

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen

Nr. 9 1990

Miljøstyrelsens 4.
mikrobiologiske
metodeafprøvning

Miljøministeriet **Miljøstyrelsen**

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

54.08 : 562.28

32

28.2

2870

Arbejdsrapport fra Miljøstyrelsen, nr. 9/1990

Miljøstyrelsens
4. mikrobiologiske
metodeafprøvning

Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden,
Odense

MILJØSTYRELSEN
BIBLIOTEKET
Strandgade 29
1401 København K

Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

INDHOLDSFORTEGNELSE

	SIDE
1. INDLEDNING	1
2. GENNEMFØRELSE	5
3. RESULTATER	8
4. KONKLUSIONER	17
5. REFERENCER	20
6. BILAGSFORTEGNELSE	21

1. INDLEDNING.

Gær- og skimmelsvampe er universelt forekommende mikroorganismer, der findes i jord, vand og på grund af deres formeringsmåde i luften over hele jordkloden. Da mange mikrosvampes naturlige habitat er plantedele, er mikrosvampene almindeligt forekommende kontaminanter i fødevarer, hvor mange arter er i stand til at producere toxiske metabolitter. Mens svampeforekomst i fødevarer og dennes betydning for varens holdbarhed og sundhedsmæssige status har været kendt i mange år, er drikkevands indhold af mikrosvampe først for nylig kommet i søgelyset, og det skønt nogle af disse er i stand til at fremkalde organoleptiske forandringer af vandet og påføre mennesker og dyr sygdom ved indtagelse eller anden brug af drikkevand.

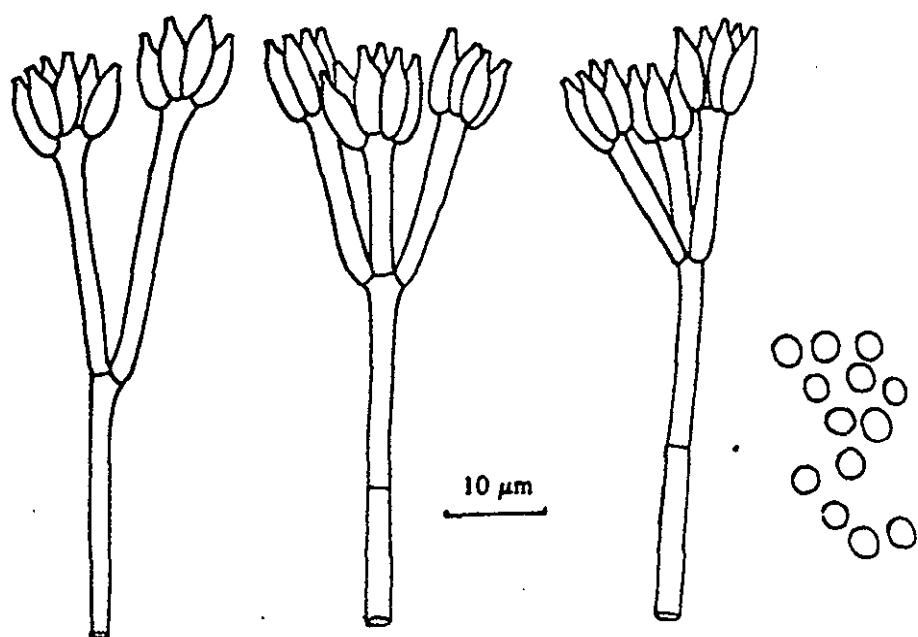
Mikrosvampe er ikke kun lokaliseret til råvand, men kan findes i drikkevand mange forskellige steder i ledningsnettet, såvel i kloreret som i ikke kloreret vand.

Nogle af de i vand naturligt forekommende mikrosvampe er uskadelige i sundhedsmæssig henseende, mens andre kan fremkalde sygdom, f.eks. *Phialophora* og *Acremonium*, der begge har allergene egenskaber. *Phialophora* er i stand til at fremkalde rødme og kløe af huden ved kar- og brusebadning. *Phialophora*-, *Acremonium*- og *Penicillium*arter hører til blandt de mikrosvampe, der hyppigst isoleres fra drikkevand, hvorfra skimmelsvampe isoleres hyppigere end gærsvampe.

Skimmelsvampene inddeltes i 3 grupper Zygomycetes, Ascomycetes og Deuteromycetes eller Fungi Imperfecti. Deuteromycetes inddeltes på basis af conidiumdannelsen i Coelomycetes og Hyphomycetes. *Penicillium*, *Acremonium* og *Phialophora* tilhører Hyphomycetes.

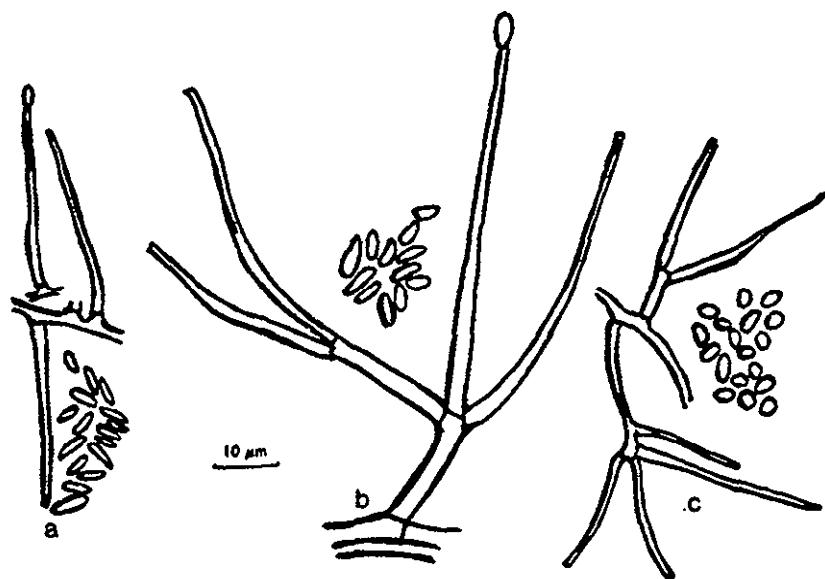
Formeringen sker ved conidiogenesis. Conidia dannes på en specialiseret celle (conidiogen celle). Den conidiogene celle dannes enten i eller på en vegetativ hypha eller på differentierede støttestrukturer (grene). Hele systemet af fertile, specialiserede hyphae kaldes conidiophor. En phialide er en conidiogen celle, der producerer conidier fra basis, uden at phialiden selv øges i længden, mens en collarette er en kopformet struktur på apex af phialiden. Se figur A, B og C.

FIGUR A



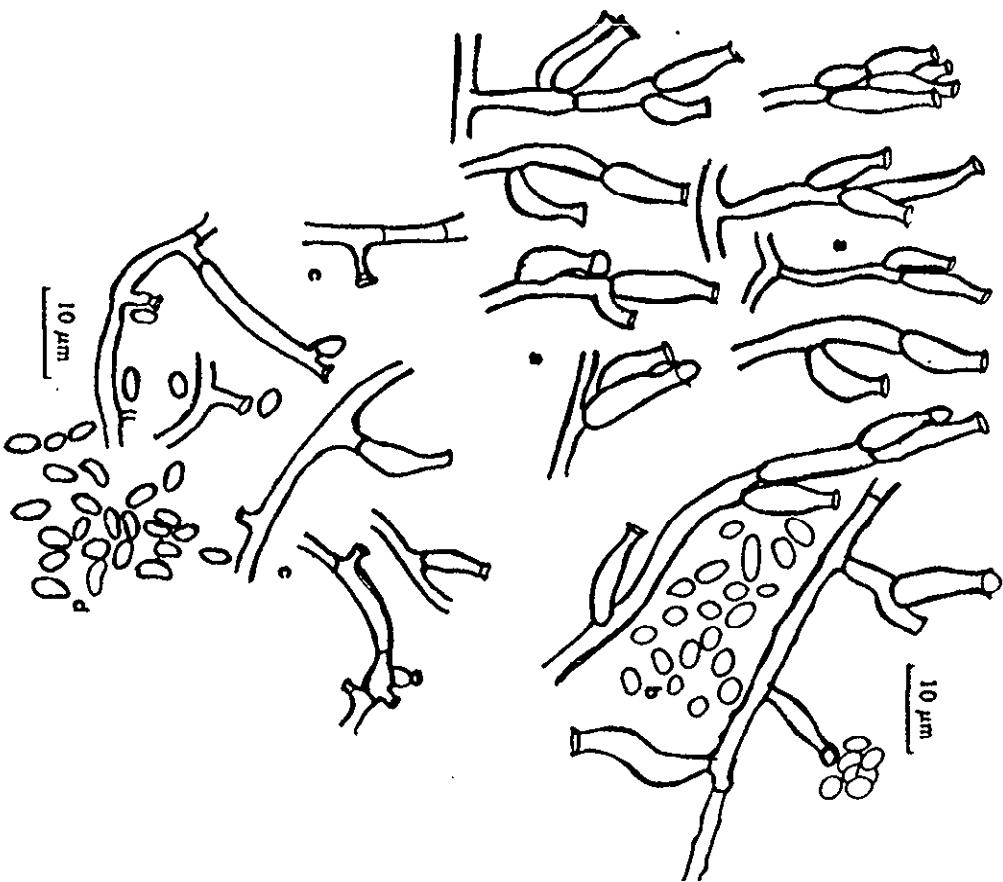
Penicillium corylophilum. Conidiophores and conidia.

FIGUR B



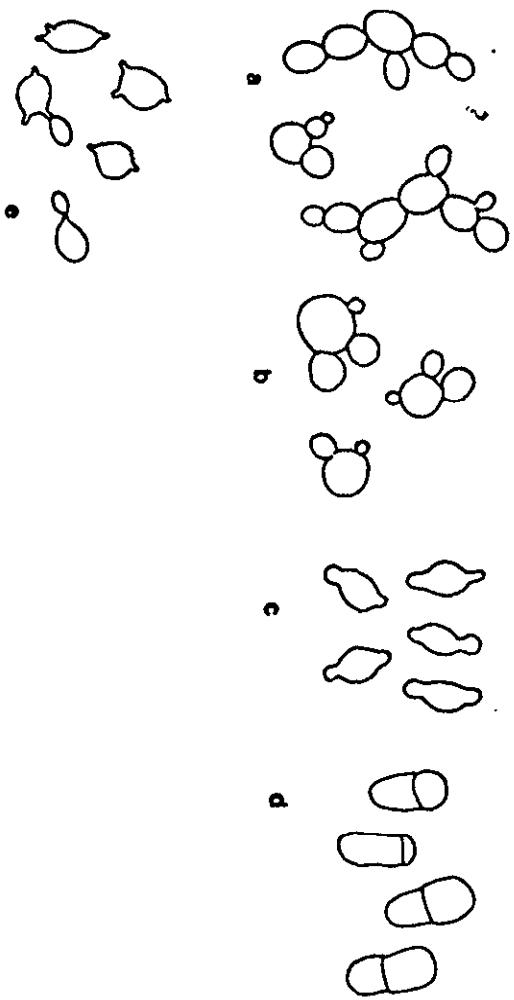
Conidiophores, phialides and conidia of a. *Acremonium strictum*; b. *Acremonium buzyri*; c. *Acremonium charticola* (orig. W. Gams)

FIGUR C



a-b. *Phialophora festigata*. Phialides with collarettes and conidia; c-d. *Phialophora hoffmannii*. Phialides with collarettes and conidia.

FIGUR D



Vegetative reproduction in the yeasts. a-c. budding; a. clusters of cells. b. multilateral budding; c. bipolar budding; d. fission.
e. buds on short stalks.

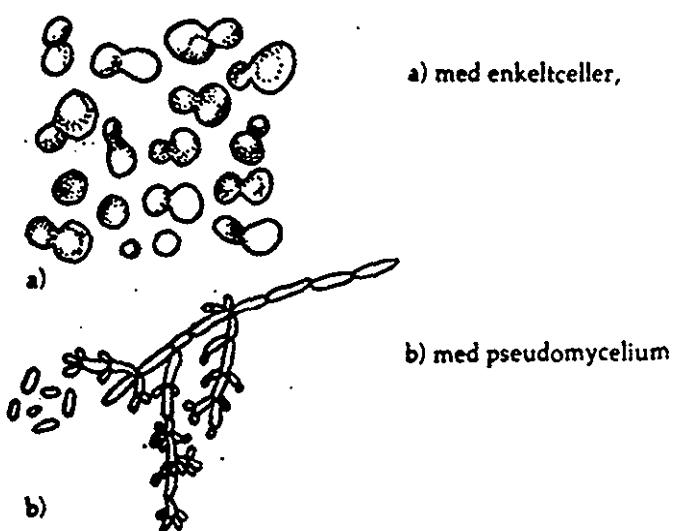
Gærsvampe er generelt defineret som encellede svampe, der reproducerer sig vegetativt ved knopskydning. Nogle gærsvampe er dog også i stand til at reproducere sig sexuelt. Knopskydningen (figur D.a,b,c) starter med, at der kommer en udposning eller knop på cellevæggen. Denne knop kan så afstødes fra modercellen, mens den endnu er lille eller først, når begge celler er lige store. I nogle tilfælde kan flere generationer af knopper være sammenhængende (figur D. a). Nogle gærarter producerer knopper hvor som helst på cellen (multilateral knopskydning - figur D.b), mens andre producerer dem ved polerne (bipolar knopskydning - figur D.c), og efter andre kun danner knopper et enkelt sted på cellen (monopolar knopskydning).

Der er 3 genera af gærsvampe, der ikke formerer sig ved hjælp af knopskydning. Disse er *Schizosaccharomyces*, der reproducerer sig ved hjælp af fission (figur D.d) samt *Sterigmatomyces* og *Fellomyces*, der danner knopper på korte stilke (figur D.e).

Under visse betingelser kan mange gærsvampe producere filamenter. Disse inddeltes i to typer og benævnes septerede hyphae og pseudohyphae. Septerede hyphae gror ved forlængelse af enden, hvorefter der dannes en skillevæg (septum), mens pseudohyphaedannelsen sker ved knopskydning (se nedenstående figur). Filamentdannelse kan iagttages mikroskopisk efter 7-14 dages inkubation.

Med hensyn til den videre identifikation af gær- og skimmelsvampe henvises til litteraturen om dette emne, idet identifikationen for skimmelsvampenes vedkommende bl.a. baserer sig på den kønnede formeringsform, den ukønnede formeringsform og myceliets struktur, mens den for gærsvampenes vedkommende baseres på både morfologiske og fysiologiske karaktertræk.

GÆRSVAMPE



2. GENNEMFØRELSE AF 4. METODEAFPRØVENING.

Miljøstyrelsen meddelte i skrivelse af 6. juli 1989 gennemførelsen af 4. mikrobiologiske metodeafprøvning på vandprøver i uge 38, 1989. Tillige blev der givet kodenumre.

Den 30. august 1989 fremsendtes vejledningen fra Miljø- og Levnedsmiddelkontrolenheden, Odense (bilag 1).

Den 18. september 1989 blev analysematerialet afsendt fra MLK, Odense som ekspres og rekommanderet forsendelse til forventet modtagelse på samtlige deltagende laboratorier den 19. september 1989 inden kl. 10.00. Af bilag 2 fremgår hvilke laboratorier, der modtog analysematerialet udenfor den forventede tidsramme.

Ved denne metodeafprøvning anvendte laboratorierne udelukkende egne substrater, reagenser og membranfiltre. Hvad angår fortyndingsvæskken har kun 2 laboratorier (lab. nr. 3 og 39) angivet en eventuel afvigelse fra Svensk Standard, mens lab.nr. 12 ikke har udfyldt skemaet. Lab.nr. 39 har angivet, at afvigelsen bestod i, at fortyndingsvæskken ikke er fordelt på flasker á 90 ml., men forblev i 1 l. flasker. De øvrige laboratorier har angivet at have fremstillet fortyndingsvæske efter forskriften i Svensk Standard. Af bilag 3 fremgår hvilke antibiotica, laboratorierne har angivet at have anvendt. Af bilag 4 fremgår hvilke mærker af Rose Bengal substrat, der er angivet at være brugt. Af bilag 5 fremgår hvilke fabrikater af filtre, der er angivet at være anvendt. Af bilag 6 fremgår med hvilke hjælpemidler, kolonitælling er oplyst at være foretaget, og af bilag 7 fremgår hvorledes de i metodeafprøvningen brugte tragte er angivet at være rengjort. Af disse bilag fremgår endvidere de af laboratorierne oplyste afvigelser fra Svensk Standard, SS 02 81 92.

I metodeafprøvningen deltog 51 laboratorier. 39 levnedsmiddelkontrolenheder, 7 STP-autoriserede laboratorier og 5 laboratorier med særlig laboratoriefunktion (bilag 8).

Koncentraternes kodenummer og indhold.

Der udsendtes ialt 6 koncentrater. Disse benævntes 9, 15, 22, 37, 48 og 59. Alle blev sendt til samtlige deltagende laboratorier, og hvert koncentrat

inneholdt 9 ml., der var fremstillet ved tilslætning af testkulturer til transportmediet, der bestod af phosphatmagnesiumbuffer uden tilslætning af borsyre. Koncentraterne blev fremsendt nedkølede.

Testkulturer.

1. *Penicillium corylophilum*.
2. *Saccharomyces uvarum*.
3. *Acremonium sp.*
4. *Phialophora sp.*

Af karakteristika for disse testkulturer skal nævnes:

- *Penicillium corylophilum* danner på RB-substratet efter Svensk Standard store, udflydende, flade kolonier, der evt. har et hvidt centrum, og af og til kan der iagttages en krateragtig indsænkning i midten. Kolonierne konfluerer ofte i løbet af få dage, og der er tydelig myceliedannelse.
- *Saccharomyces uvarum* danner på RB-substratet efter Svensk Standard rødlige kolonier med tydelig hvid top. Der er ingen myceliedannelse.
- *Phialophora sp.* danner på RB-substratet efter Svensk Standard rødlige, toppede kolonier med hvidt, vattet centrum (mycelium). Den kan også være brun-, grøn - eller sortpigmenteret, eller den kan fremtræde helt rød og meget lille og derfor være vanskelig at iagttage makroskopisk.
- *Acremonium sp.* danner på RB-substratet efter Svensk Standard rødlige flade kolonier med hvidt, vattet centrum (mycelium).

De i denne metodeafprøvning anvendte mikrosvampe er isoleret fra brøndvand og vandværksvand med undtagelse af *Saccharomyces uvarum*, der er erhvervet fra Carlsberg Forskningscenter.

Karakteristisk for svampe er, at kolonimorfologien (form, pigmentering og størrelse) afhænger meget af det anvendte substrat, endvidere af antallet af svampekolonier pr. arealenhed. Således er der under forarbejdet til metodeafprøvningen konstateret forskellig kolonimorfologi alt efter hvilken Rose Bengal agar, disse blev dyrket på, idet selv små afvigelser i sammensætningen af substratet er nok til, at en svamp ændrer udseende. Generelt var substratet lavet efter Svensk Standard det letteste at tælle svampeko-

lonier på, idet svampene her var mere adskilte, mens pigmenteringen af f.eks. Phialophora var mindre god. Denne antog oftest substratets farve, var meget lille og som tidligere nævnt ofte vanskelig at iagttage makroskopisk.

Acremoniums samt Phialophoras mycelium kunne ligeledes under visse omstændigheder være vanskeligt at iagttage makroskopisk, men manglede aldrig ved mikroskopisk undersøgelse (stereomikroskopi).

Allerede efter to dage kunne der tit iagttages begyndende svampevækst på pladerne, væksten var på dette tidspunkt tydeligst for Penicilliums og Saccharomyces's vedkommende, mens Acremonium og Phialophora var meget små. Efter syv dages inkubation var Penicillium ofte vanskelig at aflæse på grund af konfluerende kolonier, også selv om det drejede sig om meget få (7-10) kolonier.

Prøvernes sammensætning.

Koncentrat 9 er identisk med koncentrat 22 og blev fremstillet med henblik på, at der i de færdige prøver 9 og 22 ville være et skimmelindhold på ca. 50 cfu pr. 100 ml.

Prøve 9 = prøve 22: ca. 50 Acremonium sp. pr. 100 ml.

Koncentrat 15 er identisk med koncentrat 37 og blev fremstillet med henblik på, at der i de færdige prøver 15 og 37 ville være et skimmelindhold på ca. 200 cfu pr. 100 ml. samt et gærindhold på ca. 200 cfu pr. 100 ml.

Prøve 15 = prøve 37: ca. 200 Phialophora sp. pr. 100 ml. samt ca. 200 Saccharomyces uvarum pr. 100 ml.

Koncentrat 48 er identisk med koncentrat 59 og blev fremstillet med henblik på, at der i de færdige prøver 48 og 59 ville være et skimmelindhold på ca. 1.000 cfu pr. 100 ml.

Prøve 48 = prøve 59: ca. 1.000 Penicillium corylophilum pr. 100 ml.

Koncentraternes homogenitet under aftapning af disse til udsendelse er undersøgt. Resultatet fremgår af bilag 9.

Temperaturen i testmaterialet ved laboratoriernes åbning af containeren fremgår af oversigten (bilag 10) samt af søjlediagrammet (bilag 11).

3. RESULTATER.

Laboratoriernes analyseresultater skulle være Miljøstyrelsen i hænde senest den 3. oktober 1989.

Den 16. november 1989 fremsendtes udskrift af de modtagne rådata (bilag 12) til samtlige deltagende laboratorier. Det enkelte laboratorium havde på denne måde mulighed for at sikre, at de resultater, som var afsendt fra pågældende laboratorium, var korrekt indlæst.

2 resultater blev korrigert, nemlig lab.nr. 1, prøve 9, gær, hvor tallet blev rettet fra <0 til <1, og lab.nr. 10, prøve 9, skimmel, hvor tallet 56 blev rettet til 50.

Den grafiske fremstilling af resultaterne fremgår af bilag 13.

Prøve 9 og 22.

Laboratorierne genfinder svampeniveauet i prøve 9 og 22 med ganske få undtagelser, ligesom der er god overensstemmelse mellem resultaterne af de 2 prøver indenfor det enkelte laboratorium. Mange laboratorier har imidlertid antaget den i prøverne værende skimmelsvamp, Acremonium for en gærsvamp, og en del har tilsyneladende medtaget forurenere i resultatangivelsen og/eller tolket Acremonium som værende både gær- og skimmelsvamp.

Prøve 9.

12 laboratorier har påvist gær i det forventede Acremoniumniveau, mens niveauet hos lab.nr. 7 er forhøjet. Af disse 13 laboratorier har 6 laboratorier (lab.nr. 8, 9, 30, 35, 37 og 54) ikke påvist skimmel i denne prøve. De pågældende laboratorier har antaget Acremonium for en gærsvamp. De resterende 7 laboratorier (lab.nr. 6, 7, 27, 28, 32, 40 og 50) har i denne prøve ligeledes antaget Acremonium for en gærsvamp og har yderligere påvist et meget lavt skimmelniveau, hvorfor det må antages at disse laboratorier har medtaget forurenere i resultatangivelsen og/eller tolket Acremonium som værende både en gær- og skimmelsvamp. 2 laboratorier (lab.nr. 17 og 33) finder i denne prøve et noget højt skimmelniveau.

Prøve 22.

12 laboratorier har påvist gær i det forventede Acremoniumniveau, mens

niveauet hos lab.nr. 17 er meget forhøjet, både hvad angår gær- og skimmelsvampe, og lab.nr. 29, 43 og 50 har fundet gærindhold i et lavt niveau (antagelig forurenere) og skimmel i det forventede niveau. Af de førstnævnte 12 laboratorier har 8 (lab.nr. 6, 8, 9, 27, 30, 35, 37 og 54) ikke påvist skimmel. De pågældende laboratorier har antaget Acremonium for gær. Af de resterende 4 laboratorier har 3 (lab.nr. 28, 32 og 40) fundet et meget lavt skimmelniveau, og det må antages at forurenere er talt med og/eller Acremonium er antaget for både gær og skimmel. Et laboratorium (lab.nr. 7) har fundet næsten lige mange gær- og skimmelsvampe. 4 laboratorier har fundet et forhøjet skimmelniveau. Disse er lab.nr. 31, 33, 36 og det tidligere nævnte lab.nr. 17.

Prøve 15 og 37.

I prøverne 15 og 37 genfindes svampeniveauet i noget mere varierende grad, ligesom der for enkelte laboratoriers vedkommende er mindre god overensstemmelse mellem resultaterne af de 2 prøver. Det har igen været et problem at skelne mellem gær- og skimmelsvampe, og enkelte laboratorier har tilsyneladende også i dette tilfælde medtaget forurenere i resultatangivelsen.

Prøve 15.

3 laboratorier finder ingen gærsvampe i denne prøve, og 2 af disse (lab.nr. 35 og 50) finder ret lavt skimmelindhold, mens lab.nr. 55, hverken har fundet gær eller skimmel. Yderligere 5 laboratorier (lab.nr. 8, 23, 30, 41 og 54) har ikke fundet skimmel i prøven. Alle disse har fundet et højt gærindhold, således at Phialophora åbenbart er blevet antaget for en gærsvamp. 2 laboratorier (lab.nr. 28 og 38) har tilsyneladende medtaget forurenere i resultatangivelsen af skimmel. Lab.nr. 28 har forhøjet gærindhold, mens lab.nr. 38 har lavt gærindhold. Lab.nr. 7 har meget forhøjet skimmelindhold, mens gærindholdet svarer til det forventede niveau. Lab.nr. 13 har fundet både lavt skimmel- og gærindhold, mens 5 laboratorier (lab. nr. 11, 18, 32, 34 og 37) har fundet lavt skimmelindhold.

Prøve 37.

4 laboratorier (lab.nr. 34, 35, 50 og 55) har ikke fundet gær i denne prøve, heraf har lab.nr. 55 fundet et meget højt skimmelindhold. Saccharomyces uvarum er antaget for skimmel, mens de 3 øvrige har fundet skimmelindhold i det forventede niveau eller lavere niveau. 5 laboratorier (lab. nr. 8, 23,

30, 41 og 54) har ikke fundet skimmel, heraf har lab.nr. 8, 23, 30 og 41 fundet et tilsvarende højt gærniveau. Phialophora er her antaget for en gærsvamp. Lab.nr. 7 har både lavt gær- og skimmelindhold, mens lab.nr. 11, 13, 18, 21, 25, 28, 32, 37 og 38 har fundet et lavt skimmelindhold. Dette kan for 7 af disse laboratoriers vedkommende skyldes, at Phialophora har været mindre udviklet på grund af substratkonkurrence med gær, og derfor vanskelig at iagttage makroskopisk, mens lab.nr. 28 og 38 nok har medtaget forurenere i resultatangivelsen, da skimmelindholdet er meget lavt.

Prøve 48 og 59.

Laboratorierne genfinder indbyrdes niveauer af *Penicillium corylophilum* i varierende grad, mens der generelt er bedre overenstemmelse mellem resultatene af de to prøver indenfor samme laboratorium. Mange laboratorier har oplyst, at kolonierne var vanskelige at tælle, idet de var meget konfluerende. Et laboratorium (lab.nr. 29) har antaget *Penicillium corylophilum* for en gærsvamp, mens 3 laboratorier (lab.nr. 42, 48 og 49) tilsyneladende har medtaget forurenere (gærsvampe) i den ene eller begge prøver i resultatangivelsen. Lab.nr. 30 har ikke regnet cfu/100 ml ud, mens lab.nr. 23, prøve 59 har angivet, at alle plader var overvoksede.

Laboratoriernes kommentarer til 4. metodeafprøvning samt bemærkninger til egne resultater.

Kodenummer:

Lab.nr. 1: "Prøverne er observeret på 3., 5., og 7. dag. Prøve 48 og 59 er talt på 3. dagen. På 7. dagen kunne der heller ikke tælles på 10 ml. filtrene".

Lab.nr. 2: "Konfluens af skimmelkolonier; usikker aflæsning af antal kolonier. - spec. på 100 ml. filter på prøve 9 og 22".

Lab.nr. 4: "1. Ad forskrift 6.3. Af ingrediensfortegnelsen bør direkte fremgå det ønskede indhold pr. liter af de to antibiotica.

2. Tællegrænser. Forskriften mangler angivelse af min. og max. antal kolonier pr. filter, der skal tælles, og som skal danne udgangspunkt for beregning af cfu/100 ml.

3. Ved prøve 15 og 37 - skimmel skønnedes, at kolonitællingen på 100 ml. filtrene var behæftet med betydelig usikkerhed som følge af det høje antal gærkolonier. Derfor indgår kun kolonital fra 1 ml. og 10 ml. filtrene ved beregning af cfu/100 ml.

4. Prøve 48 og 59 - tælling af skimmel. Tælling foretaget efter 3 og 5 døgn. - Ved sidstnævnte tælling sås begyndende konfluens. Efter 7 døgn var tælling ikke mulig".

Lab.nr 6: "Det foreslås at ændre inkubationstiden til 4-5 døgn, da den lange inkubationstid i forslaget medfører, at såvel gær- som skimmelsvampekolonier bliver så store, at de konfluerer og derved vanskeliggør (umuliggør) aflæsning/tælling af pladerne. Prøve 48 og 59: Antal skimmelkolonier er skønnet, da kolonierne konfluerede".

Lab.nr. 7: "Inkubationstiden på 7 døgn synes i flere tilfælde at være for lang. Aflæsning efter 5 døgn og geninkubering i yderligere 2 døgn af plader med ringe eller ingen vækst synes mere hensigtsmæssig. Ved kun 2 døgns geninkubering er et eventuelt problem med "datterkolonier" næppe af betydning.

Prøve 15: På "10 ml. filter" dækkede gærkolonierne en del skimmelkolonier.

Prøve 22: På 100 ml. filtrer var gærkolonierne næsten sammenvoksede, d.v.s. dækker formentlig over skimmelkolonier".

Lab.nr. 9: "Laboratoriet har sideløbende med metodeafprøvningen på Rose Bengal - agar fremstillet efter Svensk Standard foretaget en undersøgelse af de fremsendte vandprøver på kommercial Rose Bengal - agar. Resultat af denne prøve, der er foretaget som enkeltbestemmelse vedlægges.

Kommerciel Rose Bengal-agar:

Fabrikat: Oxoid CM 549.

Batchnr.: 034 37806/12-91.

Tilvirkningsdato: 18.09.1989.

Tilsætning som til Svensk Standard.

Substrat

efter Svensk 59 1 230 62 52 <1 252 54 <1 1050 <1 1300

Standard

Kommerziel

Rose Bengal 64 <1 238 187 53 <1 259 180 <1 1200 <1 1700
agar

På færdigsubstratet ser gærsvampene anderledes ud end på substratet fra Svensk Standard. De ligner mere skimmelsvampe.

Prøve 9 og 22 er farvet og mikroskoperet, da der opstod tvivl om det var gær - eller skimmelsvampe".

Lab.nr. 10: "Prøve nr. 15 og 37.
Skimmel intet den 22/9.
Fremvokset den 25/9".

Lab.nr. 13: "Kolonimorfologi meget forskellig på OGYE og Rose-Bengal. Myceliedannelse ses først i disse prøver efter 3 dage, og før på OGYE end på Rose-Bengal. Der mangler en præcis forskrift for, hvordan der kan skelnes mellem pseudomycelium (f.eks. Candida) og skimmelsvampe med ringe myceliedannelse. Der kan opstå tvivlssituationer".

Lab.nr. 16: "Ved prøverne 15 og 37, gærsvampe, er alle resultater medtaget ved gennemsnittet, da der ikke er angivet en øvre grænse".

Lab.nr. 17: "Hvis pladerne havde været talt tidligere - inden 7 døgn, havde det sandsynligvis været muligt at tælle på 10 ml. filtrerne.

Næringssubstratet bør have en sammensætning, der svarer til de kommersielt tilgængelige tørsubstrater. Det bør være muligt at foretage aflæsning før det 7. døgn. Evt. bør agarpladerne inkuberes med bunden opad. Ved opgivelse af resultat kan det så meddeles, om aflæsningen er foretaget efter f.eks. 4 eller 7 døgns inkubering".

Lab.nr. 20: "Prøve nr. 48: Under fremstillingsproceduren af prøven slog magneten et lille hul i siden af kolben efter 5 min. omrøring, under pkt. 6 (omrøring i 1.000 ml. prøve). Herved gik ca. 30 ml. prøve tabt (beregnet mængde)".

Lab.nr. 21: "Skal koloniudregning gøres specielt? Kan vi ikke anvende samme princip som til kintælling. Bruges kolonitallene mellem 20 og 200 osv.

Ved yderligere identifikation har vi fundet følgende:

Prøve 9 + prøve 22: Cladosporium + Fusarium.

Prøve 15 + prøve 37: Gær + Cladosporium + Fusarium.

Prøve 48 + prøve 59: Penicillium".

Lab.nr. 23: "Det er ikke angivet, hvad pH skal være i skylleopløsningen (6,1). Der er endvidere angivet, at opløsningen skal fyldes på flasker med 90 ± 2 ml., uden at der er begrundelse eller behov for det.

Det er anført, at om nødvendigt tælles ved hjælp af stereomikroskop (pkt. 8,3). Der er ikke anført, hvor mange kolonier, det er rimeligt at tælle. Vi har kunnet tælle over 1.000 kolonier, men mener, at det er for stort et tal at tælle".

Lab.nr. 26: "Rent statistisk burde plader med et meget lille antal CFU ikke medregnes".

Lab.nr. 28: "Observation af pladerne efter 5 døgn kunne formentlig afhjælpe tællingsusikkerhed jvf. bemærkninger til resultater.

7 døgns inkubation gav i flere tilfælde kraftig og sammenflydende vækst med deraf følgende aflæsningsusikkerhed".

Lab.nr. 29: "Metoden er let at arbejde med.

Rose Bengal agar giver tydelige adskilte kolonier uden megen spredning. Let at tælle.

Det er meget vanskeligt at arbejde med kloramfenikol. Selv ved en temperatur på 1°C, og anvendelse af buffer var det umuligt at undgå udfældninger efter kort tids forløb. Derfor er anvendt en præfabrikeret kloramfenikolopløsning fra DAK i form af en 0,5% opløsning af kloramfenikoløjendråber".

Lab.nr. 30: "Ønsker farvningsmetoder til mikroskopisk undersøgelse af gær og skimmel".

Lab.nr. 32: "Det ville være rart, hvis indhold af antibiotica var den samme for forskellige forskrifter for brug af Rose Bengal.
Der bør angives en øvre grænse for tælling af kolonier.

Gær på prøve 48 og 59: Det kan ikke med sikkerhed siges, om der er 0 gærsvampe på 10 og 100 ml filtre, da disse jo var totalt gennenvoksede med skimmel".

Lab.nr. 35: "Prøve nr. 15: 100 ml. prøve kun påhældt et filter.
Prøve nr. 48 og 59: Meget sammenvoksede kolonier".

Lab.nr. 38: "Punkt 8.2 i Svensk Standard SS 02 81 92: Inkubera filtren på substrat ved $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ under 7 dygn. Dette punkt forstår således, at pladerne skal tilses og aflæses indenfor 7 døgn.

Resultatet opgivet for prøve nr. 48 og 59 er aflæst efter 3 døgn.

Resultatet opgivet for prøve nr. 9, 22 og 37 er aflæst efter 4 døgn.

Resultatet opgivet for prøve nr. 15 er aflæst efter 6 døgn".

Lab.nr. 39:" 1. Slut pH på Sköljningsvätska (6.1) mangler.
2. Slutkoncentrationen af antibioticaopløsningerne i det færdige substrat mangler.
3. Det fremgår ikke hvad forskellen er på spädningvätska og sköljningsvätska, hvis der er nogen?
4. Vi har brugt 9 cm petriskåle til R.B. plader".

Lab.nr. 40: "Prøve nr. 15: 100 ml.: Svær at tælle. Mange gærsvampe til dels overvokset af skimmelvampe.

Prøve 48: Ingen gærceller synlige. 100 ml. og 10 ml. prøver overvokset. Skimmelvampetal i 1 ml. prøve anslæt p.g.a. nogen sammenflydning af kolonierne.

Prøve 59: Kommentar som prøve 48.

Prøve 37: 100 ml.: Gærsvampe på grænsen af det tællelige. Skimmelvampene voksende i en sammenhængende ring yderst på filteret.

Lab.nr. 41: "Vedrørende prøve 15 og 27: To forskellige typer gærceller forekommer".

Lab.nr. 42: "Prøve 37: Skimmel over det meste af pladen på 1 ml. + 10 ml.
Prøve 59: Overvokset hvid skimmel på plade med 10 ml."

Lab.nr. 47: "7 døgn er for lang tids inkubation, da en del af filtrene var overvoksede. En mellemtælling efter f.eks. 4 døgn ville være ønskelig".

Lab.nr. 50: "Vi finder det uhensigtsmæssigt at foretage en metodeafprøving på en forskrift, hvori der bruges giftige og kræftfremkaldende stoffer. Vi tænker specielt her på Chloramphenicol, som bruges i Rose Bengal agar, og vil gerne henvise til arbejdstilsynets kampagne angående udskiftning af kræftfremkaldende stoffer med mindre farlige stoffer".

Lab.nr. 53: "Penicilliumkolonierne i prøve 48 og 59 voksende ind i hinanden og var vanskelige at tælle".

Lab.nr. 54: "Prøve 9-15-37 indeholdt på aflæsningsdagen gær - lignende kol. Ved videre udpodning på andet medium fremtrådte disse kol. som skimmel".

Lab.nr. 55: "I prøverne 48 og 59 kunne 10 ml. og 100 ml. ikke tælles, fordi kolonierne var store, burde måske tælles tidligere".

4. KONKLUSIONER.

1.

Laboratorierne genfinder indbyrdes med ganske få undtagelser svampeindholdet i prøverne 9 og 22, og der er generelt god overensstemmelse mellem det fundne niveau i disse prøver indenfor samme laboratorium.

Genfindelse af svampeniveaueret i prøverne 15 og 37 samt 48 og 59 er sket i mere varierende grad, ligesom overensstemmelsen mellem de fundne niveauer i disse prøver indenfor samme laboratorium er mindre god, når det drejer sig om prøve 15 og 37, men bedre hvad angår prøve 48 og 59. Med hensyn til prøve 48 og 59 angav mange laboratorier, at kolonierne var meget konfluerende og derfor svære at tælle. I prøve 15 og 37, der hver indeholdt 2 testkulturer, nemlig *Saccharomyces uvarum* samt *Phialophora*, har der mellem disse 2 svampe været substratkonkurrence, hvorpå den ene, i dette tilfælde sandsynligvis *Phialophora*, har været hemmet i væksten og derfor vanskelig at iagttagte makroskopisk. Stereomikroskopi er således ofte nødvendig ved kolonitælling.

2.

Resultaterne af prøverne 9 og 22 samt 15 og 37 har vist, at det har været vanskeligt for laboratorierne at skelne mellem gær- og skimmelsvampe, idet *Acremonium* og *Phialophora* af mange er blevet antaget for gærsvampe, mens *Saccharomyces uvarum* i et enkelt tilfælde er blevet antaget for en skimmelvamp. I prøverne 48 og 59 er *Penicillium corylophilum* i et enkelt tilfælde blevet registreret som værende en gærsvamp.

3.

I prøverne 9 og 22 samt 15 og 37 har en del laboratorier medtaget forurenere i resultatangivelsen eller regnet de i disse prøver værende testkulturer som både gær- og skimmelsvampe. For at skelne mellem gær og skimmel bør der f.eks. anvendes stereomikroskopi, og for at undgå at medtage forurenere i resultatangivelse må man være opmærksom på, hvorledes svampeantallet fordeles sig på 1-10- og 100-ml filtrene, samt medtage en kontrolplade ved vurderingen.

Anvendelse af UV-lys, filtrering af vandprøver i rum med udsugning (stinksak) og omhyggelig rengøring af inventar samt materialer er medvirkende til at mindske risikoen for forurenning af prøverne.

4.

Hvad angår substrat- og antibioticavalg, valg af membranfiltre, rengøringen af tragtene samt de anvendte hjælpemidler ved kolonitælling, giver dette et meget varieret billede, idet laboratorierne har håndteret dette på meget forskellig vis og ikke altid fulgt anvisningerne i Svensk Standard.

5.

Der er en del afrundings-/skrive- samt regnefejl, ligesom udregningen af cfu/100 ml., ikke altid er foretaget. Angivelse af negativt resultat er ligeledes gjort på forskellig vis. Dette gøres korrekt som <1.

6.

Næsten alle laboratorierne havde bemærkninger til 4. metodeafprøvning, enten i form af kommentarer til egne resultater eller som bemærkninger til Svensk Standard.

Et af de største problemer ved metoden var, at skimmelkolonierne i prøve 48 og 59 var meget konfluerende som følge af den lange inkubationstid, og derfor vanskelige at tælle, hvorfor mange laboratorier ønsker inkubationstiden nedsat til 3-4-5 døgn.

På grundlag af laboratoriernes bemærkninger til Svensk Standard, fremhæves endvidere følgende punkter:

a)

Der ønskes angivelse af en øvre og nedre tællegrænse for antal kolonier pr. filter.

b)

Af ingrediensfortegnelsen bør direkte fremgå det ønskede indhold pr. liter af de to antibiotica (slutkoncentrationen).

c)

Det ønskes, at antibioticainneholdet er det samme i alle Rose Bengal forskrifter.

d)

Der er problemer med kloramfenicol, der udfelder let, dels findes det uhensigtsmæssigt af anvende et kræftfremkaldende og giftigt stof ved en metodeafprøvning.

e)

Det ønskes angivet, hvad slut-pH skal være i skylleopløsningen. Der ønskes en begrundelse for, hvorfor opløsningen skal fyldes på flasker med 90 ± 2 ml. Det ønskes angivet, om skyllevæske og fortyndingsvæske er den samme.

f)

Næringssubstratet bør have en sammensætning, der svarer til kommersielt tilgængelige tørsubstrater.

g)

Der er forskel på Rose Bengal agar fremstillet efter Svensk Standard og kommersiel Rose Bengal agar (OXOID), idet Rose Bengal agaren efter Svensk Standard får visse skimmelsvampe til at præsentere sig som gærsvampe.

h)

Agarpladerne bør inkuberes med bunden opad.

i)

Metoden er let at arbejde med. Rose Bengal agar giver tydelig adskilte kolonier, der er lette at tælle.

j)

Der ønskes en forskrift på, hvorledes der kan skelnes mellem pseudomycelium og skimmelsvampe med ringe myceliedannelse.

k)

Der ønskes farvningsmetoder til mikroskopisk undersøgelse af gær og skimmel.

7.

Ved en eventuel udgivelse af Svensk Standard SS 028192 som udkast til Dansk Standard vil præciseringer på baggrund af afprøvningen og deltagernes kommentarer blive indarbejdet i dette.

5. REFERENCER.

Samson, Robert A., van Reenen-Hoekstra, Ellen S: 1988 "Introduction to food-borne fungi". Third edition p. 46-55, p. 115-161, p. 210-293. Centraalbureau voor Schimmelcultures, P.O. Box 273, 3740 AG BAARN, The Netherlands.

Åkerstrand, Kerstin: Förekomst av mögelsvampar i dricksvatten. Vår Föda, 1984, volym 36, p. 320-326.

Åslund, Pär: Hudirritationer förorsakade av mikrosvamp. Vår Föda, 1984, volym 36, p. 327-336.

6. BILAGSFORTEGNELSE.

	Side
Bilag 1: Udsendte vejledning fra MLK, Odense.....	22
Bilag 2: Status over forsendelse og modtagelse af analysemateriale...	30
Bilag 3: Anvendt antibiotica.....	31
Bilag 4: Anvendt Rose Bengal agar.....	36
Bilag 5: Anvendte membranfiltre.....	38
Bilag 6: Kolonitælling.....	39
Bilag 7: Rengøring af filterholderens tragt.....	43
Bilag 8: Deltagende laboratorier.....	47
Bilag 9: Homogenitetskontrol.....	49
Bilag 10: Oversigt over temperaturregistrering.....	50
Bilag 11: Søjlediagram over temperaturregistrering.....	51
Bilag 12: Udskrift af modtagne rådata.....	52
Bilag 13: Grafisk fremstilling.....	53



ODENSE

MILJØ- OG LEVNEDSMIDDELKONTROLENHEDEN
LILLE TORNBJERG VEJ 24 . 5220 ODENSE SØ
TLF. 09 13 13 72

DEN 30. august 1989.
J. NR. 7.5-1/84-88.
REF. IS/1b

VEJLEDNING.

Til de deltagende laboratorier i Miljøstyrelsens 4. metodeafprøvning.

Miljøstyrelsen har i skrivelse af 6. juli 1989 meddelt gennemførelse af 4. mikrobiologiske metodeafprøvning på vandprøver i uge 38.

Analysematerialet, der vil blive afsendt mandag den 18. september 1989 i samme container som de 2 koncentrater til interkalibreringen, består af:

Koncentrat 9, 15, 22, 37, 48, 59 = 6 koncentrater á 9 ml til fremstilling 6 simulerede drikkevandsprøver.

De 6 prøver bedes analyseret for indhold af gær- og skimmelsvampe efter:

Svensk Standard SS 02 81 92 Vattenundersökningar - Mikrosvampar i Vatten - Kvantitativ bestämning med membranfiltermetod.

Formålet med 4. metodeafprøvning er at afprøve og vurdere Svensk Standard SS 02 81 92, idet denne forventes udgivet som tilsvarende Dansk Standard.

Idet det tilstræbes at give ensartede betingelser for alle deltagende laboratorier og dermed sikre muligheden for at opnå optimale resultater, skal følgende forhold iagttaages, og vedlagte checkliste udfyldes.

Modtagelsesforhold og opbevaring.

Der henvises til det tilsvarende afsnit i vejledning for interkalibreringen (side 2). Modtagelsestidspunkt, tidspunkt for åbning af containeren samt

den aflæste temperatur bedes noteret på såvel checkliste til interkalibreringen som checkliste til 4. metodeafprøvning.

Prøverne fremstilles og analyseres i numerisk rækkefølge, nemlig 9, 15, 22, 37, 48, 59.

Starttidspunkt for fremstilling af prøve 9 og temperaturen i lokalet noteres.

Det er tidsmæssigt en fordel at fremstille og analysere prøverne parvis. F.eks. startes fremstillingen af prøve 15, når prøve 9 er omrørt i 20 min. D.v.s. at der er 20 min. til membranfiltrering af prøve 9, hvilket skulle være tilstrækkeligt. Når prøve 9 er membranfiltreret, er prøve 15 færdigfremstillet (først når den er omrørt i 30 min.!) og klar til membranfiltrering. Når prøve 15 er membranfiltreret startes fremstillingen af prøve 22 ud fra koncentratet o.s.v.

Fremstilling af de 6 prøver ud fra koncentraterne.

Det er nødvendigt, at laboratorierne øger koncentraternes volumen efter følgende retningslinier:

Udstyr pr. prøve:

1 stk. 1000 ml målekolbe, steril.

1 stk. teflonbelagt magnetstav, størrelse: 40 x 7 mm, steril.

1 stk. magnetomrører.

1 stk. måleglas á 500 ml, steril.

1 stk. 1 ml fuldpipette, steril.

Fortyndingsvæske pr. prøve: 1000 ml

Fremstilling af fortyndingsvæske/skyllevæske (jvf. Svensk Standard 6.1):

Der anvendes destilleret vand eller vand af tilsvarende kvalitet til alle fremstillinger.

a) Phosphatbuffer.

Opløs 3,4 g kaliumdihydrogenphosphat, vandfrit KH_2PO_4 i 50 ml vand.

Juster pH til 7,2.

Tilsæt vand ad 100 ml.

Bemærk: Denne mængde phosphatbuffer er nok til fremstilling af alle 6 prøver.

b) Magnesiumsulfatopløsning.

Opløs 5 g magnesiumsulfat, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ i 100 ml vand.

Bemerk: Denne mængde magnesiumsulfatopløsning er nok til fremstilling af alle 6 prøver.

c) Fortyndingsvæske.

Tilsæt 1,25 ml af opløsning a og 5,0 ml af opløsning b til 1000 ml vand og bland.

Opløsningen autoklaveres ved $121^{\circ}C$ i 20 min (jvf. Svensk Standard).

Bemerk: Såvel før som under brug skal fortyndingsvæsken være kølet ned til $0-5^{\circ}C$.

Fremstillingsprocedure pr. prøve:

1. I en 1000 ml målekolbe anbringes under sterile betingelser en magnet.
2. Ca. 300 ml fortyndingsvæske overføres til kolben.
3. Indholdet i koncentrat mærket nr. 9 (9 ml) blandes ved at foretage 10 dobbeltvendinger, og 1 ml overføres til 1000 ml-kolben.
4. Blandingen omrøres i 10 min. på magnetomrører.
5. Ca. 300 ml fortyndingsvæske overføres til kolben, og der omrøres i 10 min.
6. Den resterende mængde fortyndingsvæske hældes i til 1000 ml mærket på målekolben, og der omrøres efter i 10 min. D.v.s. blandingen omrøres ialt i 30 min. De 1000 ml udgør prøve 9 til analyse.
7. Umiddelbart herefter gennemføres membranfiltrering af denne prøve, som beskrevet i Svensk Standard, drikkevand, d.v.s. 1 x 1 ml, 1 x 10 ml og 2 x 100 ml.
8. Punkterne 1-7 gentages for de øvrige 5 koncentrater.

Analysen.

Af hensyn til bearbejdning af talmaterialet og for at begrænse de arbejdsopgaver, der fremkommer i forbindelse med denne metodeafprøvning, er det væsentligt:

- at fremstilling af de 6 prøver ud fra koncentraterne og membranfiltreringen udføres af én og samme laborant med anvendelse af kortest mulig analysetid, og at resultaterne ligeledes aflæses af denne laborant.

Detaljer vedrørende fremstilling af fortyndingsvæske/skyllevæske, substratfremstilling, filtrering, dyrkning, aflæsning og resultatberegning fremgår af Svensk Standard. Eventuelle afvigelser fra Svensk Standard noteres på den medfølgende checkliste.

Bemærk: De inkuberede filtre må ikke berøres før aflæsningsdagen, da sporer herved kan frigøres og give anledning til yderligere kolonidannelse.

Returnering af resultatet.

Skemaerne (resultatskema samt checkliste) returneres i udfyldt stand til:

Miljøstyrelsen
Att. dyrlæge Holger Pedersen
Kemisk-Toksikologisk kontor
Strandgade 29
1401 København K.

SENEST DEN 03. OKTOBER 1989.

Ved tvivlspørgsmål såvel forud som under metodeafprøvningen rettes henvendelse til:

Dyrlæge Irene R. Simoni
tlf. 66 131372
lokal 5613.

HUSK KODENUMMER PÅ ALLE ARK OG INGEN UNDERSKRIFT.



Irene R. Simoni

Kodenummer: _____

CHECKLISTE TIL 4. METODEAFFPRØVNING.

Husk før modtagelsen:

- at fremstille fortyndingsvæske (jvf. vejledning) og nedkøle denne til 0-5°C.

Modtagelse:

Container modtaget dato: _____ kl. _____
Container åbnet dato: _____ kl. _____
Temperatur i glas med rød tape: _____ °C.

Koncentraterne opbevares ved 0-5°C, indtil det enkelte koncentrat tages i anvendelse.

Undersøgelsen:

Prøverne fremstilles og membranfiltreres i numerisk rækkefølge (jvf. vejledning og Svensk Standard).

Starttidspunkt for fremstilling af prøve nr. 9 dato: _____ kl. _____
Temperatur i lokalet: _____ °C.

Fortyndingsvæske/skyllevæske.

Bemærkninger:

Fremstillet efter Svensk Standard : JA NEJ

Evt. afvigelse fra Svensk Standard : JA NEJ

Tilvirkningsdato: _____

Antibiotica.

Bemærkninger:

Fremstillet efter Svensk Standard : JA NEJ

Evt. afvigelse fra Svensk Standard: JA NEJ

Tilvirkningsdato: _____

Rose Bengal-agar.

Bemærkninger:

Egen fremstilling efter Svensk Standard: JA NEJ

Evt. afvigelse fra Svensk Standard : JA NEJ

Tilvirkningsdato: _____

Rose-Bengal fabrikat: _____

Pepton fabrikat: _____

Kommerciel Rose Bengal-agar.

Bemærkninger:

Fabrikat: _____

Batchnr.: _____

Tilvirkningsdato: _____

Membranfiltre.

Kodenummer: _____

Fabrikat: _____

Bemærkninger: _____

Produktnr.: _____

Batchnr.: _____

Fabrikationsdato: _____

Evt. afvigelse fra forskriften: _____

Filterholder.

1. Filterholderens tragt.

Blev samme tragt anvendt til mere end én prøve ? JA NEJ

- til hvilke prøver anvendtes pågældende tragt ? (angiv prøvenummer/numre på nedenstående skema).

	Prøvenummer						Hvorledes blev tragten rengjort før anvendelsen til pågældende prøve(r)
Tragt "1"							
Tragt "2"							
Tragt "3"							
Tragt "4"							
Tragt "5"							
Tragt "6"							

Kodenummer: _____

2. Filterholderens basis (underdel).

Blev samme basis anvendt til mere end én prøve ? JA NEJ
- til hvilke prøver anvendtes pågældende basis ? (angiv prøvenummer/numre på
nedenstående skema).

	Prøvenummer						Hvorledes blev basis rengjort før an- vendelsen til pågældende prøve(r)
Basis "1"							
Basis "2"							
Basis "3"							
Basis "4"							
Basis "5"							
Basis "6"							

Afgelse fra Svensk Standard iøvrigt:

Bemærkninger til Svensk Standard iøvrigt samt forslag til ændringer af denne:

Kodenummer: _____

RESULTATER AF 4. METODEAFFRØVNING.

<u>Prøve 9.</u>	Antal kolonier på 1 ml filter	Antal kolonier på 10 ml filter	Antal kolonier på 100 ml filter	Antal kolonier på 100 ml filter	cfu/100 ml
Gær					
Skimmel					
<u>Prøve 15.</u>					
Gær					
Skimmel					
<u>Prøve 22.</u>					
Gær					
Skimmel					
<u>Prøve 37.</u>					
Gær					
Skimmel					
<u>Prøve 48.</u>					
Gær					
Skimmel					
<u>Prøve 59.</u>					
Gær					
Skimmel					

Hvorledes taltes kolonierne: (sæt kryds)

Forstørrelsesgrad:

Makroskopisk : _____

Tællekasse : _____

Stereomikroskop : _____

Andet (angiv dette) : _____

Bemerkninger til resultater:

STATUS OVER FORSENDELSE OG MDTAGELSE AF ANALYSEMATERIALE.

Med undtagelse af ganske få laboratorier modtog alle analysematerialet indenfor den forventede tidsramme.

Laboratorier, der modtog analysematerialet udenfor den forventede tidsramme:

Lab.nr.	Container modtaget dato	Container åbnet dato	Temperatur i glas med rød tape	Starttidspunkt for fremstilling af prøve 9 dato	kl.
5	19.9.89	11.45	19.9.89	11.50	3,0°C
25	19.9.89	15.00	20.9.89	10.30	4,5°C
33	18.9.89	08.20	18.9.89	10.00	1,5°C
40	18.9.89	07.45	18.9.89	9.45	3,5°C
53	19.9.89	12.00	19.9.89	12.10	5,5°C

Lab nr. 33 og 40 angiver den 18.9.1989 henholdsvis kl. 08.20 og 07.45 som modtagelsestidspunkt. Der er her tale om fejlskrivning, da analysematerialet endnu ikke var afsendt på dette tidspunkt.

ANVENDT ANTIBIOTICA.

Samlet oversigt over de antibiotica, som laboratorierne har angivet at have brugt.

Lab.nr.	Fremstillet efter Svensk Standard	Evt. afvigelse fra Svensk Standard	Bemærkninger
1	ja	ja	"Kloramphenicol oxoid SR 78"
2	ja	nej	"Chloramphenicol (oxoid SR 78)"
3	nej	nej	"Kommercial"
4	ja		"Kloramfenicol oxoid SR 78"
			"Klortetracyklin: Egen fremstilling ud fra U.S.B.C. nr. 13535"
5	nej		"Kloramfenicol: Difco 3252, 54-3 Klortetracyklin: Sigma C-4881"
6	ja	ja	"Kloramfenicol kun opløst i alkohol, da efterfølgende vand- tilsætning medfører udfældning"
7	ja		
8	ja	nej	

Lab.nr.	Fremstillet efter Svensk Standard	Evt. afvigelse fra Svensk Standard	Bemærkninger
9	nej		"3 ml. SR. 78 oxoid/ 500 ml. 0,5 ml. 10% aquacyc- line Rosco/500 ml"
10		ja	"Cloramfenicol oxoid SR 78 opløst i acetone"
11	ja		
12	ja		"Chloramphenicol fra oxoid er opløst i 3 ml acetone/500 ml Rose Bengal"
13	nej		"Supplementer Difco- antimicrobic vial A Batch nr. 3333-60 Difco-antimicrobic suppl. C. Batch nr. 3352-54-3"
14	ja	nej	
15	ja	nej	
16	ja		
17	nej	ja	"Kloramfenicol er opløst i acetone"
18	ja		"Difco 3352-54-3 Difco 3333-60"
19	nej		"Difco 3352-54-3 Difco 3333-60"

Lab.nr.	Fremstillet efter Svensk Standard	Evt. afvigelse fra Svensk Standard	Bemerkninger
20	ja		
21	nej		
22	nej		"Ampul chloramphenicol selective supplement SR 78"
23	ja	ja	
24	ja	ja	"Kloramfenicol ikke fortynget med destilleret vand, blot opløst i ethanol"
25	intet angivet		
26	ja	nej	
27	ja	nej	
28	ja	nej	
29	nej	ja	"Kloramfenicol er fremstillet ud fra kloramfenicol øjendråber 0,5% fra DAK"
			Svar: Der bør ikke anvendes kloramfenicol øjendråber, da disse foruden kloramfenicol indeholder bl.a. borsyre og borax.

Lab.nr.	Fremstillet efter Svensk Standard	Evt. afvigelse fra Svensk Standard	Bemærkninger
30	ja	ja	"Kloramphenicol fra 100 mg ampul. Der er lavet 1/5 af mængden i standard"
31	ja		"Tilsat 20 ml/l ef- ter forslag til Svensk Standard, SS0281SV, udgave 1, 1986-10-07"
32	ja	nej	
33	ja	nej	
34	ja	nej	"Modtaget en færdig pakke fra BB"
35	intet angivet		
36	nej	ja	"Anvendt Difco Rose Bengal Antimicrobic Suppl. C 3352-54-3"
37	ja	nej	
38	ja		
39	ja	ja	"Kloramfenicol:Oxoid SR 78 oploses i 5 ml 96% ethanol. Deraf 1 ml ad 200 ml Rose Bengal
			Klortetracyklin som Svensk Standard"

Lab.nr.	Fremstillet efter Svensk Standard	Evt. afvigelse fra Svensk Standard	Bemærkninger
40	ja	nej	
41	nej		"Difco"
42	ja	nej	
43	ja	ja	"Klortetracyklin Hydrochlorid "Sigma" er benyttet"
46	intet angivet		
47	ja		
48	ja	nej	
49	ja	nej	
50	ja		
53	ja		
54	ja	nej	
55	ja og nej	ja	"Klortetracyklin'en blev sterilfiltre- ret"

ANVENDT ROSE BENGAL AGAR

Samlet oversigt over det fabrikat af Rose Bengal Agar, som laboratorierne har angivet at have brugt. Nogle laboratorier har i stedet for fabrikat angivet forhandler, og det nummer, der er angivet som batchnummer, er ikke i alle tilfælde korrekt.

Lab.nr.	Fabrikat/forhandler	Batch nr.
1	Oxoid CM 549	126 38250
2	SS med afvigelse	
3	Oxoid	150 43002
4	SS	
5	Difco 1831-17-4	764849
6	Oxoid	CM549
7	Difco	756201
8	Oxoid	338 39437
9	SS	
10	Oxoid CM 549	126 40717
11	Difco 1831-17-4	757460
12	Oxoid	CM 549
13	Difco	1831-17-4
14	Difco	1831-17-4
15	Oxoid	CM 549
16	Oxoid	295980
17	Difco	1831-17-4
18	Difco	1831-17-4
19	Difco	1831-17-4
20	Difco 0703-01-09	770628
21	Oxoid	CM 549
22	Oxoid CM 549	126 40717
23	Oxoid	150 43002
24	SS	
25	Bie og Berntsen	
26	Difco 0703-01	674654
27	Difco 1831	771529
28	Difco 1831	923304
29	Difco 1831-17-4	771529
30	Oxoid	253 38902
31	Oxoid	034 37806
32	Oxoid CM 549	208 41279
33	SS	
34	Difco	1831
35	Oxoid CM 549 + suppl. SR 73 og 78	23741472
36	Difco 1831-17-4	771529
37	Oxoid CM 549	150-43002
38	Oxoid	03437806
39	Oxoid CM 549	388 39437
40	Bie og Berntsen A/S	923304
41	Difco	771529
42	Oxoid	237 41472
43	Oxoid	150 43002
46	Struers	
47	Difco 1831	771529
48	SS	
49	Oxoid	150 43002
50	Difco	1831
53	SS	
54	Oxoid CM 549	295980
55	SS, men afvigelse	

Laboratoriernes bemærkninger til ROSE BENGAL AGAR

Lab.nr.	Bemærkninger
1	Slut pH = 7,2
2	Difco Agar Bitek
5	Agar 15 g
6	Antibiotikaopløsninger tilsat efter autoklavering, jvf. Svensk Standard, hvor oxoids substrat efter forskriften <u>kun</u> skal tilsættes kloramfenicol <u>før</u> autoklavering.
16	Rose-Bengal 0,05 g.
17	pH indstillet på 6,0 før autoklavering.
18	Rose Bengal 0,05 g agar 15 g pH ændret til 5,8.
19	pH = 7,2
20	Dette substrat indkøbt efter vejledning af Odense MLKE.
21	Tilsættes ampul: Chloramphenicol Selective Supplement SR 78.
23	0,05 g Rose Bengal/l istedet for 0,035 g/l. pH indstillet ifølge Svensk Standard på 5,8.
25	Antibiotica bldg.+RB agar købt klar til bldg. fra Bie og Berntsen.
26	Bacto agar 20 g.
30	pH sænket fra 7,3 til 5,87. Anvendt 9 cm petriskåle.
31	Rose-Bengal 0,05 g/l Agar 15,5 g/l pH = 7,2 ellers lig Svensk Standard.
34	Kommerciel Rose Bengal agar fra Bie og Berntsen. Der er brugt ionbyttet vand til fremstilling af Rose-Bengal-agar, frisk-tappet.
35	0,05 g/l Rose-Bengal.
36	Færdig pH 7,20.
39	Rose-Bengal autoklaveret 115° i 15 min.
41	pH 6,8.
42	Kloramfenicol og klortetracyclin tilsat efter autoklavering (Svensk Standard).
43	Antibiotica-konc. og pH som Svensk Standard.
46	9 cm petriskåle.
47	Færdig kit.
50	Indeholder: 0,05 g Rose Bengal 15 g Bacto Agar

ANVENDTE MEMBRANFILTRE

Samlet oversigt over anvendte membranfiltre. Af denne fremgår hvilke fabrikater, laboratorierne har angivet at have anvendt samt det pågældende fabrikats produktnr. Nogle laboratorier har i stedet for produktnummer angivet batchnummer.

Lab.nr.	Fabrikat	Produktnr.
1	Gelman	66068
2	Gelman Sciences	66068
3	Sartorius	13906 47 ACN
4	Millipore	Hawg 047 S1
5	Sartorius	13006-47-ACN
6	Millipore	Hawg 047 S1
7	Sartorius	0788 11406 0639/7
8	Gelman Sciences	66068
9	Gelman Sciences	66068
10	Ulæselig	
11	Gelman Sciences	66068
12	Millipore	H9CK 87032A
13	Gelman	66068
14	Sartorius	0589 139060790/8
15	Sartorius	1286-1390602766
16	Millipore	Hawg 047 S1
17	Gelman	66068
18	Millipore	H6N80351 E
19	Millipore	Hawg 047 S1
20	Millipore	Bedford M.A. 01730
21	Millipore	Hawg 047 S1
22	Gelman	81081 B
23	Millipore	ingen angivelse
24	Gelman	66068
25	Sartorius	982 2510608161
26	Millipore	Hawg 047 SI
27	Sartorius	13906-47-ACN
28	Sartorius	13806-47-ACN
29	Sartorius	13806-47-ACN
30	Gelman	66378
31	Gelman Sciences Inc.	66278
32	Millipore	Hawg 047 S1
33	Millipore	MA 01730
34	Sartorius	11406
35	Sartorius	11406-47-ACN
36	Millipore	Hawg 047 S1
37	Millipore MA 01730	Hawg 047 S1
38	Gelman Sciences GN-6	66068
39	Sartorius	11406-47-ACN
40	Gelman Sciences	66068
41	Gelman	66068
42	Millipore	Hawg 04751
43	Millipore 0,45 um	Hawg 047 S.3
46	Millipore	Hawg 047 S2
47	Millipore	Hawg 047 53
48	Sartorius	13906-47-ACN
49	Millipore	Hawg 047 S3
50	Sartorius	13806-47 ACN
53	Sartorius	13906 AC
54	Millipore	MXHABG124
55	Schleicher og Schüll ME25	401670

KOLONITÆLLING.

Samlet oversigt over de hjælpemidler laboratorierne har angivet at have brugt til kolonitælling.

Lab.nr.	Makroskopisk	Tællekasse/ forstørrel- sesgrad	Stereomikroskop/ forstørrelsес- grad	Andet/forstør- relsesgrad
1	x			
2	x		x/10x	x/200x
3	x	x		
4	x		x (til identi- fikation af af skimmel- kolonier)	lup/6x
5		x/?		x/7-45x
6	x			lup/4x
7	x			
8	x			x/ca.8x
9	x			
10	x		x(kontrol)/10x (0,7 op til 4,2)	
11	x			x/15x
12	x	x		
13	x	x	x/10x	mikroskopisk /40x

Lab.nr.	Makroskopisk	Tællekasse/ forstørrel- sesgrad	Stereomikroskop/ forstørrelses- grad	Andet/forstør- relsesgrad
14			x/10x	
15	x		x/50x	
16	x	x		
17			x/10-67x	
18	x		x/20x	
19	x			lup/5x
20		x/2x		
21	x		x(alene til identifika- tion)	
22	x		x/10x(til at se kolonimor- fologi i tvivlstil- fælde)	
23	x		x(set på plad- erne men ikke talt)	
24	x		x/10x	
25			x/7-40x	
26			x/7x	
27	x			lup

Lab.nr.	Makroskopisk	Tællekasse/ forstørrel- sesgrad	Stereomikroskop/ forstørrelses- grad	Andet/forstør- relsesgrad
28	x		x/(op til 4,2x)	
29		x	x(verifika- tion)/1x	gramfarvning /1.000x
30	x		x/(6,3x4/0,08)	
31	x			
32		x	x/13x	
33			x/25x	
34		x/lup	x(kontrol af plader)/7-30x	
35	x			
36	x		x/1-40x	
37	x		x/forskellig zoomlinse	fasekontrast (efterprøvet i tvivlstil- fælde)/500x
38	x			
39	x		x/20x	
40	x			
41	x		x/5x	
42				lup/ca. 2x

Lab.nr.	Makroskopisk forstørrel- sesgrad	Tællekasse/ forstørrelses- grad	Stereomikroskop/ forstørrelsес- grad	Andet/forstør- relsesgrad
43		x/2x	x/40x	lup/10x
46	x			lup/3x
47			x	
48			x	
49			x	
50			x/10x	
53				lampe med indbygget forstørrel- sesglas/ 2-3x
54	x			
55	x			

RENGØRING AF FILTERHOLDERENS TRAGT.

Samlet oversigt over hvorledes laboratorierne har opgivet at have rengjort de til metodeafprøvningen anvendte tragte. Rengøringen af basis blev generelt foretaget på samme måde. Før brug: Angiver hvorledes tragten blev rengjort inden metodeafprøvningen. Mellem 2 prøver: Angiver hvorledes tragten blev rengjort mellem filtrationer af 2 prøver.

Lab.nr. 1: Mellem 2 prøver: "Skyllet i postevand - derefter i destilleret vand før autoklavering ved 121°C i 15 min.".

Lab.nr. 2: Før brug: "Skyllet i dest. H₂O. Steriliseret/autoklaveret".

Lab.nr. 3: Før brug: "Vasket i opvaskemaskine - tørsteriliseret i ovn ved 160°C i 3 timer".

Lab.nr. 4: Før brug: "Tørsterilisation - 150°C/3 timer".

Mellem 2 prøver: "Gennemskyldning med dest. vand efterfulgt af flambering".

Lab.nr. 5: Før brug: "Vask. Autoklavering".

Lab.nr. 6: Før brug: "Alle tragte rengjort ved strømning i kogende vanddamp 2x med 24 t's mellemrum".

Lab.nr. 7: Mellem 2 prøver: "Skyllet med bufferopløsning og flamberet".

Lab.nr. 8: Før brug: "Autoklaveret 121°C, 30 min. i pose".

Mellem hver prøve: "Flambering og skyldning med skyllevæske".

Lab.nr. 10: Før brug: "Samlet tragte: tragt + holder med magnetsamling. Autoklaveret 121°C i 30 min."

Lab.nr. 11: Mellem 2 prøver: "Behandlet med sprit og flamberet".

Lab.nr. 12: Mellem 2 prøver: "Gennemskyldning med kogende vand".

Lab.nr. 13: Mellem 2 prøver: "Den blev autoklaveret og skyllet med fortyndingsvæske imellem hvert prøvenummer".

Lab.nr. 14: Før brug: "Vasket i trinon, skyllet i svag saltsyrevand og ionbyttet vand. Tørret i varmeskab - Steriliseret ved 121°C".

Lab.nr. 16: Før brug: "Autoklaveret".

Mellem 2 prøver: "Renset i ethanol + steril destilleret vand, k.filter med 100 ml. steril destil. vand".

Lab.nr. 17: Før brug: "Autoklaveret".

Lab.nr. 18: Mellem 2 prøver: "Vasket og steriliseret".

Lab.nr. 19: Før brug: "Skyllet i autoklaveret milliporevand".

Lab.nr. 20: Samme tragt er anvendt til prøver 9, 15, 37 og 48.

Samme tragt er anvendt til prøve 22 og 59.

"Før pr. 9: Steriliseret (160°C i 2 timer).

Før pr. 15: Omhyggelig flambering.

Før pr. 37: Autoklaveret (115°C i 20 min.).

Før pr. 48: Omhyggelig flambering.

Før pr. 22: Steriliseret (160°C i 2 timer).

Før pr. 59: (115°C i 20 min.)".

Lab.nr. 22: Mellem 2 prøver: "Samme tragt anvendt til samtlige prøver.

Mellem prøverne blev tragten skyllet med 1 l. kogende vand.

Derefter skyllet med sprit og tilslut med kogt vand".

Lab.nr. 23: Mellem 2 prøver: "Flamberet".

Lab.nr. 24: Før brug: "Tragt afvasket - Indpakket i sterilisationspapir - autoklaveret 15 min.v.121°C".

Lab.nr. 26: Før brug: "Afvaskning i let sulfovand. Indpakning i silkepapir. Autoklivering 15 min. 120°C".

Lab.nr. 27: Før brug: "Autoklaveret".

Lab.nr. 28: Mellem 2 prøver: "Afspritning -> flambering -> gennemskyldning med steril fortyndingsvæske".

Lab.nr. 29: Før brug: "Tørsteriliseret".

Mellem 2 prøver: "Steriliseret med kogende vand".

Lab.nr. 30: Før brug: "Filtertragten grundigt skyllet efter sidste anvendelse. Tragt og basis samlede med vatprop i røret i låget samt en vatprop i udløbet på basis. Derefter steriliseret i autoklave ved 121°C i 15 min".

Lab.nr. 31: Før brug: "Autoklaveret ved 121°C i 15 min. og tørret."

Mellem 2 prøver: "Gennemskyllet med kogende destilleret vand".

Lab.nr. 33: Før brug: "Skyllet i postevand, steriliseret ved 160°C i 2 timer".

Mellem 2 prøver: "Tragten flamberet mellem de forskellige prøver".

Lab.nr. 34: Mellem 2 prøver: "Med sterilt ionbyttet vand og flambering".

Lab.nr. 36: Mellem 2 prøver: "Svabret med sprit og flambering. Skyldning med fortyndingsvæske".

Lab.nr. 39: Før brug: "Filterholderens tragt + basis (underdel) rengøres således: vaskes, skyldes i dest. H₂O. Tørres og indpakkes i silkepapir + brunt papir. Påsat autoklavetape og autoklaveres ved 121°C i 30 min.

Før prøven filtreres, laves kontrol på tragten ved at filtrere 100 ml. fortyndingsvand gennem 1 filter, som anbringes på 1 Rose Bengal plade og inkuberes sammen med prøverne".

Lab.nr. 40: Før brug: "Afskyldning i varmt vand. Afskyldning i destilleret vand og autoklaving".

Lab.nr. 41: Før brug: "Autoklaveret før start".

Mellem 2 prøver: "Flamberet - afkølet - skyllet med skyllevand".

Lab.nr. 42: Før brug: "Steriliseret i autoklave (121°C i 20 min.)".

Mellem hver prøve: "Flambering og gennemskyl med steril skyllevæske".

Lab.nr. 43: Før brug: "Steriliseret ved autoklavering".

Lab.nr. 46: Før brug: "Autoklaveret".

Lab.nr. 47: Før brug: "Autoklaveret"

Mellem 2 prøver: "Vasket - vasket med EtDH - flamberet".

Lab.nr. 49: Mellem 2 prøver: "Varmt vand, destilleret vand, fosfatbuffer".

Lab.nr. 50: Mellem 2 prøver: "Tragten blev skyllet med ethanol og herefter med steril skyllevæske".

Lab.nr. 53: Mellem 2 prøver: "Flambering med gasblus, skylning med steril skyllevæske".

Lab.nr. 54: "Brugt engangstragte".

Lab.nr. 55: "Filterhusene blev skyllet 3 gange med sterilt vand og 2 gange med steril fortyndingsvæske".

DELTAGENDE LABORATORIER.

Samlet oversigt over de 51 deltagende laboratorier. Rækkefølgen er uafhængig af laboratoriernes kodenummerering.

Miljø- og levnedsmiddelkontrolenheden, 4200 Slagelse.

Levnedsmiddelkontrollen, 7100 Vejle.

N.Ø. Vendsyssels Levnedsmiddel- og miljøkontrol, 9900 Frederikshavn.

Stadsdyrlægens kontor, 2000 København F.

Levnedsmiddelkontrollen, 6400 Sønderborg.

Levnedsmiddelkontrollen I/S, 2740 Skovlunde.

Miljø- og levnedsmiddelkontrolenheden, 7500 Holstebro.

Levnedsmiddel- og miljøtilsynet, 8200 Århus N.

Levnedsmiddelkontrolenheden, 7000 Fredericia.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen I/S, 4600 Køge.

Miljø- og levnedsmiddelkontrolenheden, 7700 Thisted.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 4800 Nykøbing F.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 8600 Silkeborg.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 4300 Holbæk.

Det Fælleskommunale Laboratorium, 7400 Herning.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 6505 Esbjerg Ø.

Levnedsmiddelkontrollen, 5700 Svendborg.

Fælleskommunal Levnedsmiddelkontrol, 2600 Glostrup.

Struer Levnedsmiddelkontrol, 7600 Struer.

Hygiejniske Forvaltning, 9220 Ålborg Øst.

Bornholm Levnedsmiddelkontrol, 3700 Rønne.

Miljø- og levnedsmiddellaboratoriet, 4700 Næstved.

Miljø- og levnedsmiddelkontrolenheden, 5220 Odense SØ.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 3400 Hillerød.

Levnedsmiddelkontrollen I/S, 3600 Frederikssund.

Det Kommunale Laboratorium, 6200 Åbenrå.

Miljø- og levnedsmiddelcentret, 8700 Horsens.

Miljø- og levnedsmiddelkollen, 8800 Viborg.

Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 4100 Ringsted.

Levnedsmiddelkontrollen i Roskilde I/S, 4000 Roskilde.

Hjørring Kommunale Levnedsmiddelkontrol, 9800 Hjørring.
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 6760 Ribe.
Randers Levnedsmiddelkontrol, 8900 Randers.
Levnedsmiddelkontrollen i København, 1711 København V.
Hygiejnelaboratoriet, 6270 Tønder.
Miljø- og levnedsmiddelkontrolenheden, 6100 Haderslev.
Miljø- og levnedsmidelkontrollen, 6800 Varde.
Miljø- og levnedsmiddelkontrollen, 3000 Helsingør.
Miljø- og levnedsmiddelkontrolenheden, 4990 Sakskøbing.
Institut for Bioteknologi. Danmarks Tekniske Højskole, 2800 Lyngby.
Mejeribrugets Analysevirksomhed, 4100 Ringsted.
Steins Laboratorium, 2620 Albertslund.
A/S Qvist's Laboratorium, 8240 Risskov.
Mejeribrugets Analysevirksomhed, 7500 Holstebro.
Statens Livsmedelsverk, S-751 26, Uppsala, Sverige.
Hygiejnisk Institut, 100 Thorshavn, Færøerne.
Mejeribrugets Analysevirksomhed, 6650 Brørup.
Alfred Jørgensen, Gæringsfysiologisk Laboratorium, 1809 Frederiksberg C.
Laboratoriet Sjælsøvandværk, 2970 Hørsholm.
Allergologisk Laboratorium, 2970 Hørsholm.
Vandkvalitetsinstituttet, 2970 Hørsholm.

HOMOGENITETSKONTROL.

Til homogenitetskontrol er der i alt udtaget 21 koncentrater, 7 af hvert prøvepar, benævnt H_1 - H_{121} . Disse er jævt fordelt over hele aftapningsperioden og er undersøgt umiddelbart efter aftapningen.

	Koncentraterne		Koncentraterne		Koncentraterne	
	9 og 22		15 og 37		48 og 59	
	gær	skimmel	gær	skimmel	gær	skimmel
	cfu/	cfu/	cfu/	cfu/	cfu/	cfu/
	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
H ₁	< 1	54.000	270.000	240.000	< 1	1.000.000
H ₂₁	< 1	47.000	350.000	230.000	< 1	1.000.000
H ₄₁	< 1	54.000	270.000	240.000	< 1	1.300.000
H ₆₁	< 1	67.000	330.000	180.000	< 1	1.400.000
H ₈₁	< 1	60.000	330.000	210.000	< 1	1.100.000
H ₁₀₁	< 1	57.000	350.000	190.000	< 1	1.700.000
H ₁₂₁	< 1	49.000	410.000	230.000	< 1	800.000
Gennem- snit	< 1	55.000	330.000	220.000	< 1	1.200.000
Standard afvigelse	0	6.754	48.990	24.300	0	302.372

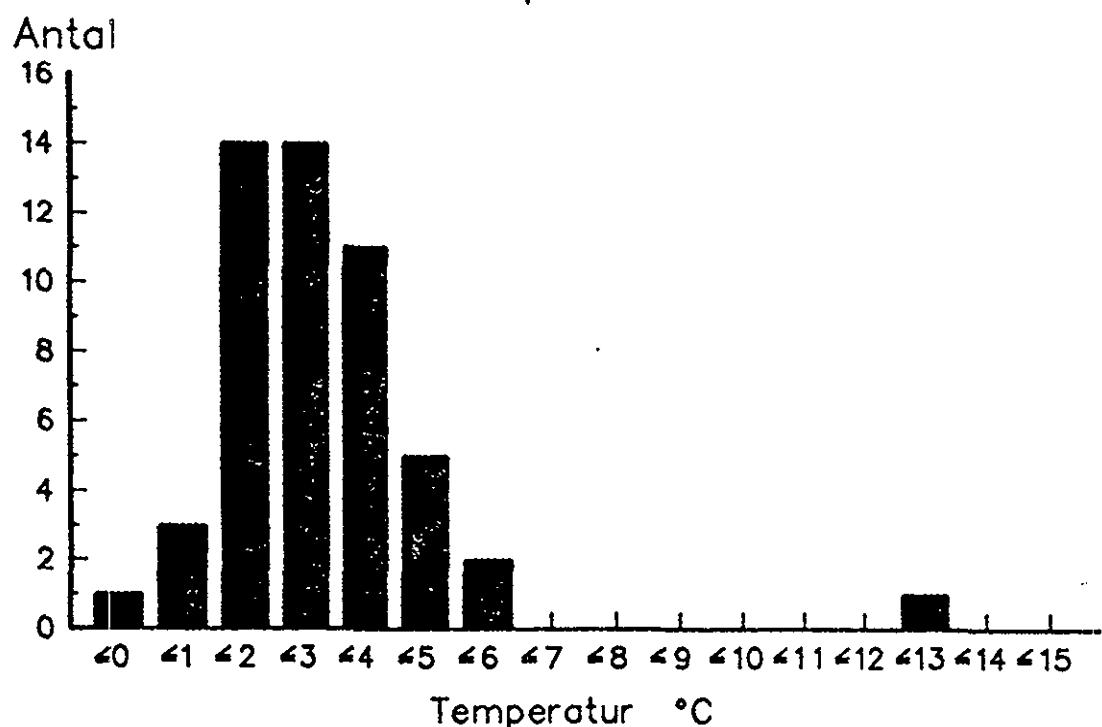
OVERSIGT OVER TEMPERATURREGISTRERING.

Temperaturregistrering i rør med tape:

Lab.nr.	9.interkalibrering	4.metodeafprøvning
1	4,5	4,5
2	2,4	2,4
3	2,0	2,0
4	2,4	2,4
5	3,0	3,0
6	3,5	3,5
7	1,8	1,8
8	0	0
9	2,3	2,3
10	4,7	4,7
11	1,5	1,5
12	3,2	3,2
13	2,5	2,5
14	2,0	2,0
15	3,2	3,2
16	1,0	1,0
17	3,0	3,0
18	1,5	1,5
19	3,6	3,6
20	0,5	0,5
21	3,3	3,3
22	2,0	2,0
23	1,5	1,5
24	1,3	1,3
25	4,5	4,5
26	2,3	2,3
27	2,6	2,6
28	1,0	1,0
29	3,0	3,0
30	3,0	3,0
31	3,8	3,8
32	4,2	4,2
33	1,5	1,5
34	1,3 *)	13,0 *)
35	2,0	2,0
36	2,0	2,0
37	1,5	1,5
38	3,7	3,7
39	2,3	2,3
40	3,0 *)	3,5 *)
41	2,0	2,0
42	4,0	4,0
43	2,0	2,0
44	2,7	
45	7,2	*)
46	2,7	2,7 Årsagen til at temperaturregistrering i rør med tape er angivet
47	2,8	2,8 for såvel 9. interkalibrering som
48	5,5	5,5 4. metodeafprøvning er, at lab.nr.34
49	4,0	4,0 og 40 for disse har angivet forskellige temperaturer.
50	4,4	4,4
51	3,6	
52	4,0	
53		5,5
54	4,0	4,0
55		3,0
56	ca. 5,7	

SØJLEDIAGRAM OVER TEMPERATURREGISTRERING.

4. Metodeafprøvning
Temperatur



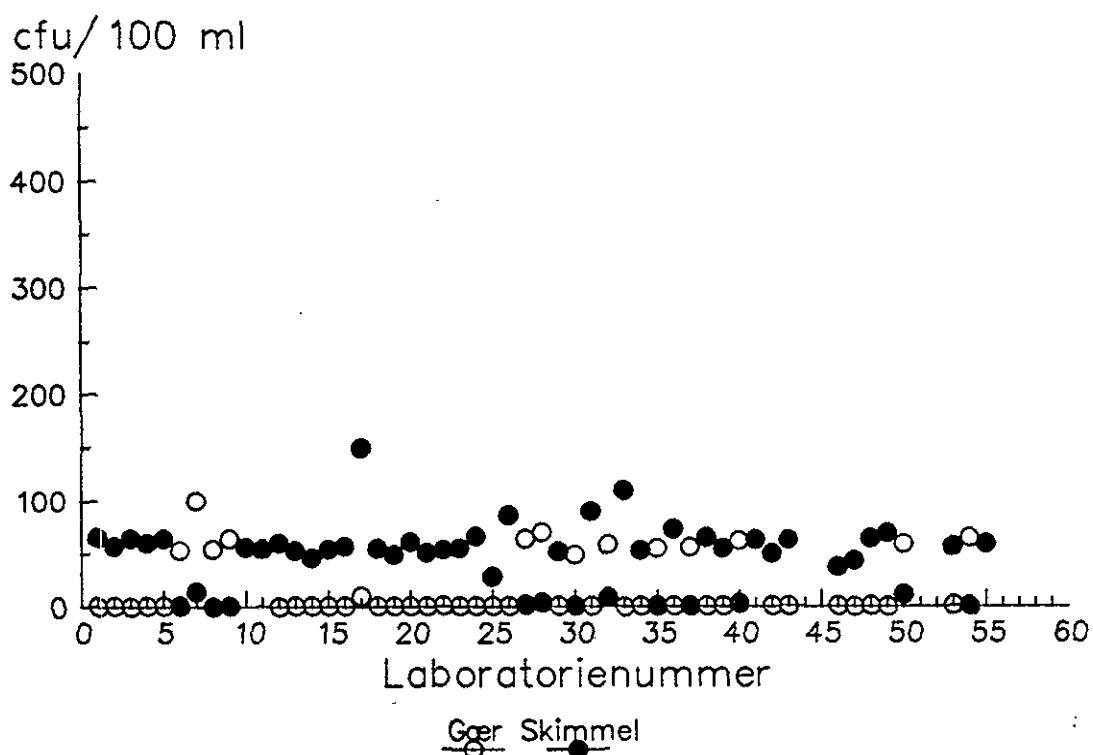
UDSKRIFT AF MODTAGNE RÅDATA.

RESULTAT AF 4. METODEAFPRØVNING

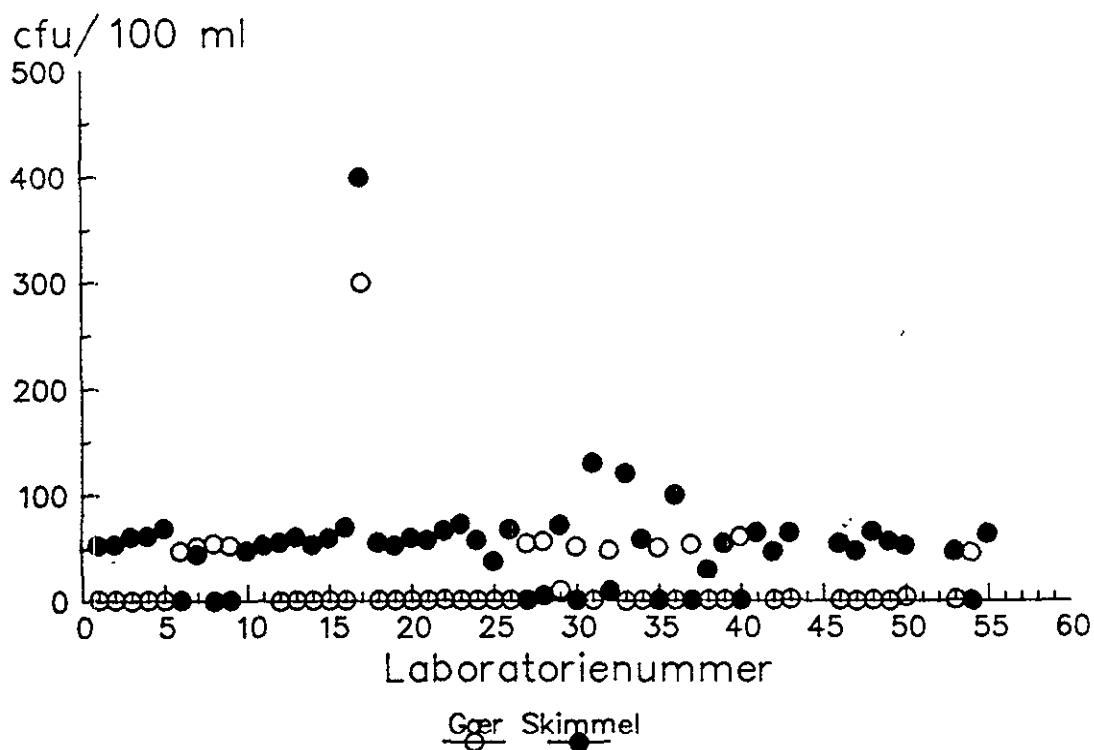
LAB KODE	Gær	Skimmel	Gær	Skimmel	Gær	Skimmel	Gær	Skimmel	Gær	Skimmel	Gær	Skimmel
	cfu/100 ml	Prøve 9	cfu/100 ml	Prøve 15	cfu/100 ml	Prøve 22	cfu/100 ml	Prøve 37	cfu/100 ml	Prøve 48	cfu/100 ml	Prøve 59
1	< 0	65	370	120	< 1	53	330	110	< 1	1380	< 1	1350
2	< 1	57	290	310	< 1	54	240	210	< 1	1100	< 1	900
3	0	64	240	230	0	61	240	240	0	2000	0	2200
4	< 1	60	280	230	< 1	62	250	250	< 1	1900	< 1	1800
5	< 1	64	310	220	< 1	69	340	200	< 100	500	< 100	1600
6	53	1	320	240	48	< 1	280	240	< 1	1000	< 1	1400
7	100	14	350	1100	52	45	43	23	< 100	1800	< 100	1600
8	54	0	520	0	55	0	430	0	0	1700	0	1500
9	64	< 1	238	187	53	< 1	259	180	< 1	1200	< 1	1700
10		56	550	300		48	360	220		880		990
11		54	230	44		53	260	83		1530		1440
12	0	60	301	152	0	56	281	145	0	1000	0	1700
13	< 1	53	65	85	< 1	61	290	89		727		1045
14	< 1	46	340	280	< 1	54	330	200	< 1	1500	< 1	1400
15	< 1	54	410	300	< 1	60	360	220	< 1	900	< 1	1300
16	< 1	57	330	310	< 1	70	340	270	< 1	800	< 1	900
17	< 10	150	200	100	300	400	350	290	< 100	700	< 100	1100
18	< 1	55	170	45	< 1	56	320	45	< 1	300	< 1	1400
19	< 1	49	350	210	< 1	53	330	280	< 1	1700	< 1	1600
20	< 1	61	170	180	< 1	60	370	240	< 1	1500	< 1	900
21	< 1	51	220	130	< 1	58	200	97	< 100	1500	< 100	2100
22	< 1	53	410	190	< 1	66	340	300	< 1	1400	< 1	2200
23	< 1	55	550	< 1	< 1	73	470	< 1	< 100	600		
24	< 1	66	300	180	< 1	58	260	170	< 1	1000	< 1	1400
25	< 1	28	200	134	< 1	38	127	80	< 1	1300	< 1	800
26	< 1	86	230	260	< 1	68	380	290	< 1	1300	< 1	1100
27	64	2	250	130	55	< 1	260	140		1600		1400
28	70	4	458	2	57	5	341	3	< 1	1200	< 1	1500
29	< 1	52	220	130	10	72	130	170	1300	< 1	1600	< 1
30	49	< 1	440	< 1	52	< 1	410	< 1	< 1		< 1	
31	< 1	90	320	290	< 1	130	250	240	< 1	1400	< 1	1000
32	58	8	370	81	48	9	310	86	< 1	1000	< 1	900
33	0	110	340	290	0	120	280	320	0	1200	0	1400
34	< 1	53	220	89	< 1	59	< 1	43	< 100	1400	< 100	1600
35	55	< 1	< 1	150	51	< 1	< 1	160	< 1	1500	< 1	1400
36	< 1	73	282	236	< 1	100	355	180	< 1	1500	< 1	900
37	56	< 1	150	73	54	< 1	240	69	< 100	1000	< 100	1400
38	< 1	65	110	9	< 1	30	270	6	< 1	870	< 1	670
39	< 1	55	160	230	< 1	55	290	230	< 1	1600	< 1	800
40	62	3	290	210	61	1	290	150	< 1	1400	< 1	1400
41		63	620			65	520		< 1	1200	< 1	1400
42	< 1	50	240	160	< 1	47	250	150	10	810	1	1600
43	0	62	270	180	1	64	300	160	< 10	1060	< 10	1110
44												
45												
46	< 1	37	290	110	< 1	55	220	150	< 1	700	< 1	650
47	0	43	360	230	0	48	280	180	0	1800	0	1900
48	< 1	64	330	180	< 1	66	440	170	< 1	460	1	1500
49	< 0	69	230	170	0	57	260	180	0	420	1	380
50	59	11	< 1	130	4	53	< 1	190	< 1	1700	< 1	1700
51												
52												
53	< 1	56	330	220	< 1	47	280	250	< 1	1300	< 1	1800
54	64	0	472	0	46	0	267		0	800	0	900
55		59		*		64		727		1400		2000

GRAFISK FREMSTILLING.

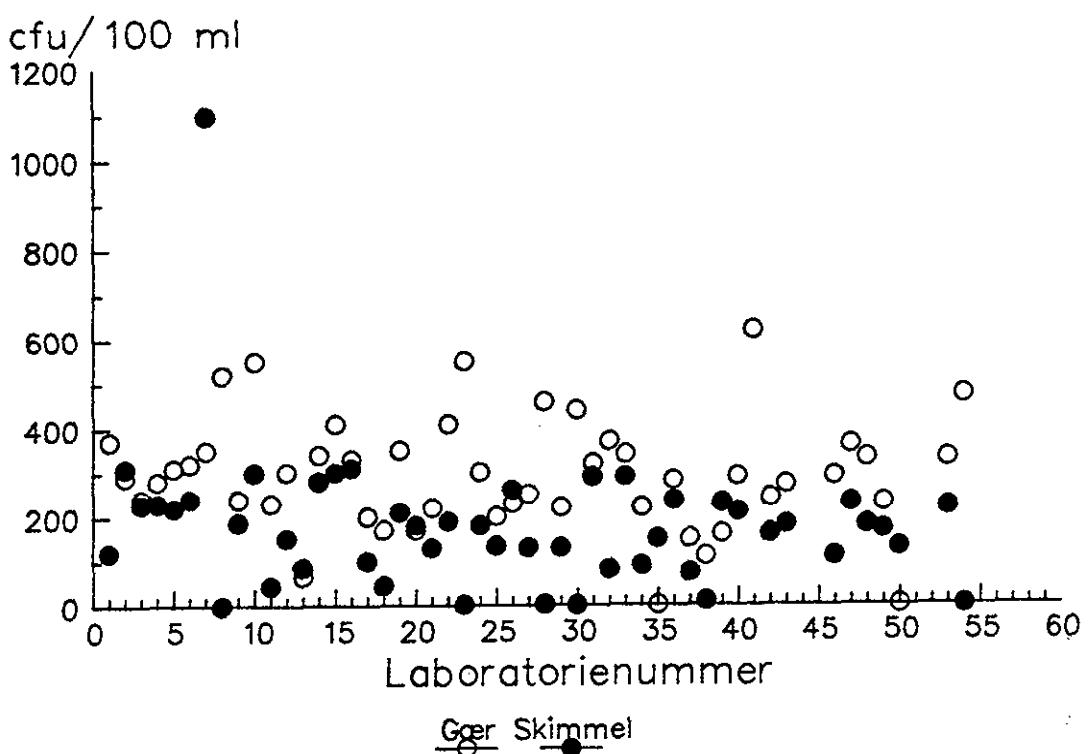
Prøve 9



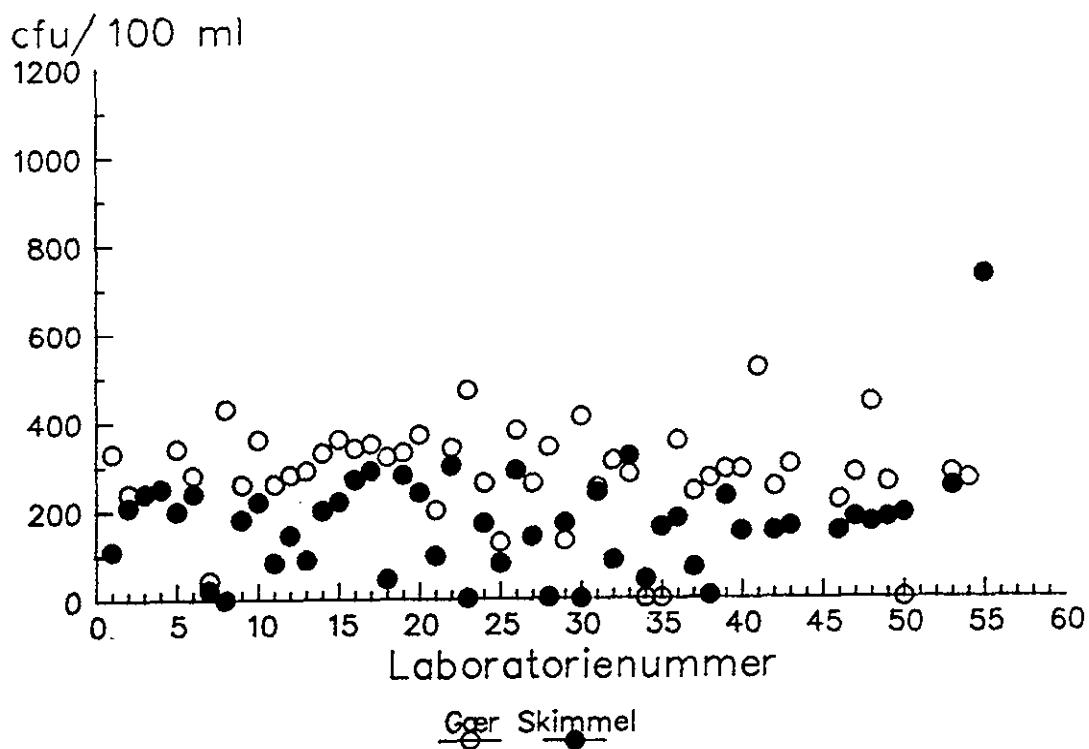
Prøve 22



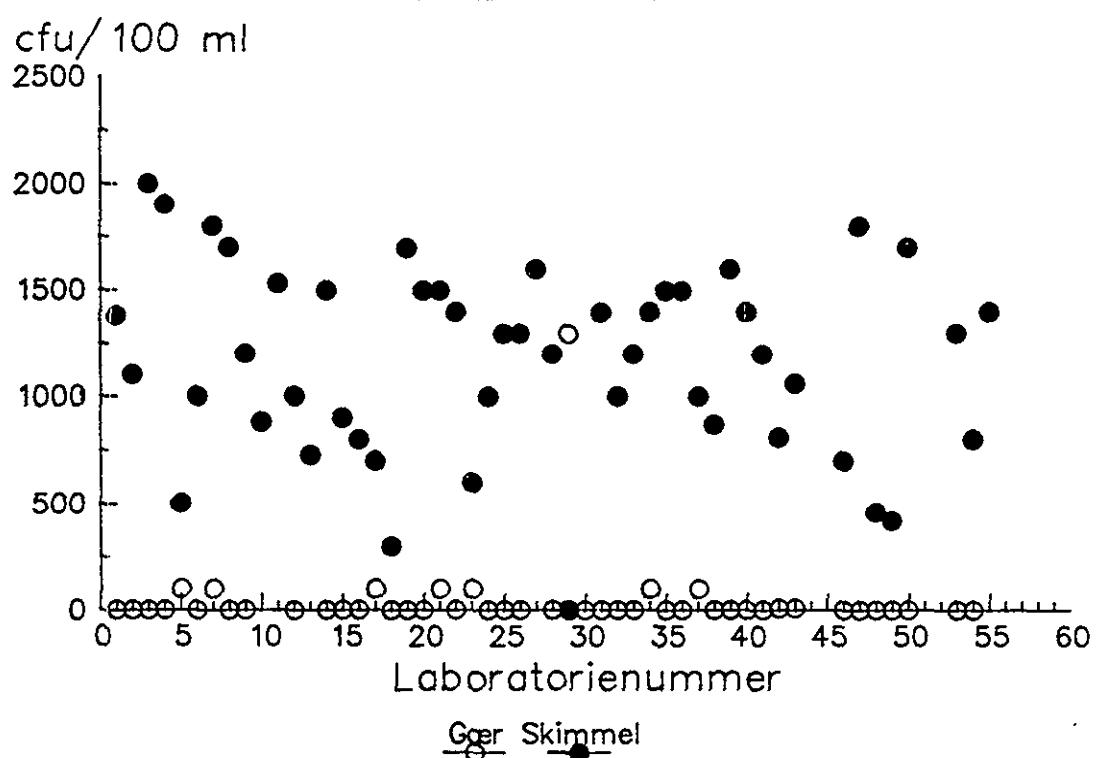
Prøve 15



Prøve 37



Prøve 48



Prøve 59

