



Miljøministeriet  
Miljøstyrelsen

# Mikrobiologisk Sikkert Procesvand

2013



**Titel:**

Mikrobiologisk Sikkert procesvand

**Redaktion:**

Miljøstyrelsen

**Udgiver:**

Naturstyrelsen  
Haraldsgade 53  
2100 København Ø  
[www.naturstyrelsen.dk](http://www.naturstyrelsen.dk)

**Projektdeltagere**

Danish Clean Water A/S  
Dairy Fruits A/S  
Hjortkjær Maskinfabrik  
Teknologisk Institut

**År:**

2013

**ISBN nr.**

978-87-7038-097-3

**Resumé**

Formålet med nærværende projektet var at teste og dokumentere effekten af en teknologi udviklet af Danish Clean Water til skånsom desinfektion af brugsvand i forbindelse med produktion af fødevarer.

Resultaterne fra projektet viser at en behandling af vandssystemer, i dette tilfælde procesvandet i en fødevarer virksomhed, med denne desinfektions-teknologi kan nedbringe antallet af kim i vandet samt effektivt reducere mængden af biofilm på indersiden af vandrørene.

**Ansvarsfraskrivelse:**

Naturstyrelsen offentliggør rapporter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøministeriet. Offentliggørelsen betyder, at Naturstyrelsen finder indholdet af væsentlig betydning for en bredere kreds. Naturstyrelsen deler dog ikke nødvendigvis de synspunkter, der kommer til udtryk i rapporterne.

Må citeres med kildeangivelse.

# Indhold

<b>Forord</b> .....	<b>4</b>
<b>Konklusion og sammenfatning</b> .....	<b>5</b>
<b>Konklusion</b> .....	<b>6</b>
<b>Sammenfatning</b> .....	<b>7</b>
<b>Summary and Conclusion</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Baggrund</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Formål</b> .....	<b>10</b>
2.1 Projektindhold.....	10
<b>3. Teknologien</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Projektforløb</b> .....	<b>12</b>
<b>5. Prøvetagning og analyser</b> .....	<b>13</b>
5.1 Vandprøver .....	13
5.2 Biofilm i rørstykker .....	13
<b>6. Resultater og diskussion</b> .....	<b>15</b>
6.1 Vandprøver .....	15
6.2 Biofilm .....	16
6.3 DNA baserede analyser .....	18
<b>Referencer</b> .....	<b>20</b>
<b>Bilag 1: Kim tællinger i vandprøver</b> .....	<b>21</b>
<b>Bilag 2: qPCR på biofilmprøver</b> .....	<b>22</b>
<b>Bilag 3: DGGE</b> .....	<b>23</b>

# Forord

Formålet med nærværende projektet var at teste og dokumentere effekten af en teknologi til skånsom desinfektion af brugsvand i forbindelse med produktion af fødevarer.

Projektet er gennemført med støtte fra Miljøstyrelsens tilskudsordning til Miljøeffektiv Teknologi og udført i et samarbejde mellem:

Danish Clean Water A/S ved Hardy Jepsen

Dairy Fruits A/S ved Martin Hassel, Peter Lindgaard Hansen og Mogens Hede Jensen

Hjortkjær Maskinfabrik ved Alf Simonsen

Teknologisk Institut ved Lars Ottosen og Lotte Bjerrum

# Konklusion og sammenfatning

Fødevarer virksomheder er ofte meget afhængige af rent drikkevand i produktionen. Det, at vi i Danmark anvender grundvand uden forudgående desinfektion, er på den ene side et stort privilegium og noget vi gerne vil værne om, men på den anden side også en sårbar fremgangsmåde for bl.a. fødevarer virksomheder.

Muligheden for at kunne sikre rent vand i produktionen er derfor yderst attraktivt.

Den danske virksomhed Danish Clean Water har udviklet et system til miljøvenlig desinfektion af vand. Teknologien består af et anlæg, der fremstiller en miljøvenlig og ufarlig desinfektionsvæske via elektrolyse af vand tilsat en lille smule almindeligt køkkensalt, samt et doserings- og sensor system der tilfører en lille mængde af den fremstillede desinfektionsvæske til det vand der ønskes behandlet for at opnå bakteriefrit vand.

Systemet anvendes allerede på lukkede kølesystemer samt i varmtvandssystemer, hvor det bl.a. har til formål at fjerne Legionella-bakterier. Teknologien er desuden i 2012 blevet tilladt til brug i varmtvandssystemer.

I dette projekt afprøves systemet ved den danske fødevarer virksomhed, Dairy Fruits, der - som mange andre i branchen - har høje kvalitetskrav og er dybt afhængige af rent drikkevand.

Dog er der i dette udviklings og demonstrationsprojekt ikke behandlet vand, der indgår i selve fødevarer produktionen, men udvalgt en vandstreng, som i projektforløbet kun er blevet anvendt til rengøringsformål.

Ved løbende overvågning af bakterieantallet i vandet samt udtag af rørstykker til analyse for biofilm i rørene både før og efter tilslutning af Danish Clean Waters anlæg har projektet demonstreret virkningen af behandlingen over en periode på 1/2 år.

Resultaterne fra projektet viser at en behandling af vandsystemet, med den afprøvede desinfektionsteknologi kan nedbringe antallet af dyrkbare bakterier (kim) i vandet samt effektivt reducere mængden af biofilm på indersiden af vandrørene.

Effekten på kim i vandet observeres ret hurtigt og efter en måneds behandling fandtes ingen dyrkbare kim i vandet. Fjernelse af biofilm i rørene kræver derimod lidt længere tid. På 3 måneder blev antallet af dyrkbare bakterier på indersiden af rørene reduceret med 2-3 logenheder i forhold til udgangspunktet, og 6 måneder efter tilslutning af anlægget var antallet reduceret med mere end 4 logenheder eller 99,99%.

Til sammenligning blev kim og biofilm i en nyetableret vandstreng undersøgt. I den første tid efter ibrugtagning var der høje kimtal i vandet fra denne streng, men den stabiliserede sig dog på et forholdsvis lavt niveau efter et stykke tid. En tydelig og målbar biofilm blev etableret i den nye vandstreng i løbet af 6 måneder.

I forhold til at holde biofilm og kimtal nede i en vandstreng, vurderes behandling med DCW anlægget derfor mere effektivt end udskiftning af hele vandstrengen til en ny, der oftest er den løsning fødevarer styrelsen anviser til fødevarer virksomheder med problemer med vandkvaliteten.

# Konklusion

Resultaterne fra nærværende projekt viser at en behandling af vandssystemer, i dette tilfælde procesvandet i en fødevarevirksomhed, med den miljøvenlige desinfektionsteknologi fra Danish Clean Water kan nedbringe antallet af kim i vandet samt effektivt reducere mængden af biofilm på indersiden af vandrørene.

Effekten på kim i vandet observeres ret hurtigt og efter en måneds behandling fandtes ingen dyrkbare kim i vandet. Fjernelse af biofilm i rørene kræver derimod lidt længere tid. På 3 måneder blev antallet af dyrkbare bakterier på indersiden af rørene reduceret med 2-3 logenheder i forhold til udgangspunktet, og 6 måneder efter tilslutning af anlægget var antallet reduceret med mere end 4 logenheder eller 99,99%.

Til sammenligning blev kim og biofilm i en nyetableret vandstreng undersøgt. I den første tid efter ibrugtagning var der høje kimal i vandet fra denne streng, men den stabiliserede sig dog på et forholdsvis lavt niveau efter et stykke tid. En tydelig og målbar biofilm blev etableret i den nye vandstreng i løbet af 6 måneder.

I forhold til at holde biofilm og kimal nede i en vandstreng, vurderes behandling med DCW anlægget derfor mere effektivt end udskiftning af hele vandstrengen til en ny, der oftest er den løsning fødevarestyrelsen anviser til fødevarevirksomheder med problemer med vandkvaliteten.

# Sammenfatning

Fødevarevirksomheder er ofte meget afhængige af rent drikkevand i produktionen. Det, at vi i Danmark anvender grundvand uden forudgående desinfektion, er på den ene side et stort privilegium og noget vi gerne vil værne om, men på den anden side også en sårbar fremgangsmåde for bl.a. fødevarevirksomheder.

Muligheden for at kunne sikre rent vand i produktionen er derfor yderst attraktivt.

Den danske virksomhed Danish Clean Water har udviklet et miljøvenligt system til desinfektion af vand. Systemet består af et anlæg, der fremstiller en miljøvenlig og ufarlig desinfektionsvæske via elektrolyse af vand tilsat en lille smule almindeligt køkkensalt, samt et doserings- og sensor system der tilfører en lille mængde af den fremstillede desinfektionsvæske til det vand der ønskes behandlet for at opnå bakteriefrit vand.

Systemet anvendes allerede på lukkede kølesystemer samt i varmtvandssystemer, hvor det bl.a. har til formål at fjerne Legionella-bakterier. Teknologien er desuden i 2012 blevet tilladt til brug i varmtvandssystemer.

I dette projekt afprøves systemet ved den danske fødevarevirksomhed, Dairy Fruits, der -som mange andre i branchen -har høje kvalitetskrav og er dybt afhængige af rent drikkevand.

Dog er der i dette udviklings og demonstrationsprojekt ikke behandlet vand, der indgår i selve fødevareproduktionen, men udvalgt en vandstreng, som i projektforløbet kun er blevet anvendt til rengøringsformål.

Ved løbende overvågning af bakterieantallet i vandet samt udtag af rørstykker til analyse for biofilm i rørene både før og efter tilslutning af Danish Clean Waters anlæg har projektet demonstreret virkningen af behandlingen over en periode på 1/2 år.

# Summary and Conclusion

Danish food industry is very dependent on clean drinking water for their production processes. In Denmark, we use ground water that has not previously been disinfected which on the one hand is a great privilege and something we want to safeguard, but on the other hand it is also a very vulnerable procedure i.a. for food businesses.

Therefore, being able to ensure clean water in the production process is in great demand.

The Danish company "Danish Clean Water" has developed a system for environmentally-friendly water disinfection. The technology produces an environmentally-friendly and harmless disinfection liquid by means of electrolysis of water to which a small amount of ordinary kitchen salt is added. In addition, it has a feeding and sensor system that adds a small amount of the disinfection liquid to the water requiring treatment, so bacteria-free water can be obtained.

The system is already in use on closed cooling systems and in hot water systems where the objective i.a. is to remove Legionella bacteria. The technology became approved for hot water use in Denmark in 2012.

In this project, the system will be tested by a Danish food business called Dairy Fruits. As many other companies in this line of business, they have high quality requirements and are very dependent on clean drinking water.

However, in this development and demonstration project, water for food production has not been treated, but a water pipe was chosen that only had been used for cleaning purposes.

By continually supervising the bacteria number in the water and removing sections of the pipe to analyze if biofilm existed in the pipes before and after connecting the system from Danish Clean Water, the project has demonstrated the effect of the treatment over a period of 6 months.

The project results show that treating the water system with the tested disinfection technology, reduced the number of culturable bacteria (cfu) in the water and efficiently reduced the amount of biofilm on the inside of the water pipes.

The effect on germs in the water appeared rather quickly and after a month treatment, no culturable bacteria existed in the water. However, removal of biofilm in the pipes required some more time. In three months, the number of culturable bacteria on the inside of the pipes was reduced by 2-3 log units compared to the starting point and 6 months after the system had been connected, the number was reduced by more than 4 log units or 99.99%.

For comparison, bacteria and biofilm in a newly established water pipe were investigated. Just after the water pipe had been taken into use, there was a high amount of germs in the water from the pipe, but after some time it stabilized itself at a rather low level. Obvious and measurable biofilm was established in the new water pipe in the course of 6 months.

In relation to oppressing biofilm and germs in a water pipe, treatment with a DCW system is estimated to be more efficient than replacing the entire water pipe with a new one which is the solution the Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries often recommends to the food industry when they experience water quality problems.



# 1. Baggrund

Vi har i Danmark som udgangspunkt valgt ikke at behandle vores drikkevand fordi kvaliteten som udgangspunkt er rigtig god. Under almindelige omstændigheder er det den rigtige beslutning. Imidlertid bringer det en række danske fødevarer virksomheder i vanskeligheder og kan give utilsigtede problemer i produktionen. Den primære årsag er at det med den strategi ikke altid er muligt at holde et kimtal – dvs. antallet af dyrkbare bakterier - i produktionsvandet som kan accepteres af intern kvalitetskontrol, forbrugerne og eksportmarkeder hvor der ofte er valgt aktive strategier til at sikre fødevarer.

Mængden af kim i det rene vand kan variere betydeligt ved aftapningsstedet afhængig af koncentrationen af kim ved indløb til virksomhed (områdets generelle vandkvalitet), design og indretning af rørsystem i virksomheden og virksomhedens forbrugsmønster

Under hensyntagen til en rationel og konkurrencedygtig produktion gives der ofte ikke mange reaktionsmuligheder fra virksomheden hvis kimtallet i det rene vand overstiger grænseværdierne for drikkevand på hhv. 20 kim<sup>37</sup> og 200 kim<sup>22</sup>/ml. Ofte er en udskiftning, eller gennemgribende rensning (CIP) den eneste mulighed for at bringe kimtallet ned, men effekten er som regel forbigående, og problemet vil ret hurtigt opstå igen.

I dette projekt belyses en skånsom og miljøvenlig metode til at desinficere vandsystemer og fjerne biofilm uden af omgås krav til drikkevandskvalitet.

## 2. Formål

Formålet med dette projekt var at undersøge effekten af DCW's vandbehandlingsanlæg installeret og anvendt til desinfektion i en fødevarer virksomhed. Projektet skulle parallelt undersøge vandkvalitet i en ny vandinstallation lavet efter nyeste anbefalinger, for at kunne sammenligne vandkvalitet i forskellige vandinstallationer.

Over projektperioden er vandkvalitet i ældre vandinstallationen undersøgt før og efter tilsætning af DCW desinfektion og som reference er undersøgt en helt ny vandstreng uden desinfektion. DCW teknologiens bakteriedræbende effekt er blevet undersøgt ved (1) kvantificering af levende bakterier i vandet (kim), og (2) undersøgelse af den bakterielle biofilm på indersiden af vandstrengene med forskellige mikrobiologiske teknikker..

I perioden hvor der er tilført DCW desinfektion til vandsystemet er niveauet af klor holdt på internationalt niveau for desinfektion af drikkevand. Uheldigvis findes ingen fælles europæisk norm for desinfektionsniveau, men WHO sætter niveau for klorering til området mellem 0,5 til 3 ppm ved doseringspunktet, mens Tyskland sætter grænser for dosering til 0,1 til 0,3 ppm ved tæppestedet. I forsøget her har vi doseret med 0,5 ppm i doseringspunktet, hvilket er lavere end laveste WHO værdi og vil være inden for det tyske område ved tæppestedet. Ved at sætte denne grænse sikres at vandet kan betragtes som drikkevand og dermed kan anvendes til alle formål som man normalt anvender drikkevand til. Ligeledes sikres at vandets kemiske egenskaber ikke ændres, hvorfor der ikke vil være risiko for korrosion eller være andre negative påvirkninger af vand, installationer etc.

### 2.1 Projektindhold

Projektet blev gennemført på 17 måneder og omfatter:

- Udvælgelse af vandstreng til test
- Udvælgelse og afmærkning af 5 tæppesteder til regelmæssig prøvetagning
- Udtagning og analyse af vandprøver med ca. 4 ugers interval
- Installation af ny vandstreng til reference
- Udvælgelse og afmærkning af 2 tæppesteder på nye streng
- Installation og tilslutning af DCW anlæg
- Udtagning af vandrørsstykker til analyse for biofilm; før tilslutning af DCW, samt hhv. 3 og 6 mdr. efter tilslutning af DCW.
- Analyser i laboratoriet for bakterier i vand og biofilm
- Dataanalyse og afrapportering

# 3. Teknologien

Danish Clean Water (DCW) har udviklet udstyr som ud fra en saltvandsopløsning og et elektrisk spændingsfelt danner en desinfektionsvæske, der kan bruges til desinfektion i mange forskellige sammenhænge. Den resulterende væske har pH i et neutralt niveau på 8,3 og bærer DCW handelsnavnet Neuthox. Neuthox laves i en elektrolysecelle, hvor et anode- og et katodekammer er adskilt af en membran. Først føres saltvandsopløsningen igennem katodekammeret i elektrolysecellen, hvorefter det føres videre ind i anodekammeret, hvor den basiske blanding oxideres. Ved denne oxidation bliver der dannet nogle frie radikaler, samt frit klor enten i form af hypoklorit eller hypoklorsyre (Suzuki et al., 2002, J. Agri. Food Chem.). Hypochlorsyren er her det mest effektive desinfektionsmiddel. Blandingen af aktive stoffer i Neuthox er effektiv i forhold til forebyggelse og kontrol af biofilm i rørsystemer, men har ingen toksisk effekt i forhold til mennesker.

DCW generatoren producerer desinfektionsvæsken til en lagertank, hvorfra det ved flowproportional dosering, tilsættes det ønskede system - i dette tilfælde procesvandsledningen. Ved flowproportional tilsætning måles vandgennemstrømningen (vandforbruget) med en flowmåler, hvilket videregives som elektrisk information til en doseringspumpe med indbygget minicomputer. Direkte på pumpen indtastes hvor mange liter Neuthox der skal pumpes ind / m<sup>3</sup> vand hvorved der opnås ensartet og nøjagtig dosering. I forhold til apparatets strømforbrug betyder dosering fra lagertank, at elektrolysen kun behøver at forløbe noget af tiden. Doseringen kan også kontrolleres på baggrund af koncentrationen af aktivt-klor. Dette måles med en ORP (Oxidation Reduktion Potentiale) sensor, der indstilles til et niveau, hvor bakterie- og biofilmvækst fjernes. Denne metode anvendes oftest hvis det er vand i et reservoir eller tank der skal behandles.

I nærværende projekt er doseringen sket flowproportionalt på baggrund af vandforbruget således at der kun tilføres ny desinfektionsvæske til systemet når der tages vand et sted på ledningen.

Desinfektion med Neuthox fremstillet på stedet medfører en bedre og mere effektiv desinfektion sammenlignet med almindeligt kommercielt hypoklorit. Især evnen til at fjerne biofilm adskiller Neuthox fra almindeligt klor og denne egenskab kan så i de enkelte applikationer udnyttes til at opnå desinfektion med lavere klor koncentration, hvilket igen medfører en bedre vandkvalitet og en sikker fjernelse af biofilm, der som oftest er det egentlige problem, når der er problemer med bakterie forurenede vand.

Slutteligt skal nævnes at anvendelse af Neuthox i de koncentrationer, der benyttes til drikkevandsdesinfektion som her, ingen påvirkning har på materialers korrosionsforhold, hvorfor desinfektionen ikke stiller krav til materialer til rørstreng.

# 4. Projektforløb

Projektets omdrejningspunkt og forsøgsfacilitet var produktionshallen hos Dairy Fruits i Odense. Dairy Fruit er Nordeuropas førende leverandør af aseptiske smagstilsætninger og smagsoplevelser til fødevarerindustrien og i produktionen anvendes både vand til produkterne og til rengøring i fabrikken. Til projektet blev udvalgt en vandstreng der forgrener sig rundt i hele produktionen og leder alm kommunalt drikkevand rundt i fabrikken. Under hele projektet blev vand fra den udvalgte vandstreng udelukkende anvendt til rengøringsformål og ikke i produkterne.

I starten af projektet blev der udvalgt 5 tappesteder til prøvetagning fra vandstrengen. I løbet af de første 8 måneder af projektet blev der kortlagt en basis for niveauet af biofilm og kim i vandet ved tappestederne. Ud fra dette niveau blev effekten af behandlingen efterfølgende dokumenteret vha. tilsvarende analyser.

Vandprøver blev udtaget ca. en gang om måneden fra februar 2012 til marts 2013. Prøverne blev undersøgt på Teknologisk Institut ved metoder der generelt benyttes til overvågning af drikkevand: kim<sub>25</sub> og kim<sub>37</sub>, der viser antallet af dyrkbare bakterier på generelle bakterielle dyrkningsmedier ved 25 og 37 grader, samt ved enkelte udtagninger også coliforme og *E.coli*.

På tre tidspunkter i løbet af projektet blev der desuden udtaget rørstykker af vandstrengen før hvert tappested. Rørstykker blev udtaget i hhv. februar 2012 (start- prøve), december 2012 (3 mdr. efter behandlingsstart) og marts 2013 (6 mdr. efter behandlingsstart). Mængden af biofilm i rørene blev undersøgt. Detaljeret beskrivelse af prøvetagning og analyser kan ses under materialer og metoder.

Desinfektion eller udskiftning af vandstrengene er to mulige løsninger på et vedvarende problem med forhøjede kim i vandssystemer. Derfor blev der i løbet af projekt analyseret for bakterier på både vand og biofilm i gamle vandstrengene tilsat Neuthox, samt i en nyetableret vandstreng. Den nye vandstreng blev installeret i juni 2012 parallelt med den gamle streng. Strengen der er 45 m lang er udført i PVC, dog med rustfri stål rør fra hovedstrengen ud til tappestederne.

I september 2012 blev Neuthox anlægget tilsluttet og behandlingen af vandet i forsøgsstrengen igangsat.

# 5. Prøvetagning og analyser

## 5.1 Vandprøver

Vandprøver blev udtaget i 250 ml sterile flasker og bragt eller sendt til laboratoriet ved Teknologisk Institut i Århus. Ved tæppede steder blev slanger afmonteret og der blev åbnet for vandet på fuld kraft i 3 min. Efterfølgende blev dysen sprittet grundigt af og vandet løb igen inden prøven blev udtaget.

Prøverne blev opbevaret på køl indtil analyse som blev igangsat indenfor 24 timer.

Prøverne blev undersøgt for indhold af totalantal aerobe bakterier der kunne gro ved hhv. 25 og 37 grader (Kim 25 og kim 37). Henholdsvis 1 ml og 0,1 ml blev dyrket ved dybdeudsæd på PCA agar (Oxoid CM1012) og inkuberet i 2 og 3 døgn ved 25 og 37 grader, hvorefter kolonierne blev talt.

Ved udvalgte prøvetagninger blev der ligeledes undersøgt for tilstedeværelsen af coliforme bakterier og *E.coli* vha. colilert metoden (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine).

Grænseværdierne for bakterier i drikkevand er (Drikkevandsbekendtgørelsen<sup>1</sup>):

Kim 22 : < 200 cfu/ml

Kim 37: < 20 cfu/ml

Coliforme: <1 cfu/ml

Målinger for frit klor blev foretaget løbende igennem projektet vha. en farvereaktion og efterfølgende fotometrisk måling (Hanna Instruments, C114).

Der er i drikkevandsbekendtgørelsen ikke en grænseværdi for klor. Bekendtgørelsen siger blot: "Indholdet bør være mindst muligt under samtidig overholdelse af de mikrobiologiske krav". WHO sætter niveau for klorering til området mellem 0,5 til 3 ppm ved doseringspunktet, mens Tyskland sætter grænser for dosering til 0,1 til 0,3 ppm ved tæppedet.

## 5.2 Biofilm i rørstykker

Tre gange i løbet af projektet blev der skåret et stykke rør ud ved hvert tæppested.

Efter udtagning af vandprøver blev der lukket for vandet og rørstykker på ca. 20 cm rør blev udtaget. Røret blev straks opskåret i 3 lige store stykker (til triplikat analyser) og lukket i enderne med parafilm. Rørstykkerne blev holdt på køl og bragt til laboratoriet på Teknologisk Institut.

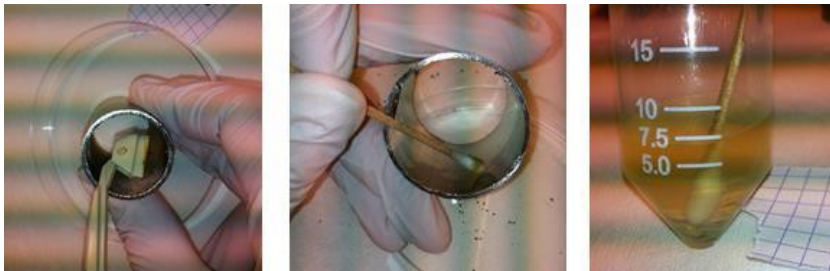


Figur 1 Billeder fra første rørudtagning

Indledningsvist blev mængden af biofilm vurderet visuelt og fotograferet.

Biofilmen i rørene blev dernæst fjernet ved følgende procedure:

Biofilm blev udtaget med 'biofilmskraber' efterfulgt af svab med vatpind. Den udtagne biofilm blev opslæmmet i 10 ml SPO fortyndings væske. Afslutningsvist blev der tilsat glaskugler samt 2 ml SPO til røret og der blev rystet grundigt for at få den sidste biofilm løsnet fra siderne af røret.



Figur 2 sampling af biofilm fra vandrør

Den opslæmmede biofilm blev homogeniseret på vortex mixer, hvorefter der blev dyrket for totalkim på petrifilm (Total Aerobic Count Agar, 3M™) ved 30 grader i to døgn fra en ti-folds-fortyndingsrække. Den resterende væskemængde blev filtreret ned på et 0,22 µm filter (Microsart® filter 250, Sartorius) og opbevaret i fryseren indtil yderligere analyse.

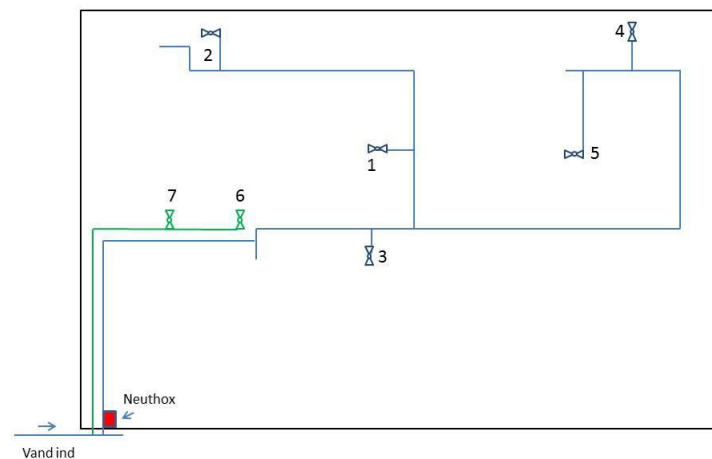
DNA blev ekstraheret fra filtrene vha. et kommercielt kit (Fast Prep DNA spin kit for Soil).

Den totale bakteriemængde i biofilmen blev dernæst ligeledes undersøgt ved kvantitativ real time PCR (qPCR) baseret på et Brilliant II Sybr green QPCR mastermix (Stratagene) med primerne 341F (cct acg gga ggc agc ag) og 907R (ccg tca att ctt ttg agt tt).

Et fingeraftryk af biofilmen ved de tre udtagninger blev undersøgt ved Denaturerende Gradient Gel Elektroforese (DGGE). Gelerne havde en gradient af Urea og formamid (30 – 70%) og en acrylamid koncentration på 8%. De blev kørt natten over ved 100 volt og blev efterfølgende farvet i Sybr gold. Primerne 341f-GC og 907r blev anvendt til DGGE.

# 6. Resultater og diskussion

Der havde tidligere af og til været overskridelser på niveauet af kim i vandprøver fra den udvalgte vandstreng i produktionen. For at have et sammenligneligt udgangsniveau blev der indledningsvis udtaget vandprøver hver måned fra de 5 udvalgte tappesteder (1-5 i Figur 3).



Figur 3 forsimplet diagram over vandstreng og tappesteder. blå = gammel vandstreng, grøn = ny vandstreng.

Efter tilslutning af desinfektionsanlægget blev der jævnligt udtaget prøver til måling for frit aktivt klor (FAK) ved doseringssted og tappesteder. Generelt blev målt værdier på 0,08 til 0,24 ppm frit aktiv klor i hele den første del af forløbet. De højeste måleresultater (vist i Tabel 1) fremkom i slutningen af projektperioden. Dette viser, at der efterhånden som biofilmen bliver reduceret i rørene, er en højere andel af den tilførte dosis, der når ud til tappestederne.

Prøvested	Vandstreng	Frit klor 21.02.13
1	Gammel	0,56 ppm
2	Gammel	0,31 ppm
3	Gammel	0,47 ppm
4	Gammel	0,24 ppm

Tabel 1 målinger af FAK ved tappestederne efter 5 mrd Neuthox.

## 6.1 Vandprøver

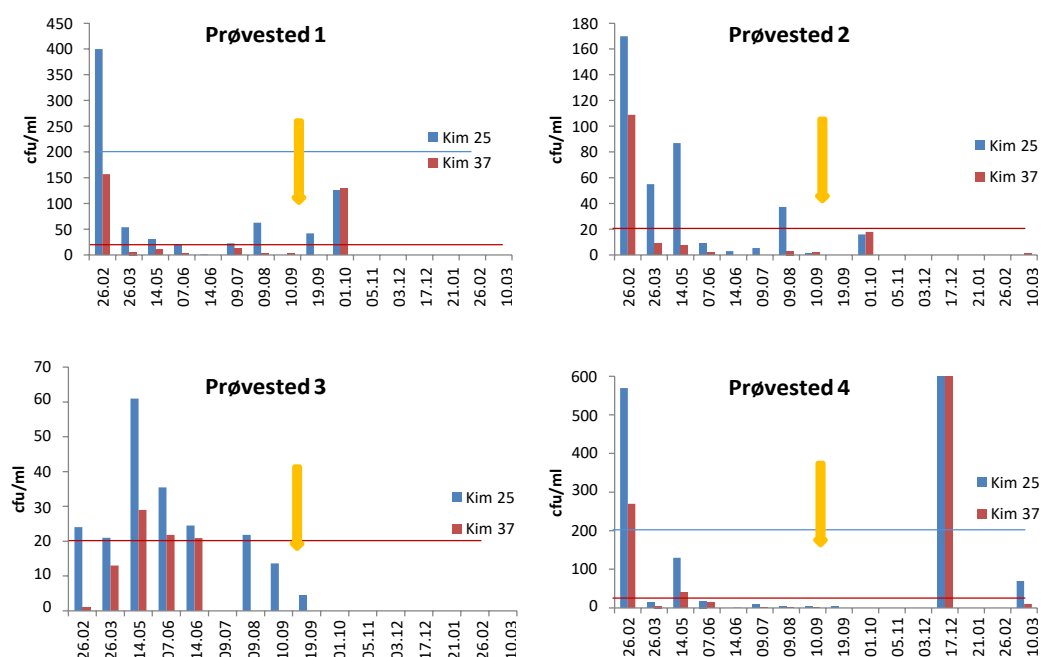
Resultaterne fra kimtals-analyserne viste sig at variere fra gang til gang inden Neuthox anlægget blev tilsluttet. Der var flere overskridelser i forhold til drikkevandskravene, spredt ud over de forskellige tappesteder.

De samlede resultater fra tællingerne kan ses i bilag 1. Derudover er der i Figur 4 vist et overblik over resultaterne fra prøvested 1-4. Tappedet 5 er udeladt da det blev nedlagt kort efter Neuthox-tilslutning. Som det fremgår indeholdt prøverne langt flere kim ved projektets start end efter indførelse af Neuthox behandling. Før tilsætningen af Neuthox sås flere overskridelser af grænseværdierne for kim-tal, mens niveauet af kim var så lavt at det i flere prøver ikke kunne detekteres ca. en måned efter tilslutning af teknologien.

Prøvested 4 er dog en undtagelse. Specielt d. 17.12.12 ses et meget højt niveau af kim i vandet herfra. Vandet fra prøven var dog varmt, hvilket tyder på at vandet i vandstrengen passerer en varmekilde, der specielt ved stilstand henover weekenden, opvarmer vandet til temperaturer der er favorable for bakteriel vækst. Ved nærmere undersøgelse viste det sig, at tappedet ikke havde været brugt i flere dage og vandet blev ikke kølet, trods det vi lod det løbe nogle minutter før prøvetagningen. De høje værdier genfindes dog ikke i andre prøver, og prøven anses derfor ikke som værende repræsentativ.

Ovenstående eksempel viser at længere tids stillestående vand i vandstrengene kan give ophav til forøget bakterieindhold – et faktum man skal være opmærksom på når produktionen startes op efter nogle dages stilstand.

Doseringen fra DCW systemet har i dette tilfælde været flowproportionalt, hvilket bevirker at der i tilfælde uden nogen former for forbrug ikke tilsættes ny Neuthox, hvorfor systemets effekt på bakterieniveauet derfor er begrænset ude ved det pågældende endetappedet. Et skift i doseringsstrategi, så et konstant niveau af Neuthox opretholdes vha. ORP-styret dosering vil være en mulig løsning. Denne løsning kræver dog at klorid-niveauet overvåges i vandstrengen for at undgå ophobning af klorid-koncentrationer i korroderende koncentrationer.



Figur 4 kim25 og kim37 i vandprøverne fra tappedet 1-4. Neuthox blev tilsat fra d. 11. september (orange pil). Bemærk forskellig y-akse. den røde linje indikerer grænseværdien for kim 37 på 20 cfu/ml og den blå linje grænseværdien på 200 cfu/ml for kim 25.

## 6.2 Biofilm

Biofilmen i rørene blev i første omgang vurderet visuelt og dernæst kvantificeret ved dyrkning.



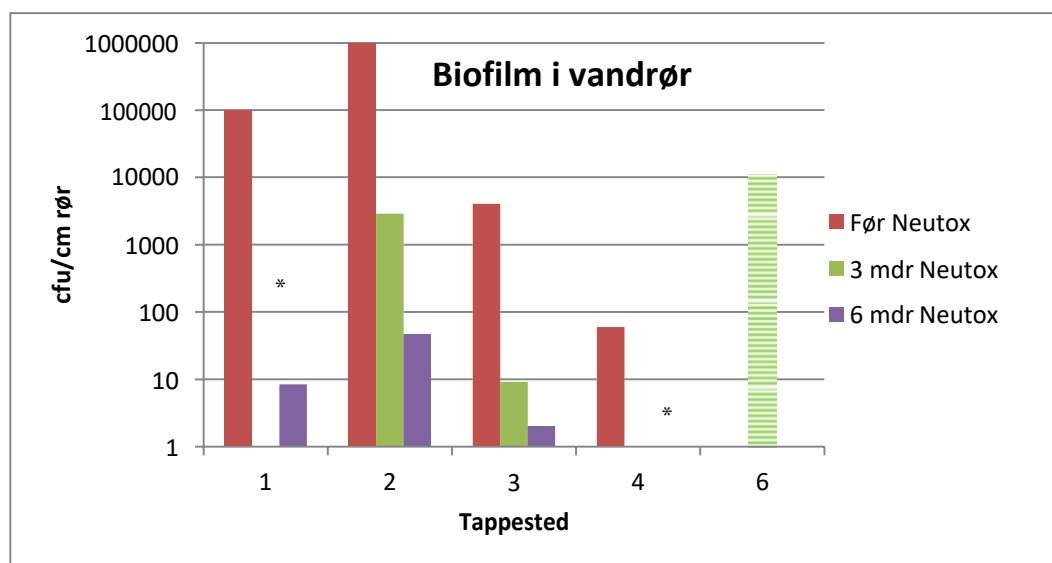
Ved første prøvetagning var der tydelig biofilm i rørstykkerne udtaget fra tæppested 1, 2, 3 og 5. Røret ved tæppested 4 havde ingen tydelig biofilm, men der sås spor af organisk materiale på svaberpinden. Den mindre biofilm ved dette tæppested hang sammen med at vandstrengen her var af nyere dato end de andre.

Eksempler på rør ved første prøvetagning kan ses i Figur 5.



Figur 5 rør under første prøvetagning

Ved de to efterfølgende rørdtagninger var der tydeligt sket en reduktion af biofilmen i rørene. Allerede efter 3 måneder var det ikke muligt at detektere en biofilm med det blotte øje. Der sås dog stadig en farvning af svaberpinden ved skrab og svabring. I Figur 6 ses udviklingen i biofilmen ved de forskellige tæppesteder (cfu/cm) fra starten af projektet, samt ved hhv. 3 og 6 måneder efter tilslutning af anlægget.



Figur 6 Dyrkbare aerobe kim i vandrør ved tæppestederne på tre forskellige tidspunkter: feb2012: 0-prøve før Neutrox (rød); dec2012: efter 3 mdr. Neutrox (grøn); mar2013: efter 6 mdr. Neutrox (blå). \*Ingen prøvetagning ved tæppested 1 i dec2012 samt tæppested 4 mar2013. Prøve 6 er cfu i et rørstykke fra den nye vandstreng udtaget dec2012 (ingen Neutrox).

Som det fremgår af figuren var der et forskelligt udgangspunkt i forhold til mængden af biofilm i rørene ved de forskellige tæppesteder. Dyrkbare bakterier svingede fra 60 (prøve 4) til 1 mio cfu/cm (prøve 2). Igen hang dette fint sammen med at prøvested 4 var et forholdsvis nyt tæppested.

Tilslutning af Neuthox medførte en reduktion af biofilmen på indersiden af vandrørene. På 3 måneder blev antallet af dyrkbare bakterier på indersiden af rørene reduceret med 2-3 logenheder i forhold til udgangspunktet, og 6 måneder efter tilslutning af anlægget var antallet reduceret med mere end 4 logenheder eller 99,99%.

Ved tappested 4 var biofilmen helt væk efter 3 mdr.

Til sammenligning blev kim og biofilm i en nyetableret vandstreng undersøgt. Ved de første tre prøvetagninger efter ibrugtagning var der forhøjede kim<sup>37</sup> i vandet (Tabel 2). Det ses ofte ved ibrugtagning af nye rør, at der er høje kimtal i starten, hvor en biofilm er ved at etablere sig. Efter de første tre måneder blev niveauet af kim i vandet fra den nye streng dog lavere og var under grænseværdierne ved hver prøvetagning. Som det fremgår af Figur 6 var der allerede efter 6 måneder etableret en biofilm i det nye rør, der var tykkere og indeholdt flere kim end biofilmen ved både tappested 3 og 4 ved udgangspunktet

	kim 25		kim 37	
Dage i brug	6	7	6	7
4	151	eb	188	eb
29	161	eb	263	eb
59	>2000	eb	31	eb
90	25	eb	5	eb
99	17	32	0	0
111	5	2	6	2
146	9	135	2	5
173	0	0	0	0
187	2	2	0	0
221	5	71	3	0
257	6	1	0	0
269	37	16	5	0

Tabel 2 Kimtal i vandprøver fra tappested 6 og 7 på den nye vandstreng i tiden efter ibrugtagning. Overskridelser markeret med gult. Eb =ej bestemt.

### 6.3 DNA baserede analyser

De molekylære resultater understøtter de dyrkningsbaserede analyser i at biofilmen reduceres ved behandlingen. Resultaterne kan ses i bilag 2 (qPCR) og bilag 3 (DGGE).

qPCR analyserne, der kvantificerer bakterierne ud fra DNA til stede i prøven, viser som dyrkningsresultaterne et fald i bakteriemængden i rørene efter tilsætning af Neuthox. Det yderligere fald fra 3 til 6 måneder kan dog ikke påvises med denne metode. Denne forskel mellem dyrkning og de molekylære metoder kan bl.a. skyldes at de molekylære metoder kvantificerer DNA fra både levende og døde bakterier, samt fra bakterier der ikke kan vokse på almindelige vækstmedier. Således resulterer qPCR helt forventeligt noget højere værdier end man finder ved dyrkning af kim.

Resultaterne fra fingerprint analyserne af biofilmprøverne (DGGE) i bilag 3 viser, at behandling med desinfektionsanlægget, også ændrer sammensætningen af den bakterielle flora der findes på indersiden af vandrørene. Fra udtaget inden tilsætningen af Neuthox, ses mange bånd på gelen, hvilket tyder på et diversst bakteriesamfund i biofilmen. Efter behandling med Neuthox ses meget færre bånd på gelen, hvilket tyder på at der er færre forskellige bakterier til stede - der er dog stadig tale om et polymikrobielt samfund (dvs. med flere bakteriearter tilstede). Især i prøverne fra

prøvested 3 og 4 synes en bakteriestamme, som ikke tidligere var detekterbar, nu at dominere biofilmen (et tydeligt bånd på gelen).

Resultaterne fra projektet viser at vandbehandling med Neuthox-teknologien kan nedbringe antallet af dyrkbare bakterier (kim) i vandet samt effektivt reducere mængden af biofilm på indersiden af vandrørene. Teknologien repræsenterer derfor en mulig løsning til at forebygge tilførsel af potentielt patogene mikroorganismer (f.eks. af fækal oprindelse) til producerede fødevarer igennem brug af kontamineret vand, samt minimering af den bakterielle vækst, der må antages at være til stede i alle danske produktionssystemer, hvor der bruges ubehandlet ledningsvand.

# Referencer

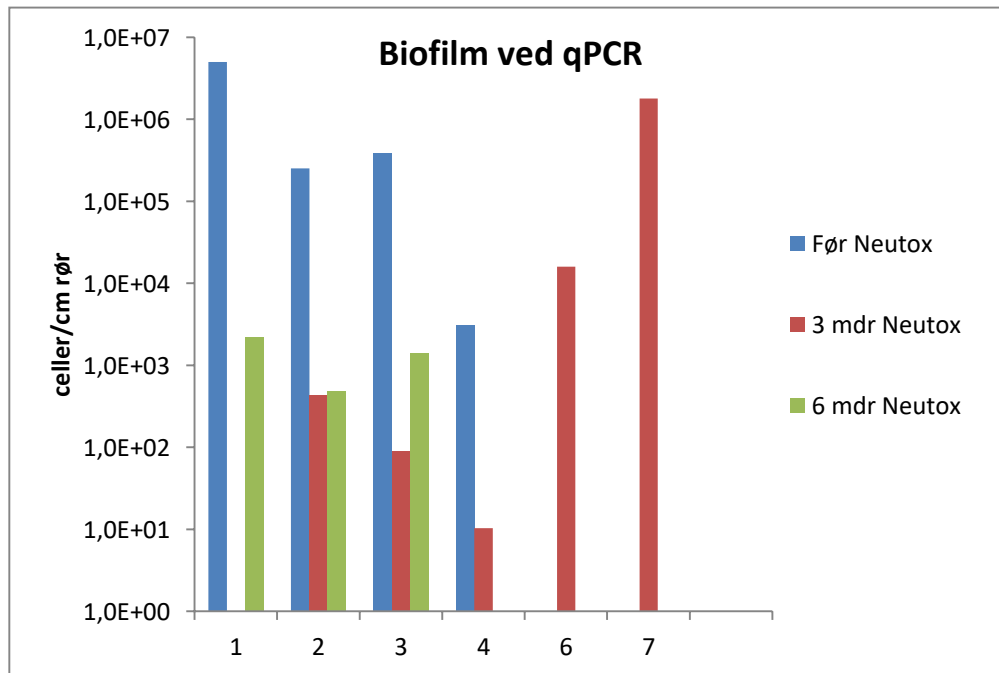
- 1) Drikkevandsbekendtgørelsen (BEK nr. 1024 af 31/10/2011) bilag 1a og 1d
- 2) Rørcenter-anvisning 017, Teknologisk Institut, april 2012
- 3) Suzuki et al.:” Decontamination of Aflatoxin-Forming Fungus and Elimination of Aflatoxin Mutagenicity with Electrolyzed NaCl Anode Solution”, 2002, . *Agric. Food Chem.*, **2002**, 50 (3), pp 633–641

**Bilag 1: Kim tællinger i vandprøver**

kim 25		Tappedsted				
Prøvetagning	Dag efter Neuthox	1	2	3	4	5
26.02		400	170	24	570	96
26.03		54	55	21	13	1795
14.05		29	87	61	130	470
07.06		20	9	35	18	72
14.06		1	3	25	0	5
09.07		23	5	0	8	183
09.08		63	37	22	4	54
10.09	-1	0	1	14	4	2
19.09	8	42	0	5	3	98
01.10	20	126	16	0	eb	eb
05.11	55	0	0	0	0	0
03.12	82	0	0	0	0	
17.12	96	eb	0	0	1190	
21.01	130	0	0	0	0	
26.02	166	0	0	0	0	
10.03	178	0	0	0	70	
kim 37		Tappedsted				
Prøvetagning	Dag efter Neuthox	1	2	3	4	5
26.02		157	109	1	270	20
26.03		5,5	9	13	4,5	442
14.05		11	7	29	40	13
07.06		2	2	22	13	48
14.06		0	0	21	1	4
09.07		12	0	0	2	27
09.08		3	3	0	1	15
10.09	-1	2	2	0	1	0
19.09	8	0	0	0	0	0
01.10	20	129	18	0	eb	eb
05.11	55	0	0	0	0	0
03.12	82	0	0	0	0	
17.12	96	eb	0	0	2240	
21.01	130	0	0	0	0	
26.02	166	0	0	0	0	
10.03	178	0	1	0	10	

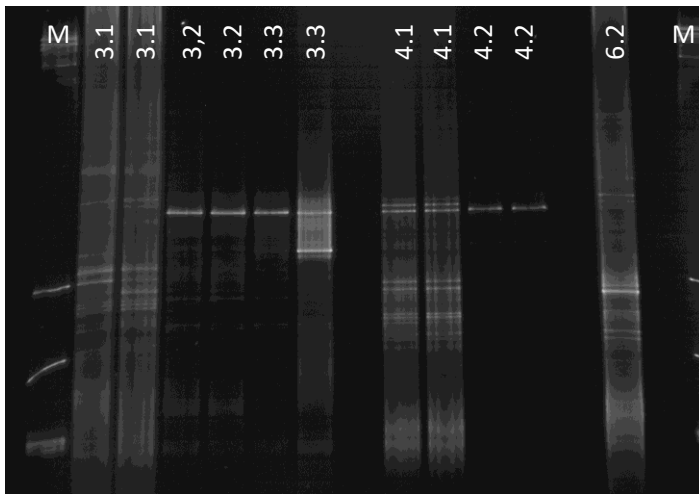
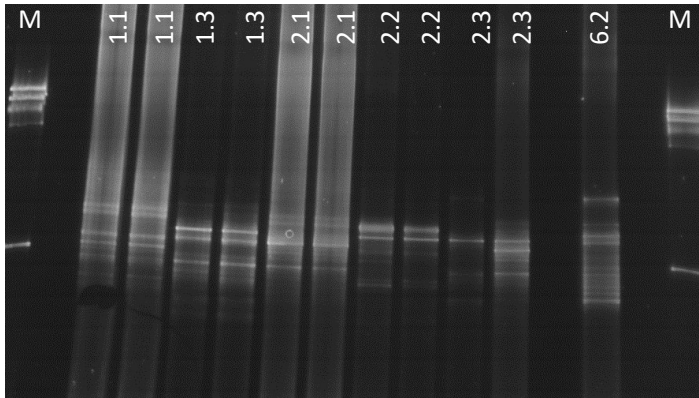
Resultaterne af henholdsvis kim 25 og kim 37 i vandprøver udtaget ved de 5 tappedsteder i løbet af projektet. Neuthox tilsluttet 11.09 (rød pil) Gul markering = prøver med overskridelser. Eb = ej bestemt.

## Bilag 2: qPCR på biofilmprøver



Resultaterne af 16SrRNA qPCR for total bakterier i biofilmen fra tapsted 1-4 samt 6 og 7.

**Bilag 3: DGGE**



DGGE fingeraftryk på Biofilmprøver fra rør ved tappested 1-4. prøve 1.1 = prøvested 1, prøvetagning 1; 1,3 = prøvested 1, prøvetagning 3 osv. M = markør.



Miljøministeriet  
Miljøstyrelsen







## Mikrobiologisk Sikkert Procesvand



Miljøministeriet  
Miljøstyrelsen

Strandgade 29  
DK - 1401 København K  
Tlf.: (+45) 72 54 40 00

[www.mst.dk](http://www.mst.dk)