

MILJØSTYRELSEN

Hygiejnisk-kemisk/6. kontor

MILJØSTYRELSENS 3. MIKROBIOLOGISKE INTERKALIBRERING

Vandundersøgelse

Bestemmelse af kimal og fluorescerende kim ved 21°C i King's agar B

Inter=DS=2252

Juni 1985

MILJØSTYRELSEN  
BIBLIOTEKET  
Strandgade 29  
1401 København K

INDHOLDSFORTEGNELSE:

	SIDE
0. RESUMÉ .....	1
1. INDLEDNING .....	2
2. GENNEMFØRELSE AF INTER =DS= 2252 .....	3
3. RESULTATER .....	5
3.1. Substrat og fluorescensforhold .....	6
3.2. Beregningsfejl .....	8
3.3. Resultater af bestemmelse af 21 <sup>o</sup> -kimtæl og fluorescerende kim .....	9
4. KONKLUSIONER .....	11
5. STATISTISKE BEREGNINGER .....	12
5.1. Isolering af outliers.....	12
5.2. Middelværdi og standardafvigelse .....	14
5.3. Repeterbarhed og reproducerbarhed .....	16
5.4. Valg af plader til kimtælling .....	18
6. REFERENCER .....	20
Bilagsfortegnelse .....	21

0. RESUME.

Parameteren kimal og fluorescerende kim ved 21°C indgår i lovkravet til drikkevandskvalitet og parameteren kræves officielt analyseret efter =DS= 2252.

I marts måned 1985 gennemførtes en interkalibrering (Inter =DS= 2252) af 7 simulerede recipientprøver, efter forskriften i =DS= 2252.

3 af prøverne indeholdt 2 forskellige fluorescerende teststammer i renkultur, og de øvrige 4 prøver indeholdt på 2 niveauer desuden få procent ikke fluorescerende kim.

I interkalibreringen deltog 50 laboratorier.

Interkalibreringen viste, at ved dybdekultivering i King's agar B genfindes 10 - 25 % af det faktiske indhold af fluorescenter, hvilket sætter spørgsmålstegn ved metoden.

Med få undtagelser genfandt laboratorierne det totale kimindhold ved 21°C.

En opfølgende besøgsrunde til laboratorier med afvigende resultater vil være et vigtigt led i laboratoriekontrollen, ligesom en forbedring af metoden samt substrat bør søges gennemført.

1. INDLEDNING.

Kimtallet ved 21°C og fluorescerende kim indgår som parameter i Miljøministeriets lovkrav til drikkevandskvaliteten, med fastsatte grænseværdier, henholdsvis 200 pr. ml og 5 pr. ml.

Det officielle krav til analysemetode ved bestemmelse af såvel 21°-kimal som fluorescerende kim er p.t. =DS= 2252. Metoden foreskriver at analysen skal gennemføres ved brug af dybdekultivering i King's agar B, og metoden anvendes til undersøgelse af såvel drikkevand som recipientvand.

Med det formål at foretage en landsdækkende laboratoriekontrol, at foretage en metodevurdering samt en bedømmelse af forskellige dyrkningssubstrater, blev det besluttet, at gennemføre en interkalibrering af parameteren: Kimal og fluorescerende kim ved 21°C i King's agar B.

## 2. GENNEMFØRELSE AF INTER =DS= 2252.

Interkalibrering af kimtallet og fluorescerende kim ved 21°C i King's agar B, Inter =DS= 2252, blev gennemført i uge 12, 1985.

Interkalibreringen var varslet med udsendelse af vejledning og rapporteringsskemaer i uge 10, jfr. bilag 9, side 36 . Ved samme lejlighed fremsendtes til alle deltagerne ca. 40 gram King's agar B tørsubstrat, der var fremstillet kommercielt.

Laboratorierne var hermed orienteret om at man ville modtage 7 simulerede recipientprøver, fremsendt i køleboks, den 18. marts, og at undersøgelsen af prøverne skulle gennemføres parallelt i det tilsendte substrat og i laboratoriernes eget efter =DS= 2252.

Princippet for fremstilling af testprøver, anvendt ved interkalibreringerne i 1984, blev også anvendt ved fremstilling af testprøver til denne interkalibrering.

Da transportmediets indhold af borsyre forhindrer aflæsning af O-pladen, måtte prøverne fremstilles med et kimindhold  $> 200/\text{ml}$ . Kimniveauerne blev derudover fastlagt svarende til niveauet i en lettere forurenede recipient eller svarende til niveauet i forurenede brøndvand. De enkelte niveauer blev ikke meddelt laboratorierne direkte, derimod blev der givet en generel orientering om det nødvendige antal fortyndinger.

Som teststammer indgik 3 kulturer (verificeret på Statens Seruminstitut):

- nr. 5 = *Aeromonas hydrophila*
- nr. 8 = *Pseudomonas putida*
- nr. 2030 = *Pseudomonas fluorescens*.

Koden for prøvernes identitet blev:

Prøve 1 = prøve 5

Prøve 2 = prøve 7

Prøve 4 = prøve 6

Prøve 3 var uparret.

Det teoretiske kimindhold i prøverne fremgår af tabel 3, bilag 5.

Med henblik på at få en forhåndsbedømmelse af homogeniteten i de udsendte testprøver, blev der i lighed med de tidligere interkalibreringer gennemført talrige "prøveafpippeteringer" og foretaget kintalsbestemmelser.

I bilag 6, side 33, vises 2 eksempler der vedrører nr. 8 og nr. 2030, bemærk at antal fluorescerende i parentes udgør < 25 % af to-taltællingen.

I interkalibreringen deltog 38 levnedsmiddelkontrolenheder, 6 S.T.P. autoriserede laboratorier og 6 laboratorier med særlige funktioner, jfr. bilag 8 .

### 3. RESULTATER.

Fristen for indsendelse af interkalibreringsresultater var fastsat til 29. marts, men grundet uregelmæssig postbefordring i den efterfølgende 2 - 3 ugers periode, indkom det sidste resultatsæt den 16. april. Først da kunne den egentlige resultatvurdering og behandling påbegyndes.

I forbindelse med gennemgang af de indsendte interkalibreringsresultater, konstateredes primært følgende forhold:

- at laboratorium 26 indsendte blanke rapporteringsskemaer, begrundet med termostatsvigt,
- at laboratorium 3 og 12 rapporterede enkeltresultater (enkeltspredning), laboratorium 3 anførte at dette er daglig rutine,
- at laboratorium 31 mangler resultater vedrørende prøve 1, begrundet med at prøveglas var i stykker,
- at laboratorium 49 ikke udregnede resultater for prøve 4 og 5 i tilsendt substrat. Laboratoriet meddeler, at der har været problemer med kondensvand.

Endelig skal bemærkes, at 2 laboratorier forlods havde meddelt, at de ikke kunne deltage i interkalibreringen grundet laboratorieombygning.

Samtlige laboratorieresultater (rådata) blev herefter oversigtsmæssigt samlet i 2 tabeller, der umiddelbart efter udsendtes til deltagerne som en førsteorientering. Dette skete den 24. april.

Ved sammenligning mellem opgivne tællerresultater og anførte kimtal konstateredes en række direkte regnefejl samt at man anvender diverse "kringlede" udregningsmetoder når kimtalsresultatet beregnes. Forholdene belyses i detaljer i afsnit 3.2.

### 3.1. SUBSTRAT OG FLUORESCENSFORHOLD.

I lighed med situationen ved interkalibreringen af 37° kimtal og coliforme - termotolerante kim, besluttede styringsgruppen, at der skulle udsendes et fælles King's agar B substrat i forbindelse med interkalibrering af 21°-kimtal og fluorescerende kim.

Indledende undersøgelser havde vist, at der var stor forskel i fluorescensudvikling i forskellige King's agar B substrater. Disse iagttagelser blev foretaget ved parallel dyrkninger i kommercielle substrater samt Odense-laboratoriet's eget fremstillede. Endvidere var det konstateret, at fluorescens, der skyldes dannelse af fluorescin, kun erkendes omkring de overfladeliggende kolonier, jfr. artikel i Dansk Veterinærtidsskrift nr. 14, under redigering.

En forhånds kontakt til nogle laboratorier havde givet indtryk af, at netop Merck-fabrikatet var meget anvendt. Da det viste sig, at fabrikatet havde rimelige stabile egenskaber, d.v.s. også med hensyn til forholdsvis svag fluorescensudvikling, blev det besluttet at udsende substratet af dette fabrikat som fælles substrat. Grundet resultaterne af de sammenlignende undersøgelser måtte man forvente stor variation i resultaterne vedrørende fluorescerende kim.

Af tabel 4, bilag 5, side 32, fremgår at 56 % af laboratorierne anvendte Merck som eget substrat, at 18 % anvendte Gibco og at 18 %



selv fremstillede eget substrat. 8 % anførte, at de anvendte et Struers-produkt.

Af oversigten, bilag 4, side 31, fremgår at 20 laboratorier indsendte kommentarer til fluorescensforholdene. Oftest bemærkedes at fluorescens i tilsendt substrat var ringere end i eget.

- Halvdelen af laboratorier, der anvender Gibco og egen fremstilling af King's agar har bemærket, at fluorescens i det tilsendte substrat var ringe udviklet.
- 4 laboratorier har særligt bemærket, at fluorescens ikke udvikles omkring dybdeliggende kolonier.
- 2 laboratorier har ikke påvist fluorescerende kim i én eller flere prøver ved analyse i tilsendt substrat.
- Laboratorium 39 påviser kun fluorescerende kim i prøve 3 i begge substrater og laboratorium 50 påviser overhovedet ikke fluorescerende kim.

### 3.2 BEREGNINGSFEJL

I bilag 10 er gennemgået, hvilke regler der bør bruges ved beregning af kimtalsresultater ud fra pladespredningsmetoden. I visse af specialtilfældene (se bilag 10, pkt. B) har der ikke for laboratorierne været tilgængelige regler vedr. valg af relevante plader; i sådanne tilfælde er afvigende resultater, hvor det var muligt, blot rettet ind efter omstående regler uden yderligere bemærkninger.

Herudover bør dog nævnes tre typer afvigende resultater, der - i relation til DS 2252 eller almindeligt anerkendte beregningsregler - må betegnes som beregningsfejl:

- Tælling på "forkerte" plader: DS 2252 foreskriver, at tælling så vidt muligt bør foretages på plader med  $> 20$  og  $< 200$  kolonier. 15 laboratorier anvendte kolonital fra plader med  $> 200$  kolonier, selv om det var muligt fra plader med mindre udsædsmængde at opnå tal fra plader med  $> 20$  kolonier. (Lab. 5, 14, 19, 24, 27, 29, 33, 36, 37, 39, 43, 45, 46, 48 og 49). Se i øvrigt afsnit 5.4 vedr. forskel i resultat ved tælling på forskellige plader.
- Forkert gennemsnitsberegning ved anvendelse af kolonital fra plader med forskellig udsædsmængde: 5 laboratorier, der i specielle tilfælde har villet medtage mere end de normale 2 kolonital til det endelige gennemsnit, har ikke beregnet dette på den korrekte måde (Lab. 16, 19, 41, 49, 50). Den korrekte gennemsnitberegning fremkommer ved "Summen af kolonital på relevante plader divideret med udsædsmængden på disse plader".
- Regnefejl: konstateredes hos 7 laboratorier ved uoverensstemmelse mellem anførte tællerresultater og opgivne kimal. (Lab. 29, 33, 35, 36, 42, 48, 49).

Hvor det har været muligt, er de ovennævnte afvigende resultater blevet rettet, inden statistisk behandling, men det bør nævnes, at det i nogle tilfælde har været næsten umuligt at afgøre, hvorvidt et resultat indeholdt almindelige regnefejl eller skyldtes forkerte beregningsregler.

Generelt må det konkluderes, at der på dette område bør forefindes ensartede beregningsregler, således at forskelle i beregningsmåder ikke bidrager til den almindelige variation mellem forskellige laboratorier. Bilag 10 skal betragtes som Miljøstyrelsens udkast til sådanne regler, hvorfor kommentarer hertil i høj grad er velkomne.

### 3.3. RESULTATER AF BESTEMMELSE AF 21°C-KIM OG FLUORESCERENDE KIM.

De anvendte data, der indgår i de egentlige statistiske beregninger er i oversigtsform præsenteret i bilag 1 og 2, side 22 og 23. Disse data er korrigeret for regnefejl m.v., jfr. 3.2.

Den statistiske behandling af resultaterne er gennemført efter DS/ISO 5725. Heri foreskrives, at der indledes med en outlier-test i form af Cochrans maximum varianstest, idet laboratorier med outlier-resultater skal udskydes, inden beregning af repe-terbarhed og reproducerbarhed gennemføres, jfr. 5.

En samlet oversigt over outliers og stragglers ved bestemmelse af 21°-kimal og fluorescerende kim i de 3 ens prøvepar i såvel eget som tilsendt substrat er samlet i tabel 1, side 13 .

Laboratorium 50 viser sig som outlier i såvel prøvepar 1-5 og 4-6, mens laboratorium 31 viser sig som outlier i prøvepar 2-7. Endvidere fremkommer laboratorium 31 og 50 med et stragglersresultat.

Laboratorium 50 og 31 udskydes derfor helt af beregningsmaterialet. Det samme gælder laboratorium 49, der ikke har angivet resultater for 2 af prøverne, hvor de opgivne tællerresultater iøvrigt ser meget afvigende ud.

Efter denne sortering resterer altså fuldt datasæt fra 46 laboratorier og det er på baggrund af disse resultater at beregning af midelværdi, standardafvigelser, repeterbarhed og reproducerbarhed er foretaget. Disse beregningsresultater er vist i tabel 2, side 17.

Interkalibreringens resultater bekræftede iagttagelserne om at dybdekultivering reducerer det faktiske indhold af fluorescenter væsentligt.

Det blev endvidere klart at fluorescensen udvikler sig forskelligt i de forskellige King's agar B substrater.

Det skal repeteres at prøvepar 4-6 indeholdt nr. 2030 i renkultur og prøve 3 indeholdt nr. 8 i renkultur. Sammenholdes middelværdierne for 21<sup>o</sup>-kimtallene i prøvepar 4-6 med middelværdi for fluorescerende kim i samme prøvepar, genfindes gennemsnitligt 10 % af de fluorescerende kim, jfr. iøvrigt figur 1. For prøve 3 genfindes ca. 25 % af de fluorescerende kim.

#### 4. KONKLUSIONER.

##### Vedrørende metode:

- Interkalibreringen af fluorescerende kim har vist, at metoden =DS= 2252, der foreskriver dybdekultivering i King's agar B, kun afslører 10 - 25 % af det faktiske indhold, fordi fluorescens kun udvikles omkring overfladekolonier.

##### Vedrørende substrat:

- Kvaliteten af kommercielle King's agar B substrater er meget varierende. Forholdet er især af betydning for tælling af fluorescerende kim.
- Sammenlignes de beregnede værdier af standardafvigelse, repeterbarhed og reproducerbarhed for 21°-kimtallet med værdierne for fluorescerende kim, findes værdierne for sidstnævnte parameter væsentlig højere. Dette må især tilskrives de varierende betingelser for fluorescensudvikling.

##### Vedrørende laboratoriefunktion:

- Beregningsfejl har haft indflydelse på flere laboratoriers interkalibreringsresultater. Med få undtagelser genfinder laboratorierne indholdet af 21°C-kim ved totaltællingerne.
- Spredningen i laboratoriernes resultater for 21°C-kim udgør generelt 1,5-2 x den for metoden angivne teoretiske spredning, hvilket stemmer overens med internationale angivelser. Spredningen for fluorescerende kim er dog betydeligt større.
- Det er af betydning for korrekt resultat, at tællingen foretages på plader med mere end 20 og mindre end 200 kolonier.

## 5 STATISTISK BEHANDLING

Den statistiske behandling af resultaterne er gennemført efter DS/ISO 5725.

Da logaritme-transformering viste sig ikke at medføre forbedring med hensyn til normal fordeling af kimtallene, er beregningerne generelt udført uden logaritmering.

### 5.1 Isolering af outliers

Indledningsvis er der foretaget en Cochrans maksimum varianstest for at udelukke laboratorier, der har en varians for ens prøvepar, der er signifikant forskellig fra (= større end) de øvrige laboratoriers varians for tilsvarende prøvepar. Er forskellen signifikant på 1% niveau, svarende til mindre end 1% sandsynlighed<sup>2</sup> for, at forskellen er tilfældig, karakteriseres laboratoriet som en outlier (= "en, der befinder sig helt uden for hovedgruppen"), mens laboratoriet er en straggler (= "en, der skiller sig ud fra hovedgruppen"), hvis forskellen blot er signifikant på 5% niveau. Grunden til, at man vil udelukke outliers før videre bearbejdning er naturligvis, at middelværdi, standardafvigelse o.s.v. bør beregnes uden at medtage resultater fra laboratorier, der falder helt ved siden af.

En oversigt over outliers og stragglers er samlet i Tabel 1. På grund af de i afsnit 3.1 omtalte problemer vedr. tællinger af fluorescerende kim, er kun resultater vedr. 21<sup>o</sup> kim benyttet ved udelukkelse af outliers før videre statistisk bearbejdning. Laboratorium 50 og 31 udskydes således helt af beregningsmaterialet på grund af outlier status, mens laboratorium 49 udskydes på grund af manglende resultater for to af prøverne.

Tabel 1. COCHRANS - OUTLIERTEST

Kim ved 21°C

-----

Prøvepar	1 - 5		2 - 7		4 - 6	
Substrat	eget	sendt	eget	sendt	eget	sendt
Outlier Lab.nr.	50	50	31	-	50	50
Straggler Lab.nr.	-	-	-	50, 31	-	-

Fluorescerende kim ved 21°C

-----

?

Prøvepar	1 - 5		2 - 7		4 - 6	
Substrat	eget	sendt	eget	sendt	eget	sendt
Outlier Lab.nr.	-	-	-	-	-	29, 25
Straggler Lab.nr.	-	-	-	33, 6 19, 48	-	-

## 5.2 Middelværdi og standardafvigelse

Herefter resterer fuldt datasæt fra 46 laboratorier. Disse data, korrigeret for evt. beregningsfejl (afsnit 3.2), er præsenteret i bilag 1 og 2, hvoraf også middelværdi og standardafvigelse fremgår.

Som en slags illustration af, hvorledes disse standardafvigelser svarer til det bedst opnåelige ved den anvendte metode, er der i bilag 3 illustreret middelværdi (mv) og teoretisk og reel standardafvigelse for  $21^{\circ}$  kimtal fra prøve 1 og 5 i eget substrat. Disse prøver var jo i princippet ens ved udsendelsen. Det ses, at mv er ca. 280 og  $2 \times$  standardafvigelsen ( $2s$  reel) er ca. 140, d.v.s. standardafvigelsen er ca. 70, hvilket svarer ganske godt til værdierne for de enkelte prøver angivet i bilag 1; det ses også, at ca. 95% af de målte værdier ligger inden for  $mv \pm 2s$  reel, hvilket jo er i god overensstemmelse med de statistiske regler. Herudover er også  $2s$  teori angivet på figuren:  $s$  teori er den teoretiske standardafvigelse svarende til, at en enkelt laborant havde udført alle 92 analyser inden for et kortere tidsrum og uden anden usikkerhed end den, der er forudsagt af teorien om Poisson-fordeling af kimtal.

Efter Poisson-teorien er:

variens = det gennemsnitlige antal talte kolonier pr. analyse;

i prøve 1 og 5 er  $mv = 280$  kim/ml svarende til, at der på to plader (i -1. fortyndingen) er talt ialt **56 kolonier**, variansen burde altså her teoretisk være 56 og

standardafvigelsen =  $\sqrt{\text{variens}} = \sqrt{56} = \underline{7,5}$ .

Da de 56 kolonier er opnået ved tælling af kim i ialt 0,2 ml prøve, opnår vi mv udtrykt som kim/ml ved at dividere med 0,2, hvilket svarer til at gange med en faktor 5. Derfor  $mv = 5 \times 56 = 280$  og da standardafvigelsen vokser med den samme faktor, bliver  $s = 5 \times 7,5 = \underline{37,5}$ , hvilket giver  $2s = \underline{75}$ . Disse  $\pm 2s$  teori er som nævnt også angivet på figuren. Det ses altså, at den reelle standardafvigelse er næsten dobbelt så stor som den af teorien forudsagte. (For mulige forklaringer, se "Repeterbarhed og Reproducerbarhed").



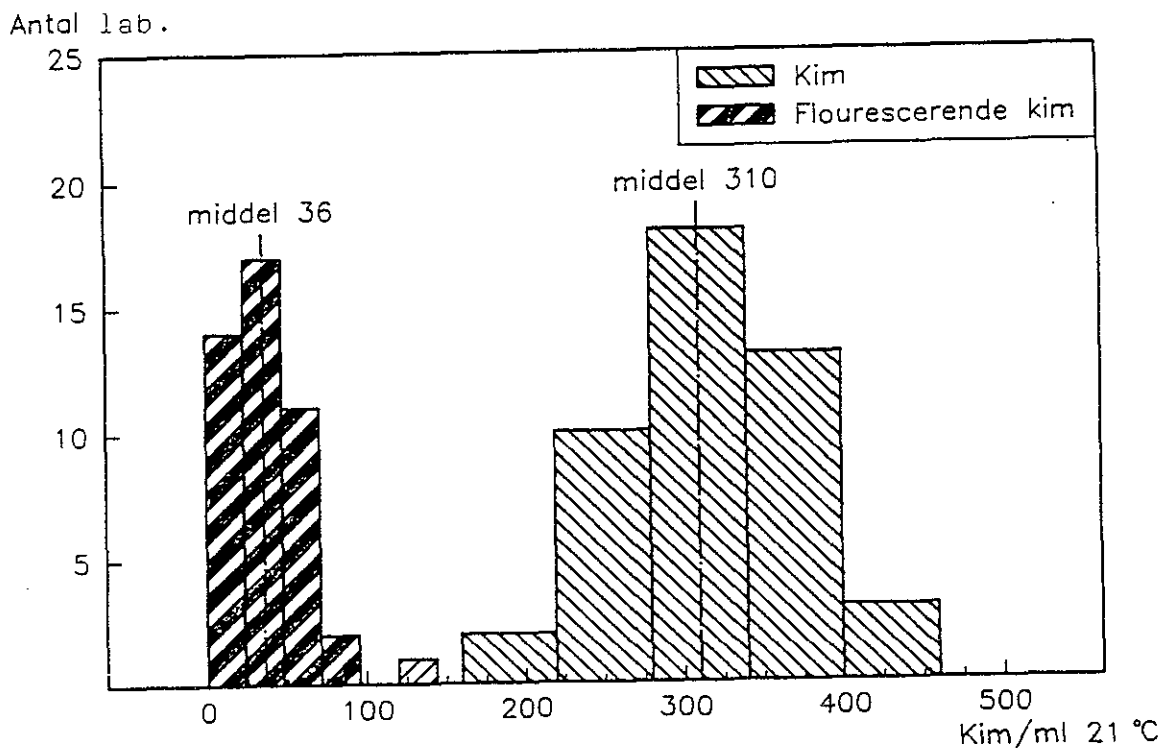
I de øvrige i bilag 3 viste figurer er på tilsvarende vis, men uden angivelse af teoretisk og reel standardafvigelse, vist fordelingen af resultater fra ens prøver i eget, tilsendt og eget og tilsendt substrat. I hver figur er tre resultatpar forbundet ved lodret linje. Herved markeres de tre laboratorier, der har størst variation mellem de to resultater.

Fluorescenter er ikke medtaget i disse illustrationer på grund af den meget store spredning, der primært skyldtes metodeproblemer.

Ved at sammenholde bilag 1 og 2 ses det, at den relative usikkerhed (standardafvigelsen i forhold til mv) er betydelig større ved bestemmelse af fluorescerende kim end ved 21° kim. Et tilsvarende billede kan ses af Figur 1: for prøve 4, der var en renkultur af Ps.fluorescens, ses her, at der kun tælles 10-20% af det reelle antal fluorescerende bakterier, men samtidigt ses, at den relative usikkerhed (f.eks. udtrykt som variationskoefficienten:  $100 \times (s:mv)\%$ ) for fluor.kim er  $100 \times 25,3 : 36,1 = 70\%$ , mens den for 21° kim er blot  $100 \times 56,9 : 308,7 = 18\%$ . Det vil sige, at tallet af fluorescerende kim bliver alt for lavt og alt for usikkert bestemt. (For mulige forklaringer, se 5.3 "Repeterbarhed og Reproducerbarhed").

Figur 1

Fordeling af kimalt og fluorescerende kim i prøve 4 i tilsendt substrat



### 5.3. Repeterbarhed og reproducerbarhed

I tabel 2 er for  $21^{\circ}$  kim samt for fluor. kim angivet middelværdi, repeterbarhed og reproducerbarhed for de tre prøvepar i henholdsvis eget og tilsendt substrat.

En regelret definition af repeterbarhed og reproducerbarhed kan ses i Rapport over Miljøstyrelsens mikrobiologiske interkalibreringer, 1984, men det kan kort her nævnes, at repeterbarheden er et mål for variationen indenfor laboratorier, mens reproducerbarheden er et mål for den totale variation (altså både indenfor og imellem laboratorier). Hvis både metode og laboratorier er gode, skulle reproducerbarhed altså ikke være meget større end repeterbarheden, som igen ikke skulle være meget større end den variation, som metoden teoretisk skal indebære (i dette tilfælde svarende til Poisson-fordelingen). Hvis reproducerbarhed er tydeligt større end repeterbarhed, analyserer laboratorierne for forskelligt. Hvis repeterbarhed er tydeligt større end den teoretiske variation er der sandsynligvis for stor indflydelse af andre fejlkilder (fortynding, udsæd, tælling) på de enkelte laboratorier.

Ud fra det under "middelværdi og standardafvigelse" nævnte eksempel med  $21^{\circ}$  kim fra prøve 1 og 5 i eget substrat kan det beregnes, at den til den teoretiske standardafvigelse svarende repeterbarhed ville være ca. 108, mens det fra tabel 2 ses, at den reelle repeterbarhed i dette tilfælde er udregnet til 182. Denne forskel burde nok kunne blive mindre ved forbedret kontrol af ovennævnte fejlkilder på de forskellige laboratorier, men det er almindeligt anerkendt, at den Poisson baserede teoretiske standardafvigelse er udtryk for et sandsynligvis uopnåeligt minimum. Derimod kunne den her meget lille forskel mellem repeterbarhed og reproducerbarhed (182 og 187) tyde på, at de forskellige laboratorier udfører analysen på en meget ensartet måde.

Tabel 2. REPETERBARHED OG REPRODUCERBARHED.

Kim ved 21° C

Prøvepar	1-5	1-5	2-7	2-7	4-6	4-6
Substrat	eget	sendt	eget	sendt	eget	sendt
Middelværdi	282,9	276,4	2975	2939	319,3	308,4
Repeterbarhed	182	160	1147	1474	155	124
Reproducerbarhed	187	179	1731	1946	190	169

Fluorescerende kim ved 21° C

Prøvepar	1-5	1-5	2-7	2-7	4-6	4-6
Substrat	eget	sendt	eget	sendt	eget	sendt
Middelværdi	38,3	30,8	340	347	41,6	38,2
Repeterbarhed	51	36	341	427	45	49
Reproducerbarhed	61	55	604	696	66	72

For de øvrige resultater for 21° kim i tabel 2 ser billedet ud på nogenlunde samme måde, idet der dog synes at være en tendens til en relativt mindre repeterbarhed og en relativt større reproducerbarhed end i ovennævnte eksempel. Dette sidste kan som nævnt skyldes forskelle imellem laboratorierne, f.eks. i den almindeligt anvendte laboratorieteknik (idet vi går ud fra at prøverne, der når frem til laboratorierne, har ens bakteriekoncentration - se bilag 6).

Går vi derimod til den anden del af tabel 2, ses det, at såvel repeterbarhed som reproducerbarhed relativt set er betragteligt større ved undersøgelserne for fluorescerende kim. Repeterbarheden er her i alle tilfælde større end middelværdien og forholdet mellem reproducerbarhed og repeterbarhed er betydeligt større end for 21° kim. Generelt må man forvente en større spredning på resultaterne, når et indikativt princip ( $\pm$  fluorescens)

medinddrages ved tællingen og evt. kan det også medvirke til en større relativ spredning, at fluorescenterne generelt tælles på plader med færre kolonier. Men angivelserne i tabel 2 viser klart, at der både er (for) store forskelle mellem fluorescent-tællinger på forskellige laboratorier og (for) store forskelle mellem det enkelte laboratoriums gentagne fluorescent-tællinger.

De opnåede fluorescent resultater er altså såvel upræcise (stor spredning på resultater) som unøjagtige (kun 10-20% af den "sande" værdi).

Idet laboratorierne ved undersøgelserne for  $21^{\circ}$  kim har vist, at bakteriekoncentrationsbestemmelser kan udføres relativt præcist og nøjagtigt, må ovennævnte fluorescent problemer primært tilskrives mangler ved den anvendte metode. Hvilket måske også ud fra en praktisk synsvinkel kan synes rimeligt, når man erindrer sig problemerne med at afgøre, hvorvidt den enkelte - tvivlsomme - koloni er fluorescerende.

#### 5.4. Valg af plader til kimtælling.

Den teoretiske baggrund for de tidligere nævnte grænser på 20 og 200 er kort fortalt, at lave kolonital er for upræcise (for stor relativ usikkerhed) mens høje kolonital er unøjagtige (for lave p.g.a. overlap af kolonier).

Den dårlige præcision ved lave kolonital hænger alene sammen med "tilfældighedernes" større indflydelse når meget få bakterier er involveret. Dette kan matematisk beskrives ved Poisson fordelingen, mens det fra en mere praktisk synsvinkel f.eks. giver sig udtryk i, at sandsynligheden for en så skæv fordeling som 2-12 i -2. fortyndingen er betydelig større end sandsynligheden for den tilsvarende skæve fordeling 20-120 i -1. fortyndingen. Derfor den nedre grænse på 20 kolonier.

Tilsvarende synes det logisk, at for mange kolonier på en plade vil give for mange tilfælde af sammenvoksning af flere kolonier og dermed for lave resultater. Men en øvre grænse på kun 200 forekommer mange for lavt sat,

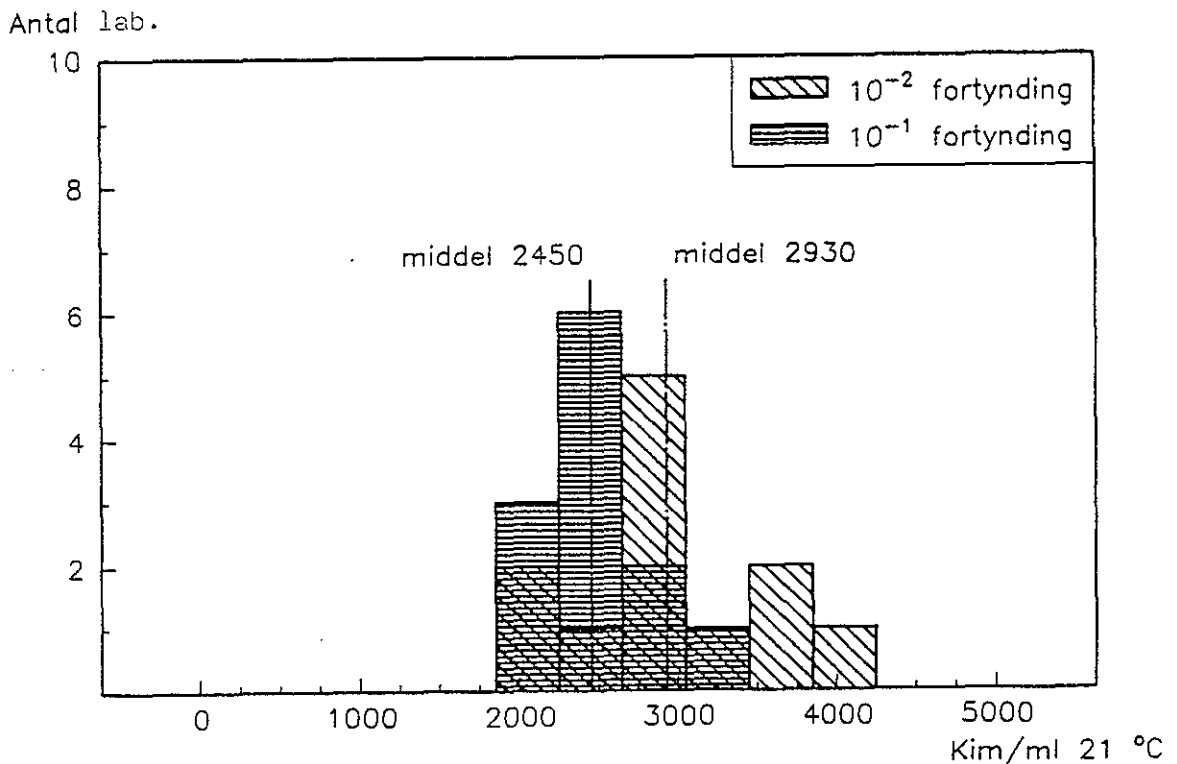
hvilket da også i denne interkalibrering har resulteret i, at mange laboratorier hellere anvender plader med 200-400 kolonier end plader med 20-40 kolonier. I figur 2 er det ud fra tolv tilfældigt valgte laboratoriers 21° kimalt illustreret, hvorledes en sådan beregningsmåde kan influere på resultatet.

Fra alle tolv laboratorier er medtaget resultater fra både -2. og -1. fortyndingen. Det ses, som ventet, at den relative spredning på resultaterne er noget større ved tællinger på -2. pladerne (gns. 29,3 kolonier) end på -1. pladerne (gns. 245 kolonier). Men det ses også, at det opnåede resultat er tydeligt lavere (16%) ved tælling på plader med kun lidt over 200 kolonier i forhold til ved tælling på de korrekte plader.

Det er således væsentligt at søge at overholde såvel den øvre som den nedre grænse ved udvælgelse af korrekte plader.

Figur 2.

12 laboratoriers kimalt bestemt udfra fortyndingerne  $10^{-1}$  og  $10^{-2}$  for prøv 2 i tilsendt substrat.



6.

REFERENCER.

Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons, Edv.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The William & Wilkins Compagny. Baltimore 1984.

Christoffersen, A.-B.: Bestemmelse af kimtallet og fluorescerende kim ved 21°C i King's agar B. Metodestudie af =DS= 2252. Dansk Veterinærtidsskrift, nr. 14, 1985.

DS/ISO 5725: Precision of testmethods. Determination of repeatability and reproducibility by inter - laboratory tests, 1981.

Dansk Standard =DS= 2252: Vandundersøgelse. Bestemmelse af kimtallet og fluorescerende kim ved 21°C i King's agar B.

Miljøstyrelsen: Mikrobiologiske interkalibreringer på miljø- og vandanalyser 1984. Februar 1985.

Miljøstyrelsen: Miljøstyrelsens 2. mikrobiologiske interkalibrering. Bestemmelse af coliforme bakterier og termotolerante coliforme bakterier. Fortyndingsmetoden (MPN-metoden). Inter =DS= 2255. December 1984.

Niemelä, S.: Statistical Evaluation of Results from Quantitative Microbiological Examinations. NMKL Report no. 1, 2nd edition. Uppsala 1983.

BILAGSFORTEGNELSE.

	SIDE
Bilag 1 : Oversigt, der viser data der indgik i statistik vedrørende 21 <sup>o</sup> -kim.	22
Bilag 2 : Oversigt, der viser data der indgik i statistik vedrørende fluorescerende kim.	23
Bilag 3 : 6 grafiske illustrationer af 46 laboratoriers kimtalsresultater bestemt i pr. 1-5, 2-7 og 4-6 i eget og tilsendt substrat.	24
7 grafiske illustrationer, én for hver prøve, der viser laboratoriernes resultater i eget samt tilsendt substrat.	
Bilag 4 : Oversigt over bemærkninger vedrørende fluorescensforhold.	31
Bilag 5 : Tabel 3 viser det teoretiske kimindhold i de respektive testprøver.	32
Tabel 4 viser anvendelsen af kommercielle King's agar 8 substrater.	
Bilag 6 : 2 eksempler der belyser testprøvernes homogenitet.	33
Bilag 7 : Søjlediagram, der viser temperaturregistrering i testprøver.	34
Bilag 8 : Deltagende laboratorier i Inter =DS= 2252.	35
Bilag 9 : Udsendt vejledning og rapporteringsskemaer.	36
Bilag 10 : Kolonitællinger og kimtalsbestemmelser i relation til vandundersøgelser.	41

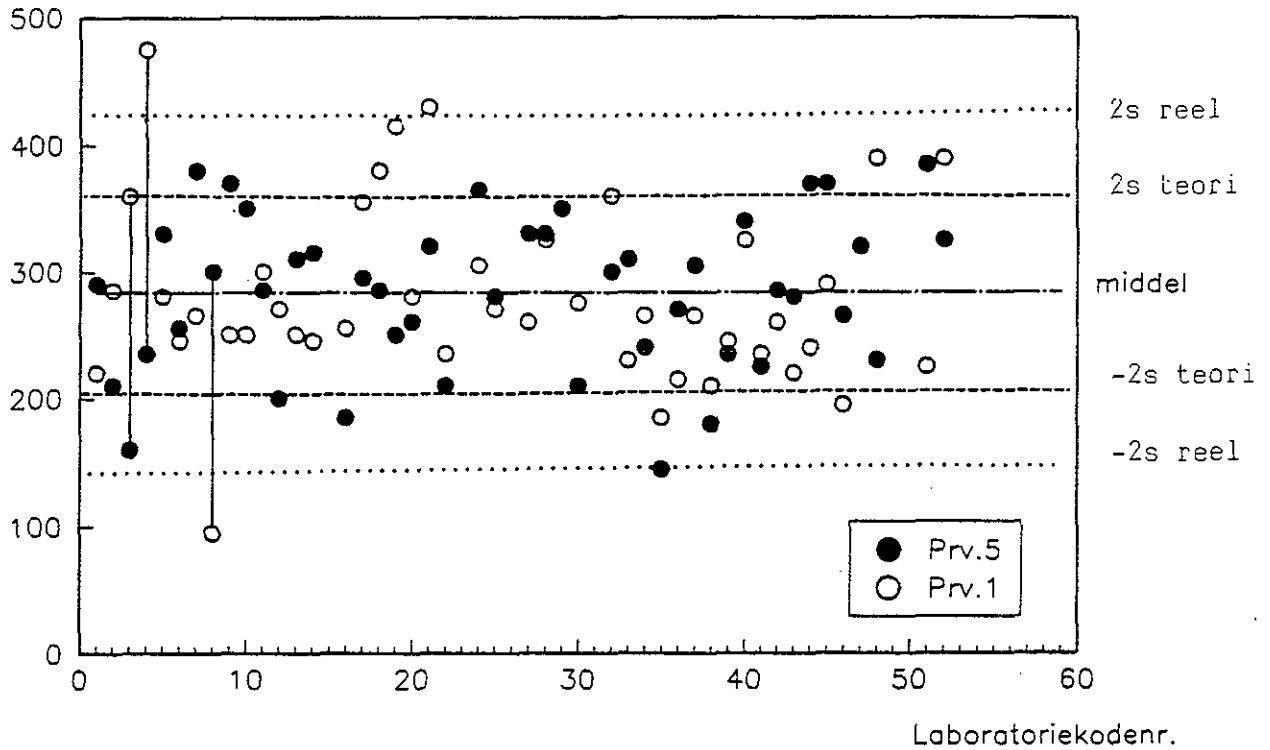






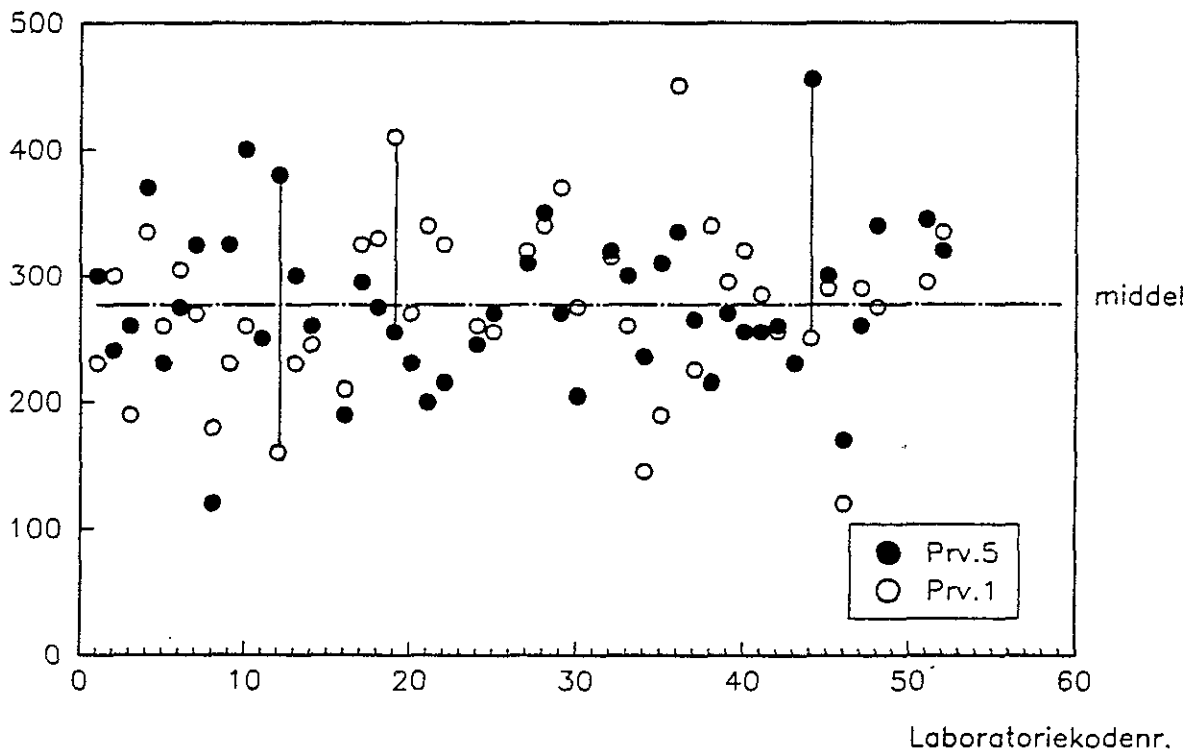
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.1 og 5 i eget substrat

Kim/ml 21 °C



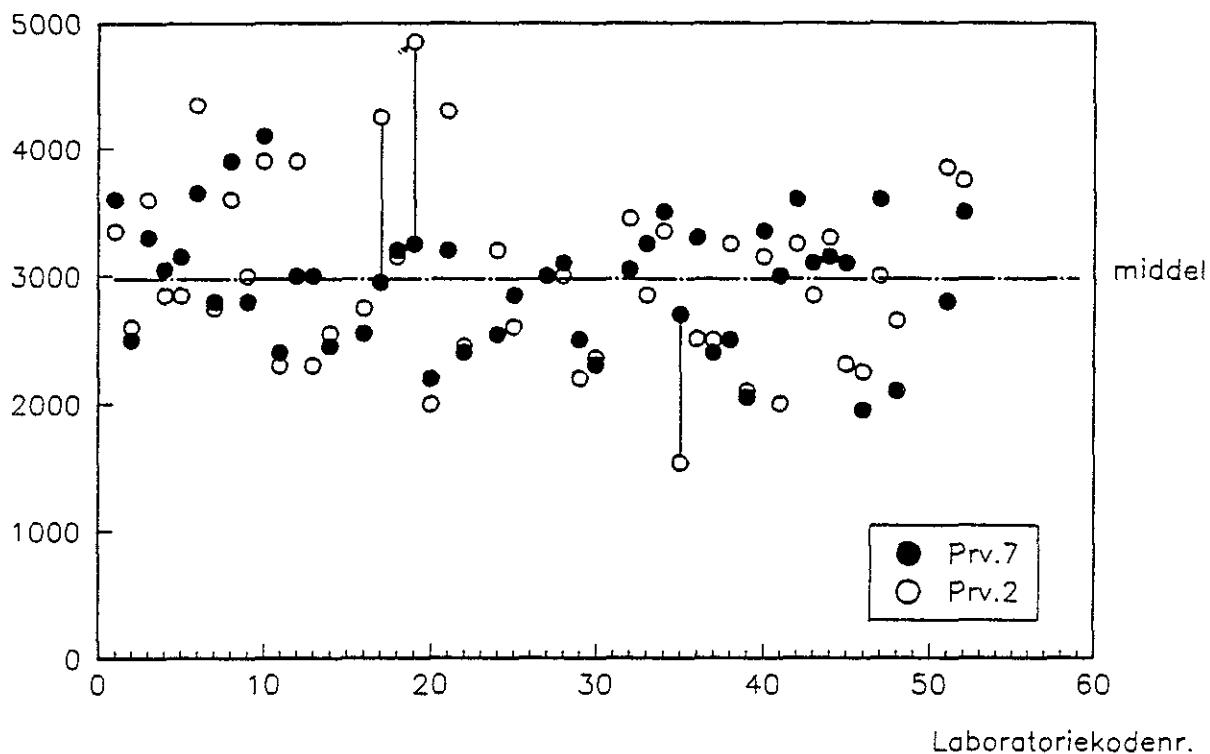
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.1 og 5 i tilsendt substrat

Kim/ml 21 °C



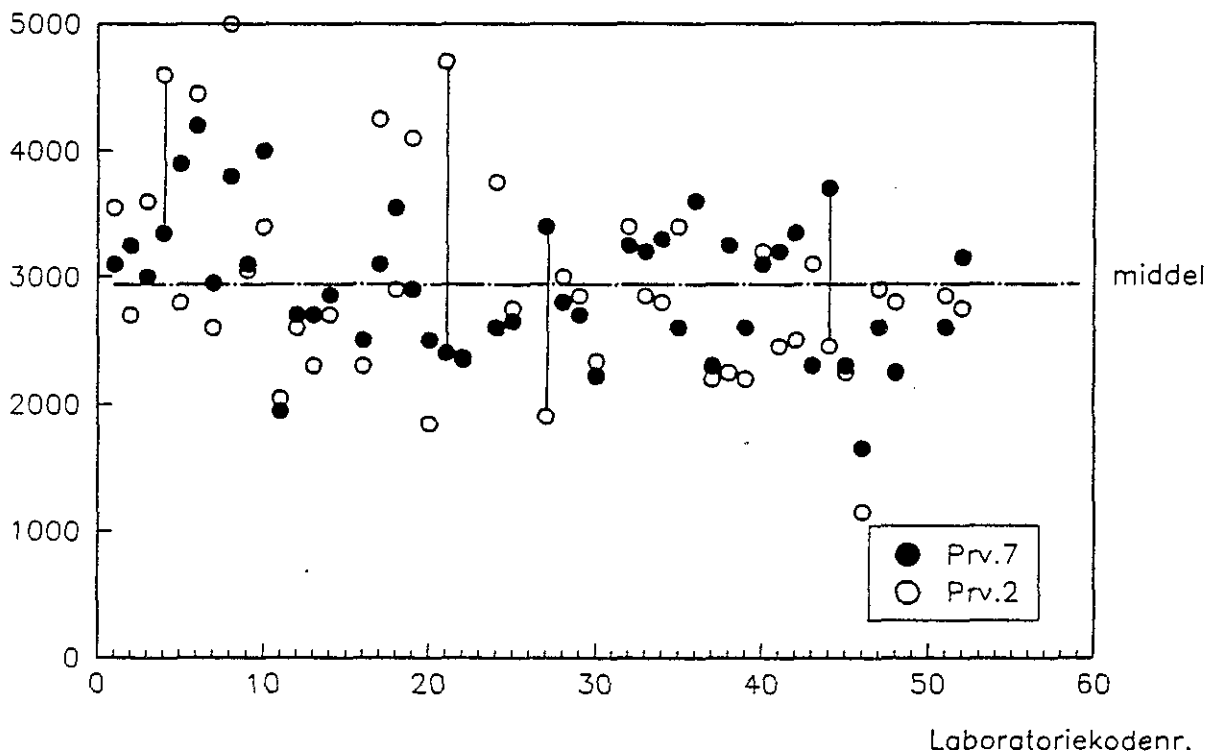
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.2 og 7 i eget substrat

Kim/ml 21 °C



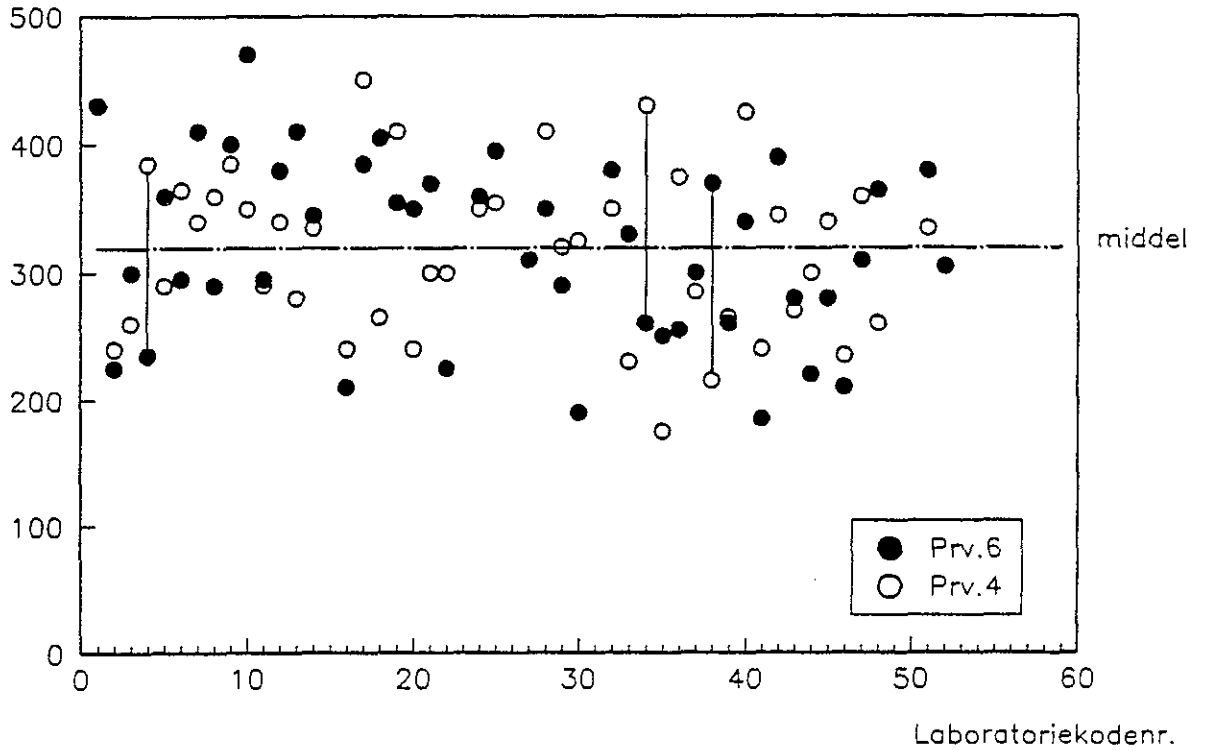
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.2 og 7 i tilsendt substrat

Kim/ml 21 °C



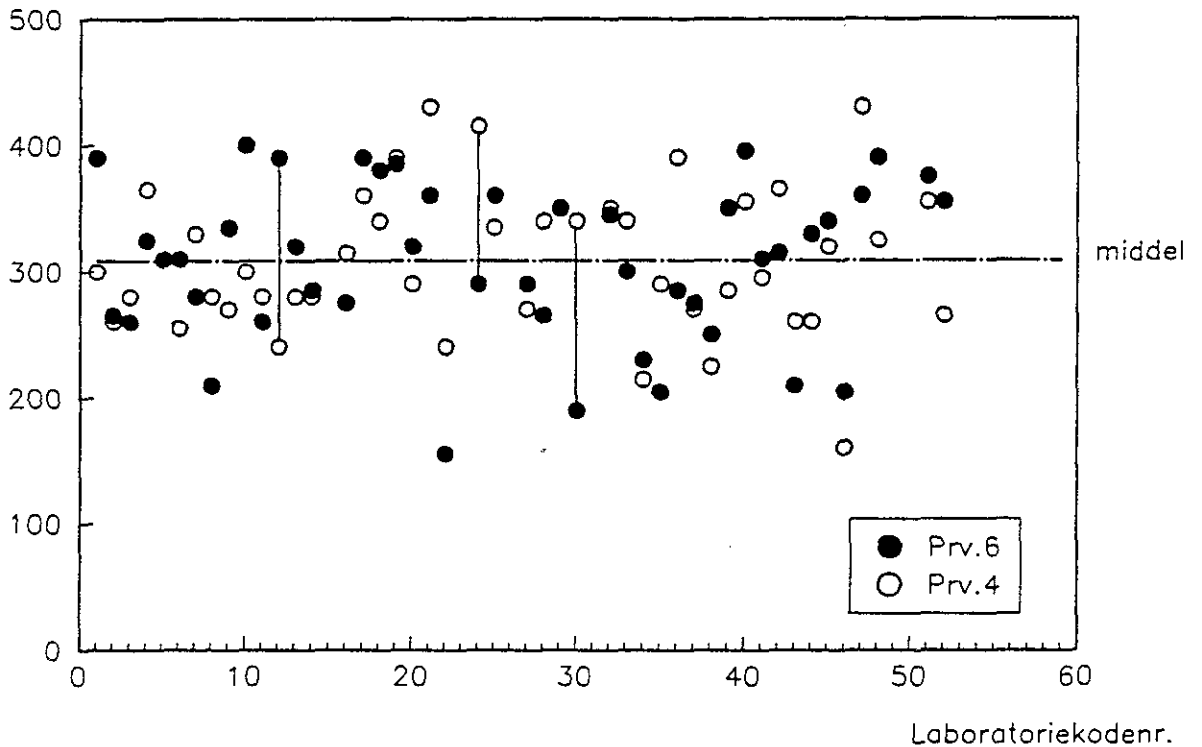
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.4 og 6 i eget substrat

Kim/ml 21 °C



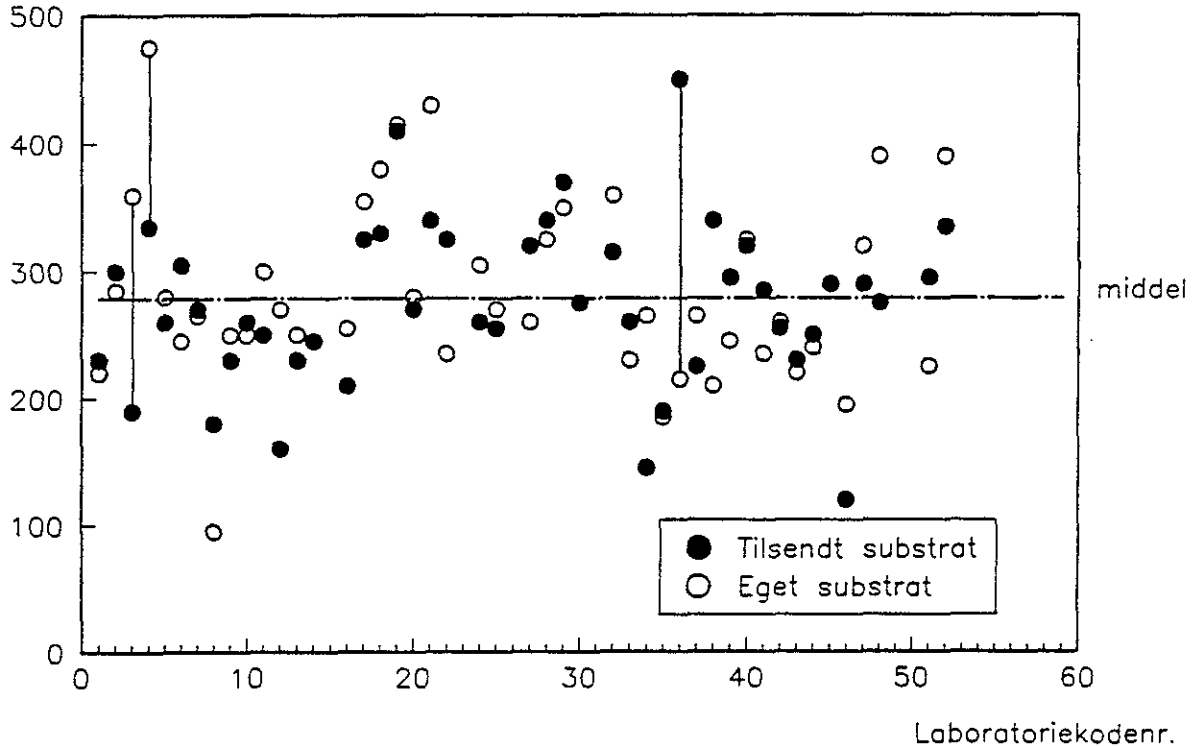
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.4 og 6 i tilsendt substrat

Kim/ml 21 °C



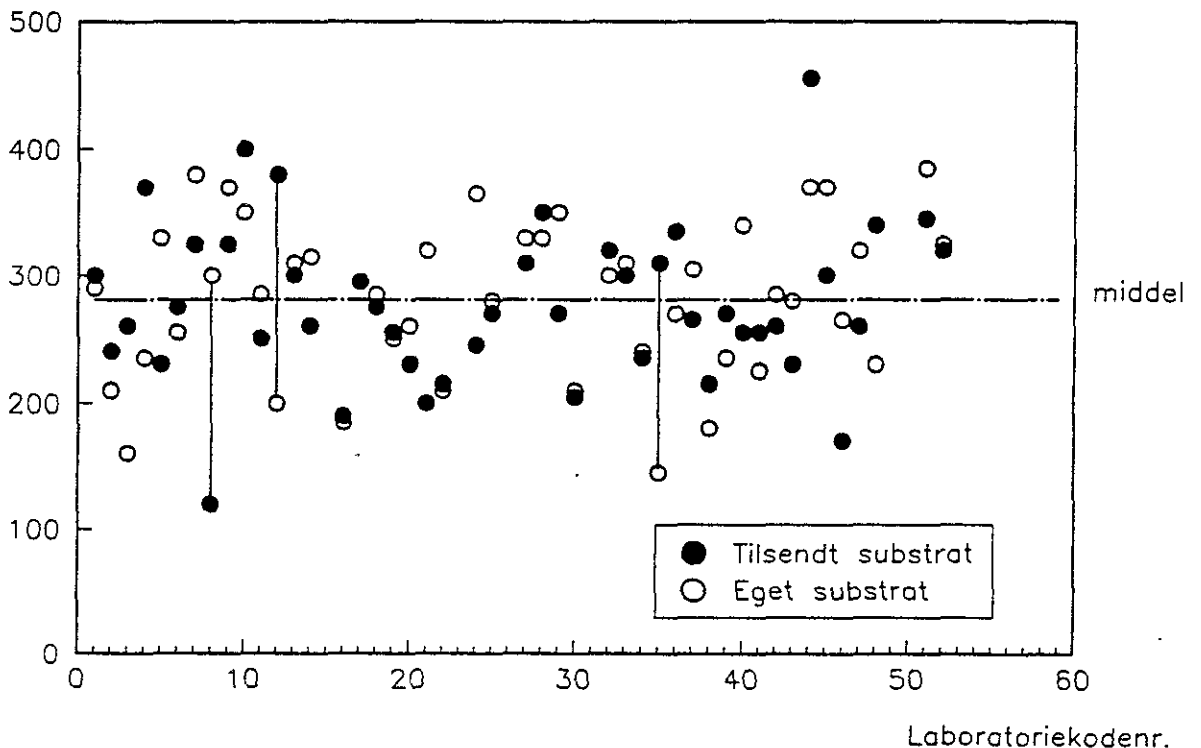
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.1 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml 21 °C



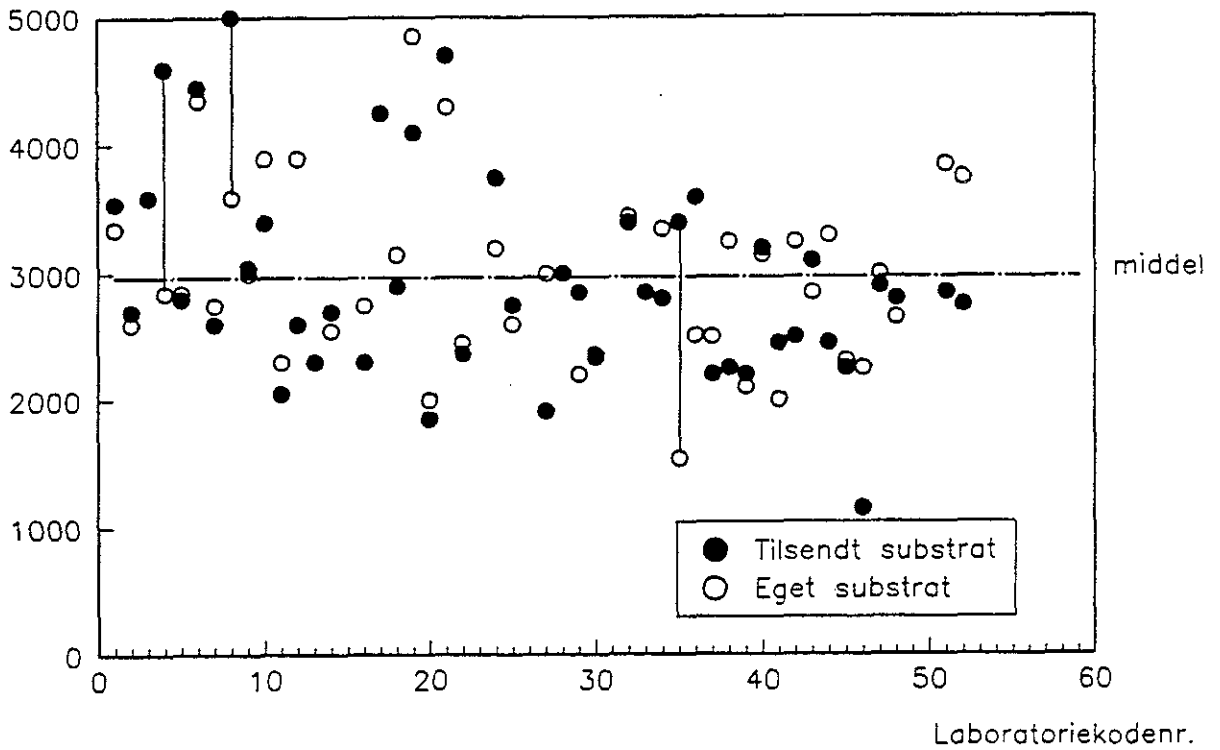
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.5 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml 21 °C



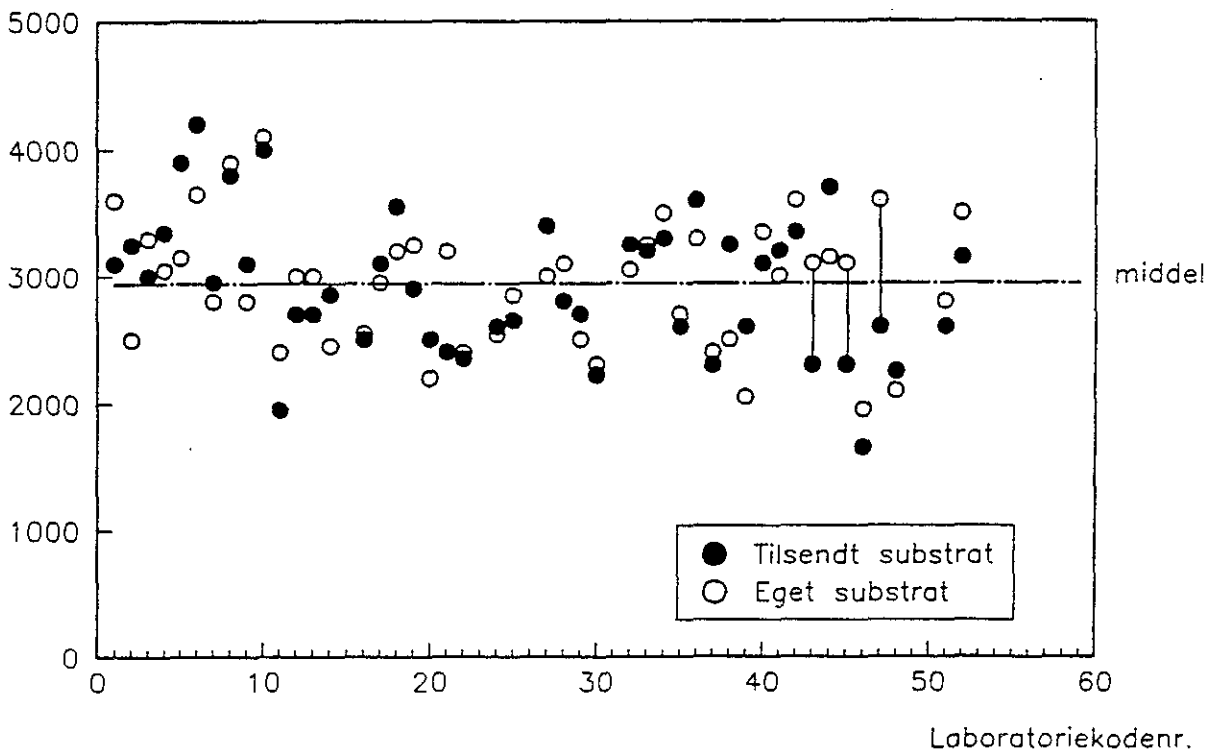
### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.2 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml 21 °C

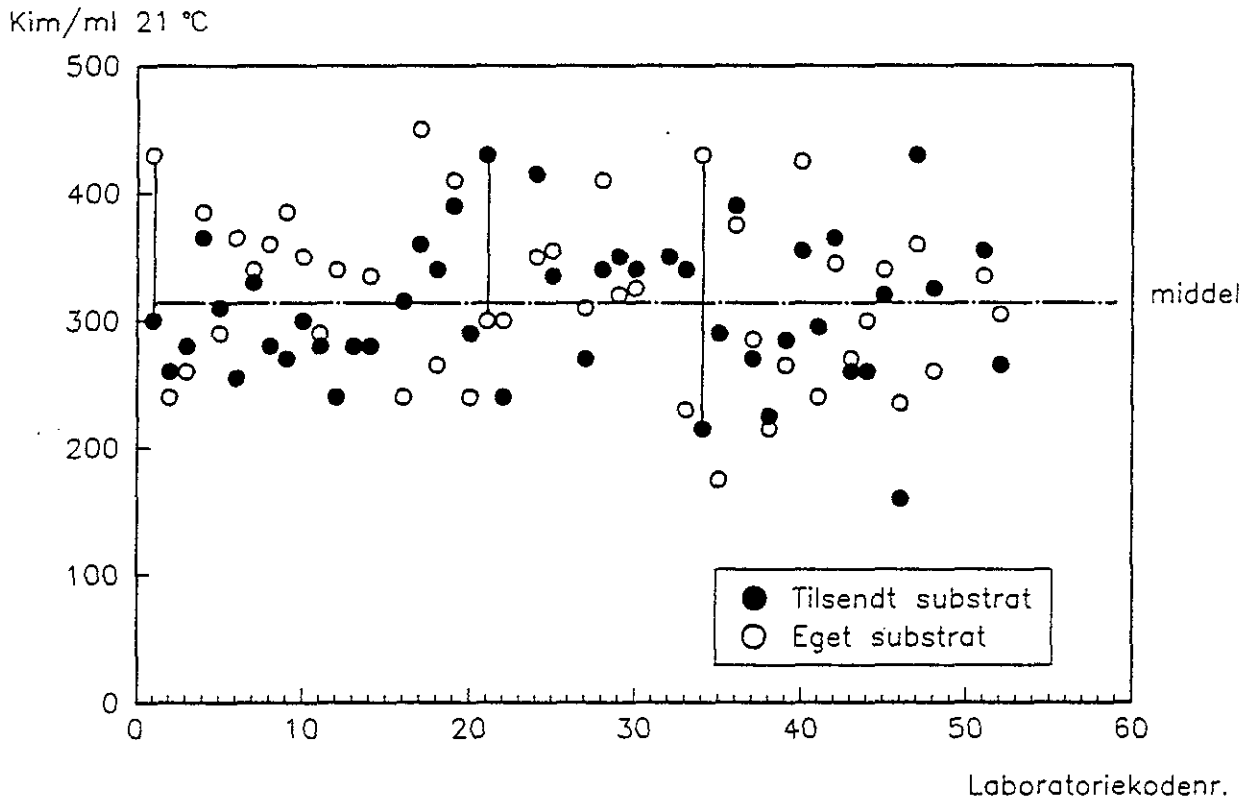


### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.7 i eget og tilsendt substrat

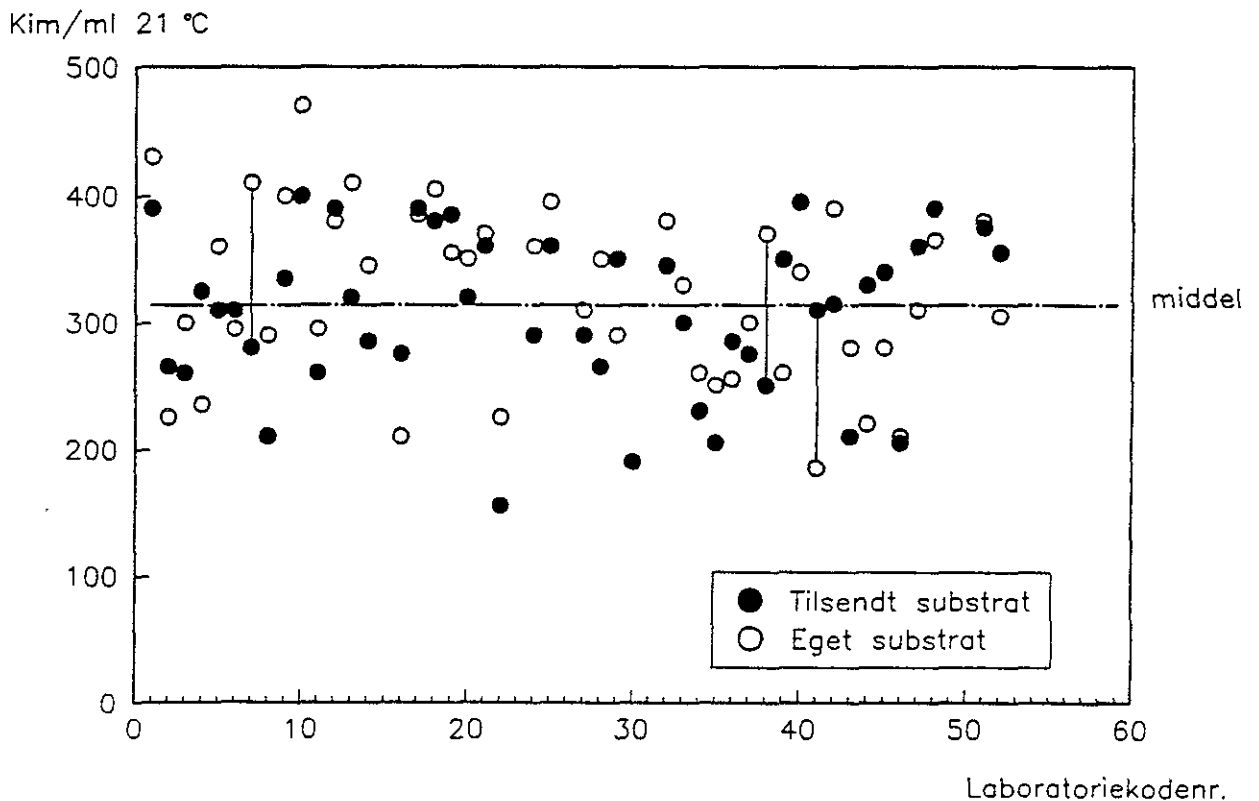
Kim/ml 21 °C



### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.4 i eget og tilsendt substrat

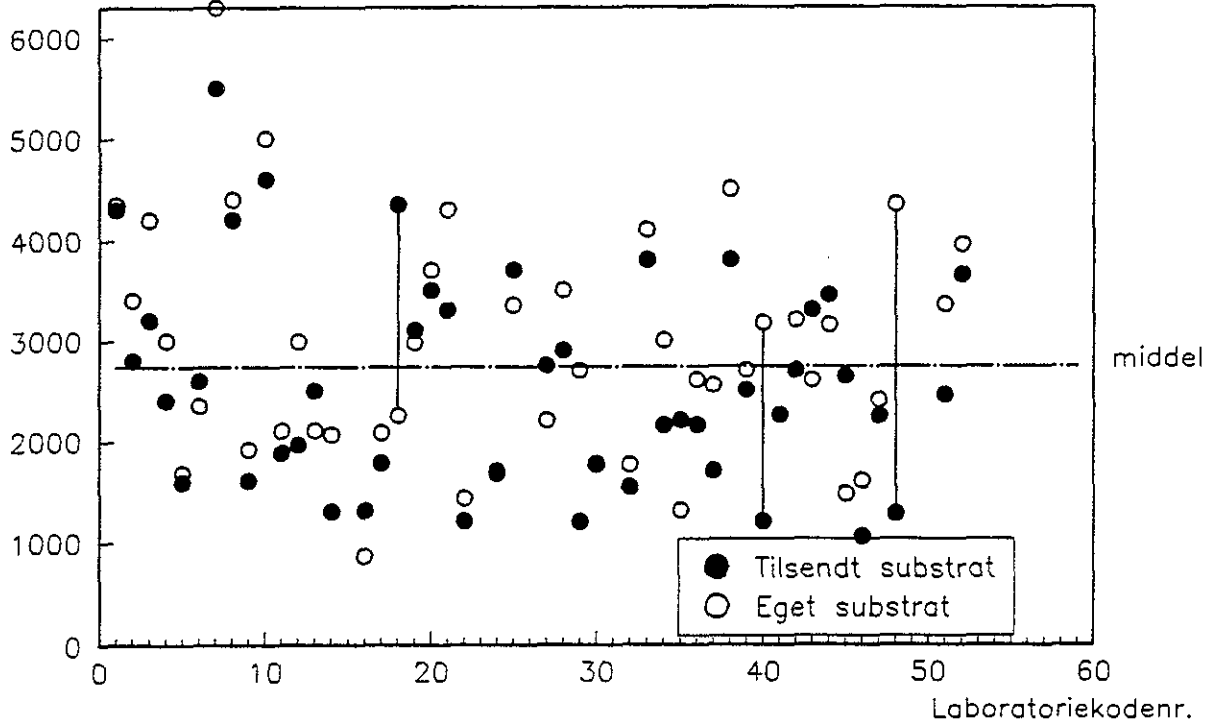


### 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.6 i eget og tilsendt substrat



# 46 laboratoriers kimtal bestemt i prv.3 i eget og tilsendt substrat

Kim/ml 21 °C





Følgende 20 laboratorier har sendt bemærkninger vedrørende fluorescensforhold.

Lab.nr.	Bemærkning	Fabrikat	
		Eget	Tilsendt
1	Detaljerede bemærkninger vedr. fluorescensforholdene	Merck	Merck
3	Bemærkn. svagere fluorescens på eget end tilsendt, undtagen for prøve 3	Merck	Merck
9	Fluorescens i eget substrat er meget kraftig.	Gibco	Merck
11	Fluorescens i eget substrat er meget bedre end i tilsendt.	Efter DS 2252	Merck
12	Tydligere fluorescens i eget. (Ingen fluorescens i pr. 5-6-7 i tilsendt)	Efter DS 2252	Merck
16	Fluorescens tydeligere i tilsendt. (Bemærker at fluorescens kun ses omkring overfladekolonier).	Merck	Merck
17	Har problemer med tælling af fluorescerende kim.	Egen fremst.	Merck
21	Fluorescens påvises ikke i tilsendt substrat for 3 prøver.	Egen fremst.	Merck
22	Fluorescens i eget mere udtalt end i tilsendt.	Merck	Merck
24	Bemærkes at fluorescens-aflæsningen er vanskelig på grund af sværmning	Gibco	Merck
25	Kommenterer fluorescensproblematikken vedrørende dybdekolonier.	Gibco	Merck
29	Fluorescens tydeligst i eget, tendens til sammenflydning.	Merck	Merck
32	Problemer med fluorescens-aflæsning i prøve 7.	Merck	Merck
34	Bemærkning vedr. dybde: overfladeudsæd	Merck	Merck
36	Fluorescens erkendes ikke omkring dybde kolonier	Gibco	Merck
38	Fluorescens i eget substrat er bedst.	Gibco	Merck
39	Fluorescerende kim påvises kun i prøve 3	Merck	Merck
42	Fluorescens er svagere i eget	Merck	Merck
50	Lab. påviser ikke fluorescerende kim	Struers	Merck
52	Svag fluorescens i tilsendt betød vanskelig aflæsning.	Merck	Merck

Tabel 3 : Viser det teoretiske kimindhold i de udsendte testprøver. Prøve 3 indeholdt nr. 8 = Pseudomonas putida i renkultur og prøve 4 = 6 indeholdt nr. 2030 = Pseudomonas fluorescens i renkultur.

	Teoretiske antal :		
	Ikke fluoresc.pr.ml	Fluoresc.pr.ml	Total pr.ml
Pr. 1 og 5	10	350	360
Pr. 2 og 7	100	3.500	3.600
Pr. 4 og 6	0	350	350
Pr. 3	0	2.000	2.000

Tabel 4 : Viser hvor mange laboratorier der anvendte de forskellige King's agar B tørsubstrater som eget substrat.

28 laboratorier (56 %)	:	Merck - fabrikat
9 laboratorier (18 %)	:	Gibco fabrikat
9 laboratorier (18 %)	:	Egen - fab. efter =DS= 2252
4 laboratorier ( 8 %)	:	Struers - fabrikat

EKSEMPEL 1 VEDRØRENDE NR. 2030 (= PSEUDOMONAS FLUORESCENS).

120 INTERKALIBRERINGSPRØVER ER AFFIPPETERET OG HERAF ER HVER 10. PRØVE UDTAGET TIL ANALYSE FOR INDHOLD AF KIM VED 21°C OG FLUORESCENSBESTEMMELSE. TALLENE I PARANTES ANGIVER ANTAL FLUORESCENTER.

ANALYSEN OMFATTER SÅLEDES 12 PRØVER.

KIMTAL X	LOG X
195 (25)	2.29
230 (25)	2.36
235 (20)	2.37
275 (15)	2.43
250 (40)	2.39
290 (20)	2.46
285 (20)	2.45
300 (35)	2.47
215 (20)	2.33
250 (35)	2.39
245 (15)	2.38
255 (20)	2.40
$\bar{x} : 252 (24)$	$\text{LOG } \bar{x}_{12} : 2.39 \sim 250$ $S_{12} : 0.055$
95 % GRÆNSEN	$\left\{ \begin{array}{l} \text{LOG } \bar{x}_{12} + 2S = 2.508 \sim 322 \\ \text{LOG } \bar{x}_{12} - 2S = 2.288 \sim 194 \end{array} \right.$

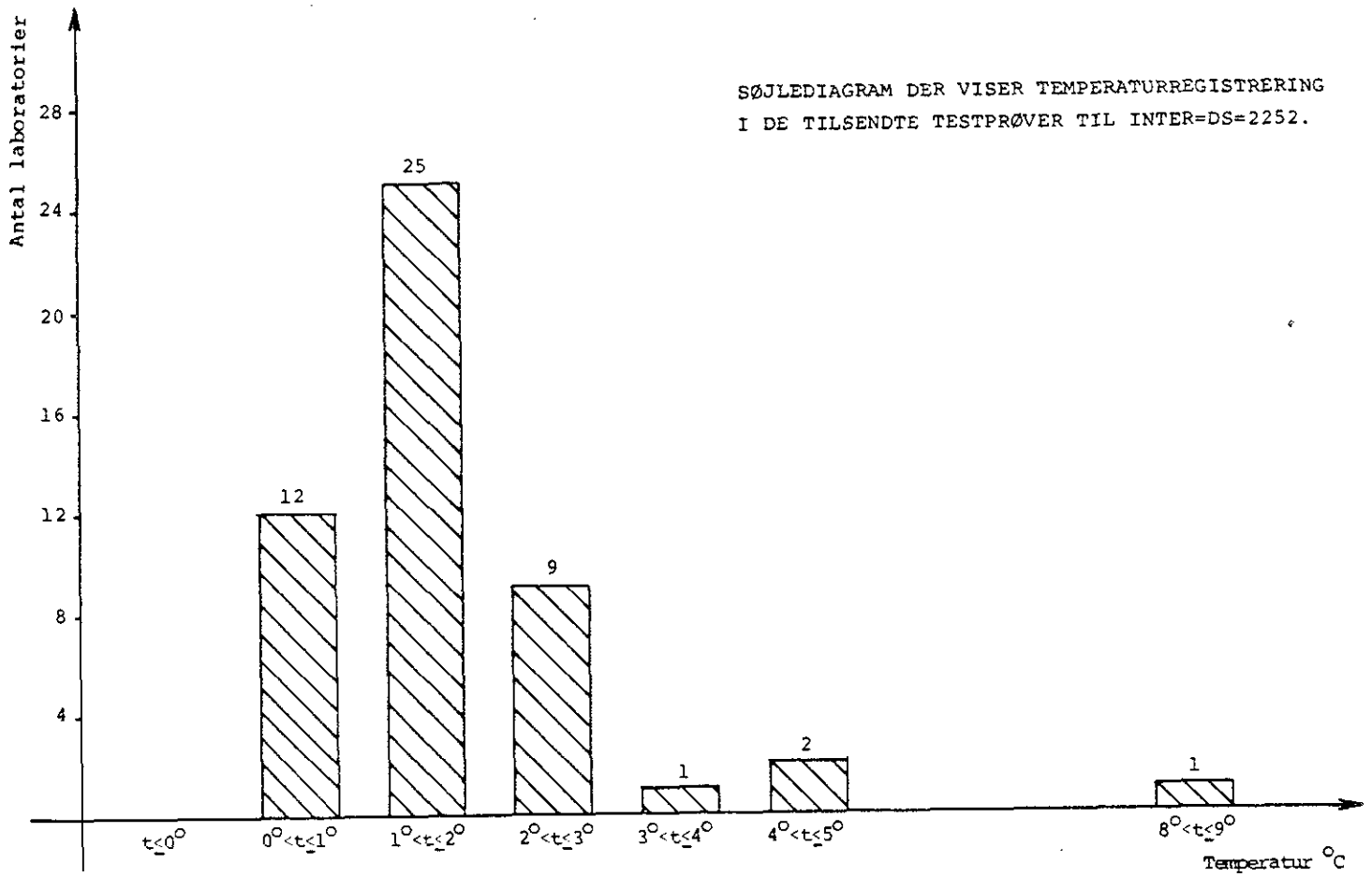
TEORETISKE KIMTAL : 200/ML.

EKSEMPEL 2 VEDRØRENDE NR. 8 (= PSEUDOMONAS PUTIDA).

120 INTERKALIBRERINGSPRØVER ER AFFIPPETERET OG HERAF ER HVER 10. PRØVE UDTAGET TIL KIMTALSBESTEMMELSE VED 21°C. TALLENE ANFØRT I PARANTES ANGIVER ANTAL FLUORESCENTER.

KIMTAL X	LOG X
90 (10)	1.95
225 (25)	2.35
215 (45)	2.33
165 (15)	2.21
165 (25)	2.21
180 (30)	2.25
120 (30)	2.07
175 (20)	2.24
190 (25)	2.27
155 (30)	2.19
195 (55)	2.29
220 (45)	2.34
$\bar{x} : 175 (30)$	$\text{LOG } \bar{x} : 2.22 \sim 168$ $S_{12} : 0.116$ $2S_{12} : 0.23$
95 % GRÆNSEN	$\left\{ \begin{array}{l} \text{LOG } \bar{x}_{12} + 2S = 2.45 \sim 285 \\ \text{LOG } \bar{x}_{12} - 2S = 1.99 \sim 99 \end{array} \right.$

TEORETISKE KIMTAL : 180/ML.



DELTAGENDE LABORATORIER.

Samlet oversigt over de 50 deltagende laboratorier. Rækkefølgen er helt uafhængig af laboratoriernes kodenummerering.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, Esbjerg	Levnedsmiddelkontrollen I/S, Skovlunde
Levnedsmiddelkontrollenheden i Fredericia	Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Slagelse
Stadsdyrlægens Kontor-Frederiksberg, København F.	Levnedsmiddelkontrollenheden i Silkeborg
Nordøstvendssyssel Levnedsmiddel- og Miljøkontrol, Frederikshavn	Struer Levnedsmiddelkontrol, Struer
Levnedsmiddelkontrollen I/S, Frederiksborg Amt Vest, Frederikssund	Levnedsmiddelkontrollenheden i Svendborg
Levnedsmiddelkontrollen, Miljøhygiejnisk laboratorium, Haderslev	Levnedsmiddelkontrollen i Sønderborg
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen i Helsingør	Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Thisted
Levnedsmiddelkontrollen i Herning	Hygiejnolaboratoriet i Tønder
Levnedsmiddelkontrollen i Hillerød	Miljø- og levnedsmiddelkontrollen i Vårde
Hjørring kommunale levnedsmiddelkontrol, Hjørring	Levnedsmiddelkontrollen i Vejle
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Holbæk	Viborg Levnedsmiddelkontrollenheden, Viborg.
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Holstebro	Hygiejnisk Forvaltning, laboratoriet for miljø og levnedsmidler, Aalborg Øst
	Levnedsmiddel- og miljøtilsynet, Århus N.
Levnedsmiddelkontrollen i København	Det kommunale laboratorium i Åbenrå
Fælleskommunal levnedsmiddelkontrol, København Amt Vest, Glostrup	
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen Køge Bugt I/S, Køge	Alfred Jørgensens Geringsfysiologisk laboratorium A/S, København V.
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen i Nykøbing F.	Dansk Handels- og Landbrugslaboratorium, Odense
Miljø- og levnedsmiddellaboratoriet, Næstved	R. DON'S, Vandanalytisk laboratorium, Nærum
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Odense	Vandkvalitetsinstituttet, Hørsholm
Randers Levnedsmiddelkontrol, Randers	Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Inst. for Veterinær mikrobiologi og hygiejne, København V.
Miljøhygiejnisk laboratorium, Levnedsmiddelkontrollen, Ribe	Steins Laboratorium, Albertslund
Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Ringsted	Veterinærdirektoratets Laboratorium, Ringsted
Levnedsmiddelkontrollen i Roskilde I/S, Roskilde	A/S Qvist's Laboratorium, Risskov
Bornholms Levnedsmiddelkontrollenheden, Rønne	Århus Universitet, Hygiejnisk Institut, Århus C.
Levnedsmiddellaboratoriet, Sakskøbing	Kemikaliekontrollens mikrobiologiske laboratorium, Søborg
	Københavns Vandforsyning, København
	Sjælsø Vandværk, Hørsholm

MILJØ- OG LEVNEDSMIDDELKONTROLENHEDEN  
ODENSE

Mikrobiologisk laboratorium.

LILLE TORNBJERG VEJ 24 5220 ODENSE SØ  
TLF (09) 13 13 72

DEN 05. marts 1985.

J. NR.: 7.4-3/84-88.

REF.: A-BC/in.

Attention:Til de deltagende laboratorier i miljøstyrelsens interkalibrering: MST-3/85.

Inter =DS= 2252

Formålet med denne interkalibrering er at bestemme præcisionen på undersøgelsesmetoden: =DS= 2252, udtrykt ved repeterbarhed (r) og reproducerbarhed (R), jfr. ISO 5725.

Det er hensigten, efter behandling af interkalibreringsresultaterne i styringsgruppen, at miljøstyrelsen kontakter de laboratorier, der finder afvigende resultater.

Miljøstyrelsen har i skrivelse af 21. februar 1985, j.nr. 84-20413-8, som ansvarshavende meddelt gennemførelsen af en mikrobiologisk interkalibrering på kunstige recipientprøver i uge 12.

Det tilhørende analysemateriale: 7 recipientprøver, mærket: 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7 og én vandprøve mærket: Temperaturregistrering/rød tapestrimmel, vil i overensstemmelse hermed blive udsendt den 18 marts 1985 i termocontainer fra Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Odense.

Forsendelsen er adresseret til det enkelte laboratoriums kontaktperson som ekspres og rekommanderet forsendelse.

Analysematerialet vedlægges kopi af nærværende skrivelse og rapporteringsskemaer.

Idet det må tilstræbes at give ensartede betingelser for alle deltagende laboratorier og dermed sikre muligheden for at opnå optimale resultater skal følgende forhold iagttages:

-2-

Modtagelsesforhold:

Termocontaineren kan forventes modtaget på samtlige laboratorier tirsdag den 19. marts 1985. Tidspunktet for modtagelsen noteres.

Containeren åbnes på laboratoriet såvidt muligt kl. 10,00 og herefter påbegyndes analysearbejdet.

Der foretages straks en temperaturmåling med termometer ( $\pm 1^{\circ}$ 's nøjagtighed). Termometret skal forud være nedkølet til området 0-5<sup>o</sup> C. Temperaturen måles kun i vandprøven mærket: Temperaturregistrering (rød tape) og denne prøve anvendes ikke til analyse. Temperaturen aflæses inden for 10 sek.

Termoelementerne fjernes fra kassen og umiddelbart herefter anbringes isvand omkring prøverne.

Temperaturen i lokalet noteres.

Substrat:

Kings agar B. tørsubstrat, mærket: Inter =DS= 2252, af samme batch-nummer, fremsendes hermed til samtlige laboratorier.

Undersøgelsen gennemføres ved dyrkning i laboratoriets eget substrat samt parallelt hermed i det tilsendte substrat.

Begge substrater tilvirknes nøje i overensstemmelse med =DS= 2252.

Opløs 33,3 g tørsubstrat i 1 ltr. glasdestilleret vand og tilsæt 10,0 g glycerol, opvarm til kogepunkt. Opløsningen steriliseres ved 121<sup>o</sup> C i 15 minutter. Slut pH er da 7,1  $\pm$  0,1 v. 21<sup>o</sup> C.

Analysen:

Af hensyn til bearbejdning af talmaterialet, der fremkommer i forbindelse med nærværende interkalibrering, er det væsentligt:

at vandprøverne opbevares ved 0-5<sup>o</sup> C fra kl. 10,00, anbring derfor isvand i den grå transportkasse omkring vandprøverne indtil den sidste prøve tages i brug.

-3-

-3-

at fremstilling af fortyndinger, udsød af prøverne samt kintælling udføres af én og samme laborant, nøje i overensstemmelse med =DS= 2252 med anvendelse af kortest mulig analysetid.

at der i samtlige 7 vandprøver, mærket 1, 2, 3, 4, 5, 6 og 7 bestemmes kintal ved 21<sup>0</sup> C samt antal fluorescencer, jfr. =DS= 2252 med laboratoriets eget substrat samt det tilsendte substrat. Fra samtlige 7 prøver fremstilles én fortyndingsrække til og med 10<sup>-4</sup>. Der foretages udsød fra den ufortyndede prøve samt fra samtlige fortyndinger. Prøverne analyseres i den rækkefølge de er nummerede.  
(Bemærk at kintallet i den ufortyndede prøve kan afvige fra kintal i de øvrige fortyndinger på grund af transportmediets indhold af konserveringsmiddel).

Registrering af analysedata:

Resultaterne noteres på medfølgende skemaer (jfr. eksempel).

Såfremt enkelte rubrikker ikke kan udfyldes, bedes årsag hertil anført under bemærkninger. Endvidere skal evt. afvigelser fra ovennævnte procedure eller fra forskrift i =DS= 2252 noteres af hensyn til senere vurdering af resultaterne.

Skemaerne returneres i udfyldt stand til miljøstyrelsen, att. Holger Pedersen, Hygiejnisk-kemisk/5. kontor, Strandgade 29, 1401 København K, senest den 29. marts 1985.

HUSK AT ANFØRE KODENUMMER på alle 3 skemaer, jfr. miljøstyrelsens skrivelse af 21. februar 1985. I tilfælde af uregelmæssig forsendelse eller tvivl vedrørende analyseforhold rettes henvendelse enten til miljøstyrelsen, tlf. nr. (01) 57 83 10, lok. 342 eller til Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Odense, tlf. nr. (09) 13 13 72, lok. 5613.

Termocontainer samt kølelegemer returneres i pakassen til Miljø- og levnedsmiddelkontrollenheden i Odense.

P. l. v.

A.-B. Christoffersen

3 bilag: Checkliste og rapporteringsskemaer.



Bilag 1.

INTER =DS= 2252.

J.nr.:

Kodenummer: \_\_\_\_\_

CHECKLISTE TIL TIRSDAG DEN 19. marts 1985.

<p><u>FORARBEJDE:</u></p> <p>Eget substrat, fabrikat og batchnr.: _____</p> <p>Eget substrat er tilvirket dato: _____</p> <p>Sammensætning af eget substrat: _____</p> <p>Tilsendt substrat er tilvirket dato: _____</p> <p>Termometer nedkøles til <math>0-5^{\circ}</math> C.</p>
<p><u>MODTAGELSE:</u></p> <p>Container er modtaget, dato: _____ kl.: _____</p> <p>Container er åbnet dato : _____ kl.: _____</p> <p>Temperaturen i rør med rød tape måles. (mæx. 10 sek.) _____</p> <p>Anbring isvand i grå kasse omkring prøverne.</p> <p>Temperatur i lokalet: _____</p> <p>Starttidspunkt kl. 10,00.</p>
<p><u>UNDERSØGELSEN:</u></p> <p>Der fremstilles én fortyndingsrække fra prøve 1. Der udsås fra ufortyndet prøve til og med <math>10^{-4}</math>, i såvel eget som tilsendt substrat.</p> <p>Samme procedure for resterende 6 prøver.</p> <p>Dyrkningstemperatur: _____</p>

BEMÆRKNINGER: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Returneres senest 29. marts 1985 til:

Miljøstyrelsen  
att. dyrlæge Holger Pedersen  
Hygiejnisk-kemisk/5.kontor  
Strandgade 29, 1401 København K.

INGEN UNDERSKRIFT  
HUSK KODENUMMER.



Beregningsregler vedr. kolonitællinger og kimtalsbestemmelser i relation til bakteriologiske vandundersøgelser

Nedennævnte generelle tællingsprincipper ved pladespredningsmetoden (dybde- eller overfladeudsød) vil danne grundlag for Miljøstyrelsens supplement til DS 2251, DS 2252, DS 2253 og DS 2254. Kommentarer til regler og eksempler er i høj grad velkomne.

Det overordnede princip er som nævnt i standarderne, at der altid skal tælles i den fortyndingsrække, hvor hver plade indeholder  $> 20$  og  $< 200$  kolonier. Dette volder i de fleste tilfælde ingen problemer - se eksempel 1. Der vil dog naturligt opstå grænsetilfælde, hvorfor det kan være relevant med følgende simple regler for korrekt beregning af bakteriekoncentrationen. Det er forudsat, at der anvendes udsædsmængder svarende til tifoldsfortyndinger, samt at der sås ud på to 90 mm petriskåle for hver fortynding.

- A) Netop én udsædsmængde giver 2 plader med  $> 20$  og  $< 200$  kolonier:  
Antallet af kolonier divideret med den totale udsædsmængde på disse to plader = resultatet, der altid afrundes til to betydende cifre;  
Eksempel 1.
- B) Fra to på hinanden følgende udsædsmængder giver alle fire plader kolonital inden for eller i nærheden af intervallet  $> 20$  og  $< 200$  kolonier:  
Antallet af kolonier divideret med den totale udsædsmængde på disse fire plader = resultatet; Eksempel 2 og 3. **Bemærk dog:** Hvis kolonitalene ikke synes at være i overensstemmelse med det anvendte ti-foldsfortyndingssystem, bør det ved en  $\chi^2$ -test undersøges, hvorvidt afvigelserne, statistisk set, kan siges at skyldes tilfældigheder - synes de forskellige kolonital ikke opstået ved tilfældigheder, bør evt. fejlkilder undersøges, og det eller de afvigende kolonital udelukkes ved beregning af endeligt resultat; Eksempel 4. (Se Niemelä, kap. 3).
- C) Alle plader  $< 20$ : Anvend kun de to plader svarende til den største udsædsmængde; Eksempel 5. (**Bemærk:** stor relativ usikkerhed).
- D) Alle plader  $> 200$ : Anvend kun de to plader svarende til den mindste udsædsmængde; Eksempel 6. (**Bemærk:** plader med kolonital  $> 300$  bør i princippet kun give anledning til semikvantitative resultatangivelser).

EKSEMPLER: Kolonital og resultater ved dobbelt udsød

Eksempel	1	2	3	4	5	6
Udsædsmængde pr. plade (ml af opr. prøve)						
0,1	540 450	<u>210</u> <u>190</u>	UT <sup>b)</sup> UT	UT UT	<u>17</u> <u>10</u>	UT UT
0,01	<u>35</u> <sup>a)</sup> <u>50</u>	<u>23</u> <u>18</u>	<u>195</u> <u>185</u>	<u>195</u> 97 <sup>c)</sup>	4 1	UT UT
0,001	1 7	0 5	<u>22</u> <u>20</u>	<u>22</u> <u>20</u>	0 0	890 975
0,0001	0 0	0 0	4 0		0 0	<u>220</u> <u>290</u>
Antal kolonier	85	441	422	237	27	510
Udsædsmængde (ml)	0,02	0,22	0,022	0,012	0,2	0,0002
Resultat (bakt/ml)	4.300	2.000	19.000	20.000	140	2.500.000

a) Understregede tal er medtaget i beregningerne

b) UT = Utællelig

c) Dette tal er mistænkeligt og  $\chi^2$ -test viser, at det ikke bør medtages i resultatberegningen (se ref. 6, kap. 3).