekanal, mellem pumpestation og sø. 5: Gylletank, 6: Friske kokasser ved pumpekanal, 7: Tørre kokasser ved kvægvandingssted, 8: Indsamling af mågeklatter i vand, umiddelbart SV for kvægvandingssted, 9: Lejrskole, samlebrønd øst, 10: Bundmateriale udtaget på 30 cm dybde cirka 1 m fra rørsump ved badevandsstation.

4 Resultater og diskussion

4.1 Badevandskontrolanalyser

I forbindelse med denne undersøgelse har Miljøstyrelsen bedt Miljøcenter Vestjylland I/S om at analysere for fækale *Enterokokker*, foruden de normale parametre, på badevandsstationen Vandet Sø Østende. Resultaterne af disse analyser fremgår af tabel 4.1. Det ses, at koncentrationen af *Enterokokker* er højere end kravet i Kommissionens forslag til et nyt badevandsdirektiv på 200 pr. 100 ml på 2 ud af de 8 dage, hvor der er udtaget prøve. Det kan også konstateres, at der er en rimelig overensstemmelse mellem antallet af *Enterokokker* og *E. coli*, idet de høje værdier måles på de samme dage, undtagen den 19. august hvor koncentrationen af *E. coli* var lav i forhold til *Enterokokker*. Beregnet på grundlag af logaritmerede data er forholdet mellem *E. coli* og *Enterokokker* 2,4 i denne undersøgelse. Hvis resultaterne fra prøven udtaget den 19. august udelades af beregningerne, er forholdet 3,4. I Kommissionens forslag er faktoren mellem kravene for *E. coli* og *Enterokokker* på 2,5.

Tabel 4.1

Resultater af analyser af prøver fra Vandet Sø Østende udført af Miljøcenter Vestjylland

Dato	<i>Enterokokker</i>	<i>E. coli</i>	Coliforme
	/100 ml	/100 ml	/100 ml
22-07-2003	11	80	50
28-07-2003	580	1.800	3.200
05-08-2003	120	300	430
11-08-2003	25	30	20
19-08-2003	550	120	110
25-08-2003	21	80	130
02-09-2003	12	40	20
09-09-2003	200	1.200	960

4.2 Bestemmelse af *Enterokokker* i prøver udtaget den 21. august og den 10. september 2003

Koncentrationen af *Enterokokker* i de prøver, der er udtaget i nærværende undersøgelse, fremgår af tabel 4.2. Det foreslåede krav for *Enterokokker* i Kommissionens forslag til et nyt badevandsdirektiv er overskredet på badevandsstationen på begge prøvetagningsdatoer. Det ses, at koncentrationerne i badevandsprøverne stemmer godt overens med resultaterne opnået af Miljøcenter Vestjylland, hvor der blev fundet en overskridelse den 19. august og en værdi lige på grænsen den 9. september 2003.

Koncentrationen af *Enterokokker* lå ikke uventet væsentligt højere i prøven fra nedsivningsanlægget og i gylle- og gødningsprøverne. Derimod er det overraskende, at samlebrønden fra lejrskolen har så lavt indhold.

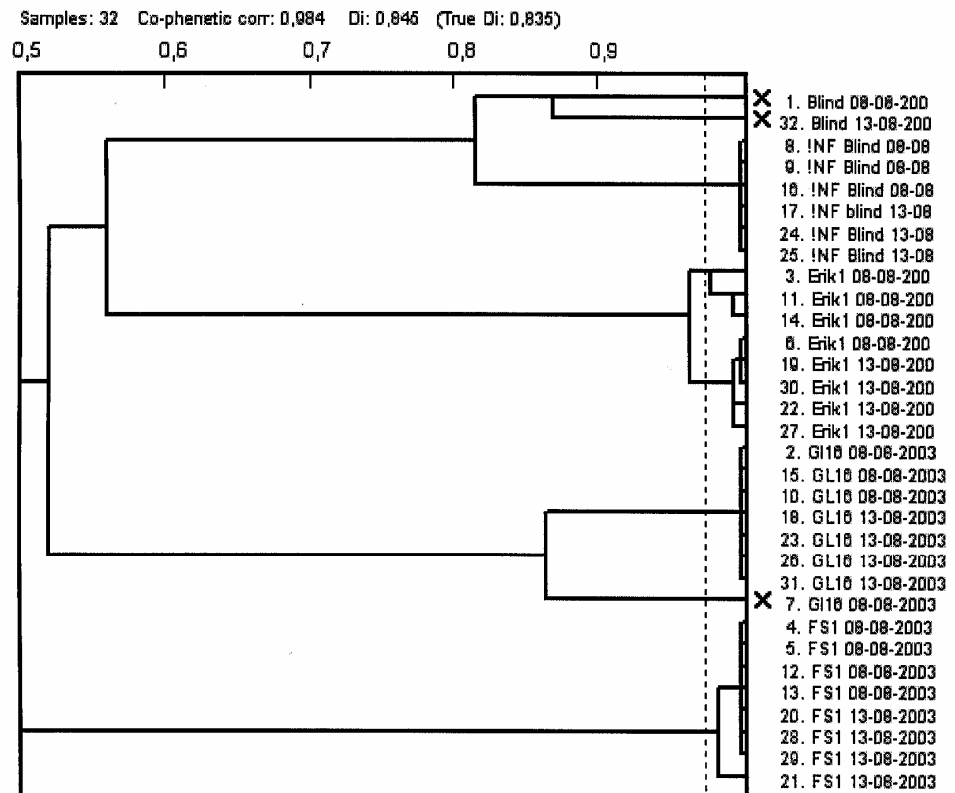
Vandindholdet i kokasserne varierede betydeligt, men er af praktiske årsager ikke målt, og tallene er derfor ikke direkte sammenlignelige. Kokasserne, der blev udtaget ved pumpekanalen, var friske og våde. Kokasserne fra kvægvandingsarealet var derimod 1 til 2 uger gamle og delvist udtørrede.

Kun prøverne fra kvægvandingsområdet og vandet med mågeklatterne lå under kravet på 200 *Enterokokker* pr. 100 ml. Indholdet af *Enterokokker* i vandet med mågeklatte er overraskende lavt, da *Enterokokker* er tilstede i fugleklatte i højt antal. Det betyder, at forurening af prøven med fugleklatte ikke nødvendigvis giver anledning til enkeltstående forhøjede koncentrationer af *Enterokokker* i forbindelse med badevandsovervågning.

Tabel 4.2

Bestemmelse af antal *Enterokokker* i prøver udtaget den 21. august og 10. september 2003

Prøve		Total antal på MEA pr. 100 ml eller pr. g våd vægt		Galdeæskulin positive pr. 100 ml eller pr. g våd vægt
21. aug.	Nedsivningsanlæg (1)	520.000	420.000	470.000
21. aug.	Badevandsprøve (1)	450	320	320
21. aug.	Kvægvanding	180	170	130
21. aug.	Pumpekanal	700	690	610
21. aug.	Gylle	630.000	680.000	660.000
21. aug.	Kokasse 1 ved kanal pr. våd vægt (g)	2.700	2.200	2.500
21. aug.	Kokasse 2 ved kanal pr. våd vægt (g)	48.000	27.000	38.000
21. aug.	Kokasse 1 v. kvægvanding pr. våd vægt (g)	770.000	86.0000	820.000
21. aug.	Kokasse 2 v. kvægvanding pr. våd vægt (g)	890	1.000	950
10. sept.	Badevandsprøve (2-1)	710	-	670
10. sept.	Badevandsprøve (2-2)	530	-	530
10. sept.	Vand med mågeklatte	24	-	19
10. sept.	Lejrskole Samletank øst	8.000	-	4.000
10. sept.	Nedsivningsanlæg (2)	450.000	-	450.000
10. sept.	Snav fra bund pr. våd vægt (g)	780	-	630



Figur 4.1
 Dendrogram, der viser similariteten mellem tre testede kontrolstammer og blindtest

4.3 Fænotypebestemmelse

4.3.1 Indledende analyse af kontrolstammer og "blindprøver"

Inden analyse af *Enterokokker* fra badevandsprøverne er der på to forskellige dage gennemført fænotypebestemmelse af tre kontrolstammer. Stammerne er leveret af Inger Kuhn, Karolinska Institutet. Resultaterne ses i figur 4.1. På figuren angiver de lodrette streger, der forbinder de enkelte isolater, niveauet for similaritet. Der ses god overensstemmelse mellem de to dage og inden for dagen. I to blindtest er der dog sket en forurening (angivet med x i figuren). I et tilfælde er stamme GL16 afvigende fra de øvrige (angivet med x). For stamme Erik1 er similariteten mellem de to dage lidt mindre end 0,975, der normalt anses for at være grænsen, hvorover stammerne anses for at være ens (Kuhn et al. 2003). Årsagen er ifølge Inger Kuhn, at stamme Erik1 giver varierende resultater på et af substraterne i pladen.

4.3.2 Blindprøver

I forbindelse med analyse af prøverne er der udført i alt 69 blindtest. Af disse blev 21 så forurenede, at der blev observeret vækst i en eller flere af brøndene. I forbindelse med analyserne på prøverne udtaget den 21. august var 44% forurenede, mens der var 19% forurenede i forbindelse med prøverne udtaget den 10. september. Altså en væsentlig forbedring for den anden prøvetagning. Årsagen til forureningerne er ikke kendt, men det forventes, at større rutine og forsigtighed kan nedsætte forureningsgraden. Endvidere kan der muligvis

ændres på den praktiske udførelse. Hvis metoden skal videreføres, vil det være fordelagtigt at besøge Inger Kuhn og se, hvordan testen køres der.

Den relativt høje forureningsgrad må forventes også at gælde for de testede kolonier. Hvis forureningsgraden kan reduceres, er det sandsynligt, at ID-niveauet også vil kunne hæves, og at analysen bliver mere pålidelig.

4.3.3 Diversitet

I tabel 4.3 ses en oversigt over diversiteten (D_i) af populationerne på de enkelte lokaliteter. En diversitet på 1 svarer til, at alle isolater er forskellige. En diversitet på 0 svarer til, at alle isolater er ens. Antallet af isolater, der er karakteriseret fra hver prøve, er angivet i tabellen. Der er i alt blevet karakteriseret 238 isolater. Tabellen er ordnet med de største diversiteter øverst i tabellen.

De største diversiteter fandtes i badevandsprøverne, bundmateriale ved badevandslokalitet og i prøven fra pumpekanalen, mens de laveste diversiteter blev fundet i prøven fra kvægvandingsområdet, gyllen og "mågevandet". I tre af kokasseprøverne blev der også observeret en relativt høj diversitet. Antallet af isolater fra hver af kokasserne er valgt til 8, da man normalt forventer lav diversitet i gødningsprøver (Kuhn et al. 2003). Den høje diversitet viser imidlertid, at det havde været ønskeligt med et højere antal isolater herfra.

Tabel 4.3
Antal testede isolater og populationsdiversitet

Dato	Prøvenavn	Antal isolater	Diversity (D_i)
10. september	Snav fra bund	19	0,977
21. august	Badevandslokalitet (1)	20	0,953
21. august	Pumpekanal	21	0,938
10. september	Badevandslokalitet (2-1)	13	0,936
10. september	Badevandslokalitet (2-2)	16	0,933
21. august	Kokasse tør 1	8	0,893
21. august	Kokasse tør 2	8	0,893
21. august	Lejrscole Øst	8	0,893
21. august	Kokasse frisk 1	8	0,857
10. september	Nedsivningsanlæg (2)	23	0,854
21. august	Nedsivningsanlæg (1)	23	0,791
21. august	Kokasse frisk 2	8	0,714
10. september	Måge vand	18	0,68
21. august	Gylletank	24	0,634
21. august	Kvægvanding	21	0,267
I alt		238	

4.3.4 ID-niveau for similaritet

I analyserne af badevandsprøverne er der for alle prøverne medtaget et antal test af de tre kontrolstammer. Endvidere er der lavet dobbeltbestemmelse på mindst 2 af de testede kolonier for hver prøve, og på hver plade er der medtaget mindst en blindtest. På baggrund af disse test kan ID-niveauet, dvs. grænsen for hvor høj similariteten mellem to stammer skal være, før de kan betragtes som ens, bestemmes.

Tabel 4.4 viser similariteten for hver af de tre kontrolstammer og similariteten mellem tilfældigt udvalgte kolonier, som er analyseret dobbelt. Den højeste similaritet blev bestemt for de tilfældigt udvalgte og dobbeltbestemte kolonier. Årsagen er formentlig, at dobbeltbestemmelserne alle er foretaget samme dag, mens similariteten mellem kontrolstammerne er bestemt på assays fra 5 forskellige dage. Inden for dagen forventes normalt et ID-niveau på 0,975, mens der mellem dagene forventes at være et ID-niveau på 0,965 (Kuhn et al. 2003). Det betyder, at ID-niveauet for FS1 og dobbeltbestemmelserne er acceptable, mens ID-niveauet for GL16 og Erik1 ikke er acceptabelt. For Erik1's vedkommende vides det, at stammen har en variabel fænotype (se ovenfor). Dette var vi ikke klar over, da stammen blev udvalgt til test af ID-niveau.

På baggrund af ovenstående vælges at anvende et ID-niveau på 0,965, da sammenligningerne både foretages på prøver, der er analyseret på forskellige dage og inden for samme dag, og svarende til hvad der som regel anvendes.

Tabel 4.4
Similariteten for hver af de tre kontrolstammer og similariteten mellem tilfældigt udvalgte kolonier, som er analyseret dobbelt

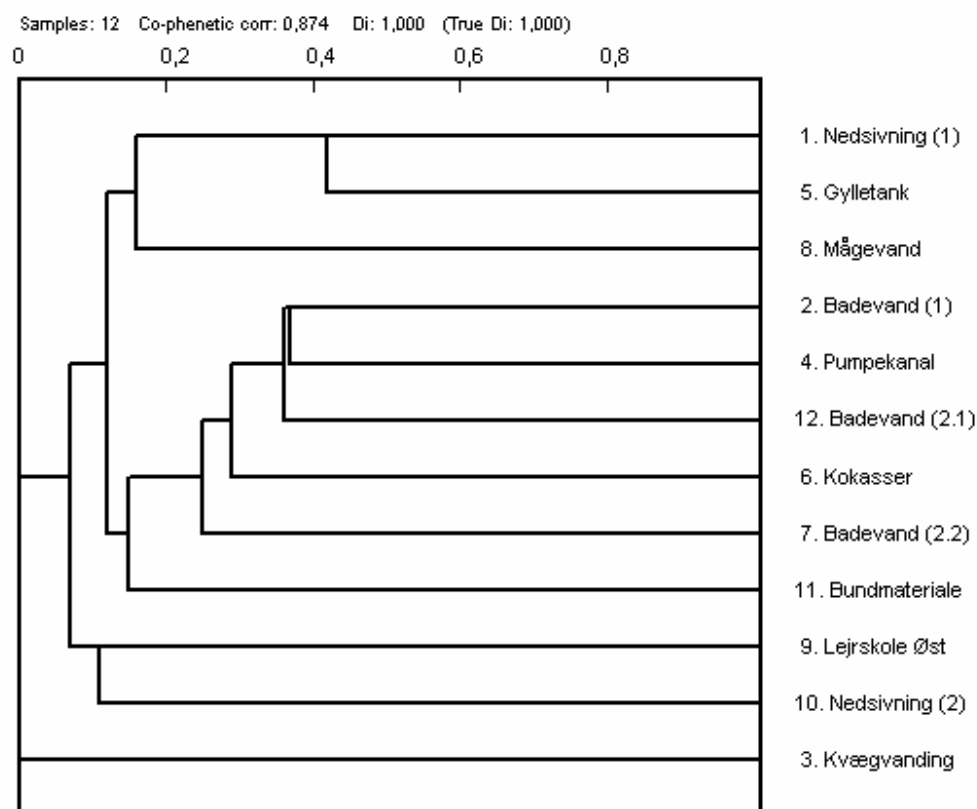
Stamme	Antal testede kolonier eller sammenlignede par	Middelsimilaritet
FS1	74 kolonier	0,966
GL16	39 kolonier	0,864
Erik1	36 kolonier	0,611
Dobbeltbestemmelse af ukendte stammer	31 par	0,972

4.3.5 Similaritet mellem prøver

Similariteten beregnes som antallet af par med similaritet større end 0,965 divideret med det samlede antal mulige par. For eksempel er similariteten mellem isolaterne i badevandsprøven og prøven udtaget i pumpekanalen den 21. august 0,367. Det betyder, at ud af de 420 (= 20 isolater x 21 isolater) mulige similaritetspar har 36,7% (= 154 par) en similaritet, der er større end 0,965. $Sp = 1$ betyder, at alle isolater i de to prøver, der sammenlignes, er fænotypisk identiske. $Sp = 0$ betyder, at ingen af isolaterne i de to prøver har en similaritet over 0,965.

I bilag A ses en opgørelse af similariteter mellem isolater (Sp) fra de forskellige prøver. Similariteten mellem prøver bestemmes på baggrund af den parvise similaritet mellem isolater fra de to prøver.

Similariteten mellem prøverne kan anskueliggøres ved en statistisk klusteranalyse. Resultatet af en klusteranalyse, hvor kokasseprøverne er samlet som én prøve, er vist i dendogrammet i figur 4.2. Ved klusteranalyser opstår fejl, fordi prøverne ikke sammenlignes parvis men i grupper. Klusteranalysen indikerer, at pumpekanalen eller kokasserne er de af kilderne, der har størst similaritet med badevandsprøverne.



Figur 4.2
 Klusteranalyse af resultaterne fra den fænotypiske karakterisering. Tallene i parentes angiver om prøven er udtaget den 21. august (1) eller 10. september (2).

Den co-phenetiske korrelation, der er angivet på figuren, er et tal for klusteranalysens pålidelighed. Hvis faktoren er $< 0,8$ er klusteranalysen upålidelig. Hvis den er 1, er der fuld overensstemmelse mellem dendrogrammet og alle de bagvedliggende data. I dette tilfælde er den co-phenetiske korrelation 0,874. Dvs. at klusteranalysens resultater kan anvendes, men at de skal tolkes sammen med de bagvedliggende data (bilag A). Dette er gjort herunder.

Similariteten mellem badevandsprøverne udtaget den 21. august og den 10. september lå mellem 0,203 og 0,352, hvilket indikerer, at kilden til forureningen på badevandsstationen sandsynligvis er den samme de to dage.

Similariteten mellem de tre badevandsprøver og prøven fra pumpekanalen er høj, idet 35-37% af isolaterne er fænotypisk identiske ($Sp=0,351-0,37$), og de 4 prøver er grupperet sammen. Som nævnt gik vandstrømmen fra søen og ind i pumpekanalen, således at søen er kilde til forurening i pumpekanalen og ikke omvendt, og similaritet mellem prøverne fra de 2 lokaliteter måtte forventes at være høj. Dette blev bekræftet med kildesporingsmetoden.

Derimod er similariteten mellem de øvrige potentielle kilder og badevandsprøverne ikke så entydige, at man kan pege på en forureningskilde med sikkerhed. I bilag A ses det for prøverne udtaget den 21. august, at de eneste potentielle kilder, der har høj similaritet ($>0,200$) med badevandsprøven, er de to kokasser udtaget ved kvægvandingsområdet (8,9).

Som omtalt ovenfor, er antallet af isolater fra hver kokasse lavt i forhold til badevandsprøverne. Derfor er der gennemført similaritetsberegninger, hvor isolaterne fra alle kokasserne er lagt sammen under et. Resultaterne fra denne beregning ses i tabel 4.5. Det ses her, at der herved fås en relativt høj similaritet mellem kokasserne og badevandet, især for prøverne udtaget samme dag (badevand 1 og pumpekanal). Ingen af de andre potentielle kilder viser høj similaritet med badevandsprøverne.

Tabel 4.5
Similaritet mellem badevandsprøver og kokasser som samlet prøve

Prøve	Prøve	Similaritet (Sp)
Badevand 1	Kokasser	0,313
Kokasser	Badevand 2-1	0,232
Kokasser	Badevand 2-2	0,252
Pumpekanal	Kokasser	0,353

Blandt de analyserede prøver er det derfor kvæget, der med størst sandsynlighed er kilde til forureningen. Mod dette taler dog, at antallet af *Enterokokker*, der blev fundet umiddelbart tæt på kvægvandingsstedet, var lavt, og fænotypisk var de helt forskellige fra *Enterokokkerne* i badevandsprøverne.

Da der kun er udtaget prøver af kokasser en gang, foreslås det, at der gennemføres en supplerende undersøgelse, hvor der udtages et antal prøver hen over badesæsonen for at bekræfte resultatet. Endvidere at udvalgte isolater bestemmes med en højere opløsning. Det kan være ved hjælp PhPlate RS eller ved genotypning.

Kildesporingsmetoden kunne eftervise sammenhængen mellem badevandsstationen og pumpekanalen. Metoden viser imidlertid andre høje, men mindre forklarlige ligheder mellem prøver fra de andre lokaliteter. Den højeste similaritet (0,424) ses mellem prøven fra nedsivningsanlægget (21. august) og prøven udtaget i gylletanken. Den høje similaritet skyldes hovedsageligt, at et isolat fra husspildevandet har en fænotype, der er identisk med fænotypen hos en stor gruppe isolater fra gyllen. Denne sammenhæng kan ikke umiddelbart forklares. Der er også relativt høj similaritet mellem prøver fra lejrskolen og den ene kokasse (Sp=0,25).

Samlet set antyder resultaterne, at metoden er behæftet med nogen usikkerhed. En væsentlig grund til denne usikkerhed er sandsynligvis problemet med forureninger af brøndene, og det er vigtigt at disse reduceres, så metodens evne til at skelne mellem prøver forbedres. Endvidere er det vigtigt, at de resultater, der opnås ved metoden, verificeres enten ved at gentage undersøgelsen eller ved at karakterisere isolaterne med mere følsomme metoder, f.eks PhPlate FS og genotypning.

Der blev observeret en forholdsvis høj similaritet mellem tre af kokasseprøverne, mens de tre ikke havde fænotyper tilfældes med den fjerde kokasse. Der er kun udtaget 8 kolonier fra hver kokasse. Da diversiteten viste sig at være relativt høj, kan det lave antal isolater være en forklaring på den signifikante forskel. Resultaterne viser imidlertid, at man ikke kan forvente, at *Enterokokker* fra alt kvæg har samme fænotype.

Det var forventet, at der var høj similaritet mellem enterokokpopulationerne i kokasserne udtaget ved kvægvandingsområdet (8, 9), og vandet udtaget umiddelbart i nærheden (3). Dette var ikke tilfældet, idet der i vandet fra kvægvandingsområdet kun fandtes 2 fænotyper, som var forskellige fra alle andre fænotyper. Prøven fra kvægvandingsområdet blev udtaget i en lille lavning med vand, og det kan tænkes, at temperatur- og vækstforhold har været specielt gunstige for enkelte typer af *Enterokokker*.

Korrelationen mellem prøverne fra de 2 prøvetagningsdatoer ved nedsivningsanlægget er lav ($S_p = 0,066$), hvilket indikerer, at populationerne af *Enterokokker* i nedsivningsanlægget varierer med tiden.

5 Konklusioner

Fænotypisk karakterisering ved hjælp af PhPlate RF til mikrobiel kildesporing i badevand er implementeret i laboratoriet med succes.

Resultaterne fra denne pilotundersøgelse viser, at metoden kan påvise ligheder og forskelle mellem de fænotyper, der forekommer i badevandsprøverne og i potentielle forureningskilder. Metoden er dermed en lovende teknik til kildesporing.

Similariteten mellem badevandsprøverne udtaget den 21. august og den 10. september 2003 var høj, hvilket indikerer, at kilden til forureningen på badevandsstationen sandsynligvis er den samme de to dage.

Som forventet viste metoden en høj similaritet mellem prøver fra badevandsstationen og fra pumpekanalen. Pumpekanalen var anset som en potentiel kilde til forurening, men da strømmen løber fra søen til kanalen, menes det omvendte at være tilfældet.

Kilden til forureningen kan ikke udpeges med sikkerhed. Blandt de analyserede prøver, er det kokasserne, der har højest similaritet med badevandsprøverne (og pumpekanalen). Derfor er kvæget den mest sandsynlige kilde til forureningen. Da der kun er udtaget prøver af kokasser en gang, vil det være nødvendigt, at der gennemføres en supplerende undersøgelse, hvor der udtages et mindre antal prøver hen over badesæsonen, for at bekræfte resultatet. Endvidere anbefales det, at udvalgte isolater bestemmes med en højere opløsning. Det kan ske ved hjælp PhPlate RS eller ved genotypning.

Prøvetagning af vand med fugleklatter gav en lav koncentration af *Enterokokker*. Det betyder, at forurening af prøven med fugleklatter ikke nødvendigvis giver anledning til enkeltstående forhøjede koncentrationer af *Enterokokker* i forbindelse med badevandsovervågning.

Resultaterne indikerede i nogle tilfælde, at metoden er behæftet med nogen usikkerhed. Analyse af kontrolstammer viser, at metoden giver tilfredsstillende resultater for stamme FS1, mens resultaterne for stamme GL16 viser en lavere similaritet end forventet. For stamme Erik1 er forklaringen på den ringe similaritet, at den har en variable fænotype. Analyse af blindprøver viser, at der er problemer med forurening af brøndene. Forureninger kan være en medvirkende årsag til de lave similariteter for stamme GL16 og stamme Erik1. De kan ligeledes være medvirkende til de uventet høje similariteter mellem nedsivningsanlægget og gylletanken. Derfor er det vigtigt, at problemet med forurening af brøndene reduceres. Med andre ord kræver metoden en del rutine.

6 Referencer

Kuhn, I., G. Allestam, T.A. Stenström & R. Mollby (1991). Biochemical Fingerprinting of Water Coliform Bacteria, a New Method for Measuring Phenotypic Diversity and for Comparing Different Bacterial Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3171-3177.

Kunh, I., A. Iversen & R. Mollby (2003). The PhenePlate(TM) system for studies of the diversity of enterococcal populations from the food chain and the environment. *Int. J.Food Microbiol.* 88,2-3,189-196.

Similaritet mellem populationer

Bilag 1: Similaritet mellem populationer (Sp) beregnet ved hjælp af Phpwin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 Nedsivningsanlæg (1)	1													
2 Badevandslokalitet 1	0,176	1												
3 Kvægvanding	0	0	0	1										
4 Pumpekanal	0,247	0,367	0	1										
5 Gylletank	0,424	0,104	0	0,11	1									
6 Kokasse frisk 1	0	0	0	0,093	0	1								
7 Kokasse frisk 2	0,015	0,096	0	0,065	0	0	1							
8 Kokasse tør 1	0,068	0,22	0	0,156	0	0	0,25	1						
9 Kokasse tør 2	0,026	0,27	0	0,148	0	0	0,125	0,219	1					
10 Badevandslokalitet (2-2)	0,192	0,274	0	0,351	0,056	0,083	0,115	0,125	0,023	1				
11 Mågevand	0,178	0,148	0	0,222	0,129	0,02	0	0,031	0,04	0,18	1			
12 Lejrscole Øst	0,026	0,175	0	0,117	0,125	0	0	0,188	0,25	0,023	0,02	1		
13 Nedsivningsanlæg (2)	0,066	0,145	0	0,131	0,024	0,081	0	0,148	0,143	0,046	0,062	0,111	1	
14 Bundmateriale	0,069	0,175	0	0,165	0,102	0,082	0,027	0,019	0,037	0,114	0,09	0,037	0,135	1
15 Badevandslokalitet (2-1)	0,169	0,352	0	0,37	0,2	0,163	0,062	0,101	0,144	0,203	0,193	0,062	0,103	0,189